

---

**Der Notch-Signaltransduktionsweg  
in *Hydra* - Auswirkungen auf die  
Knospung und  
Nematozytendifferenzierung**

**Andrea Prexl**

---

Dissertation  
der Fakultät für Biologie  
der Ludwig-Maximilians-Universität  
München

vorgelegt von  
Andrea Prexl  
aus München

München, den 17.06.2010

Erstgutachter: Prof. A. Böttger  
Zweitgutachter: Prof. M. Schliwa  
Tag der mündlichen Prüfung:04.08.2010

## **Ehrenwörtliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Ferner erkläre ich, dass ich weder versucht habe, eine Dissertation anderweitig einzureichen bzw. einer Prüfungskommission vorzulegen, noch eine Doktorprüfung durchzuführen. Die vorliegende Dissertation ist nicht ganz oder in wesentlichen Teilen einer anderen Prüfungskommission vorgelegt worden.

München, Juni 2010

Andrea Prexl



*Wer wenig denkt, irrt sich oft.*

Leonardo Da Vinci



<b>1</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>9</b>
1.1	Der Modellorganismus <i>Hydra vulgaris</i> .....	9
1.1.1	Nervenzelldifferenzierung.....	15
1.1.2	Nematozytendifferenzierung .....	17
1.2	Der Notch-Signaltransduktionsweg.....	20
1.2.1	Der kanonische Notch-Signaltransduktionsweg .....	21
1.2.2	Regulationsmöglichkeiten von Notch-Signaltransduktion..	24
1.2.3	Proneurale Proteine und Notch-Signaltransduktion .....	30
1.2.4	Modalitäten und Funktionen von Notch-Signaltransduktion	32
1.2.5	Der Notch-Signaltransduktionsweg in <i>Hydra</i> .....	37
1.3	Zic-Transkriptionsfaktoren .....	38
1.4	POU-Domänen-Transkriptionsfaktoren.....	39
1.5	Ziel dieser Arbeit.....	41
<b>2</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>43</b>
2.1	Der Notch-Ligand in <i>Hydra</i> .....	43
2.1.1	Identifikation von DSL-Domänen in <i>Hydra</i> .....	43
2.1.2	Zelluläre Lokalisation von HyJagged.....	52
2.1.3	Expressionsmuster von <i>Hyjagged</i> .....	78
2.2	Modulatoren der Notch-Signaltransduktion in <i>Hydra</i> .....	80
2.2.1	Fringe .....	81
2.2.2	Mindbomb .....	83
2.3	Auswirkungen des Notch-Signalwegs auf die Nematozytendifferenzierung .....	88
2.3.1	HyZic.....	89
2.3.2	CnASH .....	98
2.3.3	HyPOU4 .....	123
<b>3</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>131</b>
3.1	Der Notch-Ligand in <i>Hydra</i> .....	131
3.2	Modulatoren der Notch-Signaltransduktion in <i>Hydra</i> .....	143
3.3	Auswirkungen des Notch-Signalwegs auf die Nematozytendifferenzierung .....	144
3.3.1	HyZic.....	145

3.3.2	CnASH.....	147
3.4	HyPOU4 .....	152
<b>4</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>155</b>
<b>5</b>	<b>Materialien und Methoden .....</b>	<b>157</b>
5.1	Materialien.....	157
5.1.1	Chemikalien .....	157
5.1.2	Bakterienstämme.....	161
5.1.3	Enzyme.....	161
5.1.4	Plasmide .....	161
5.1.5	Primer .....	162
5.1.6	Peptidsequenzen .....	165
5.1.7	Antikörper .....	166
5.1.8	Längen- und Größenstandards.....	167
5.1.9	Kits.....	167
5.1.10	Sonstige Materialien .....	168
5.1.11	Geräte.....	168
5.1.12	Software.....	169
5.1.13	Puffer und Lösungen .....	169
5.2	Molekularbiologische Methoden .....	182
5.2.1	Agarosegelelektrophorese .....	182
5.2.2	DNA-Konzentrationsbestimmung.....	183
5.2.3	Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterienzellen durch Alkalische Lyse .....	183
5.2.4	PCR .....	184
5.2.5	Restriktionsverdau .....	185
5.2.6	Dephosphorylierung.....	186
5.2.7	Ligation .....	186
5.2.8	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	186
5.2.9	Western Blot .....	186
5.2.10	Bestimmung der Proteinkonzentration .....	187
5.3	Methoden für Bakterien .....	187
5.3.1	Kultivierung von <i>E.coli</i> .....	187
5.3.2	Herstellung elektrokompeter Bakterien .....	187
5.3.3	Herstellung chemisch-kompeter Bakterien .....	188

5.3.4	Transformation .....	188
5.3.5	Bakterielle Expression von Proteinen im kleinen Maßstab	189
5.3.6	Bakterielle Expression von Proteinen im großen Maßstab	190
5.4	Methoden für <i>Hydra</i> .....	191
5.4.1	Kultivierung von <i>Hydra vulgaris</i> .....	191
5.4.2	DAPT-Behandlung .....	191
5.4.3	Herstellung von cDNA aus <i>Hydra</i> .....	191
5.4.4	Ermittlung unbekannter 5' und 3'Enden mit Hilfe von RACE 192	
5.4.5	Biolistische Transformation .....	193
5.4.6	Immunfluoreszenz an ganzen Tieren .....	194
5.4.7	<i>In situ</i> -Hybridisierung .....	195
5.4.8	Subzelluläre Fraktionierung .....	198
5.5	Methoden für humane Zellen .....	199
5.5.1	Kultivierung von HEK293T .....	199
5.5.2	Transfektion von HEK293T .....	199
5.5.3	Fixierung von HEK293T .....	199
5.5.4	Immunfluoreszenz an HEK293T .....	200
5.6	Antikörper-Herstellung .....	200
5.7	Konfokale Mikroskopie .....	200
5.8	Erstellen eines phylogenetischen Stammbaums .....	201
<b>6</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>203</b>
6.1	Gensequenzen .....	203
6.2	Proteinsequenzen .....	207
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>211</b>
<b>8</b>	<b>Abkürzungen .....</b>	<b>225</b>

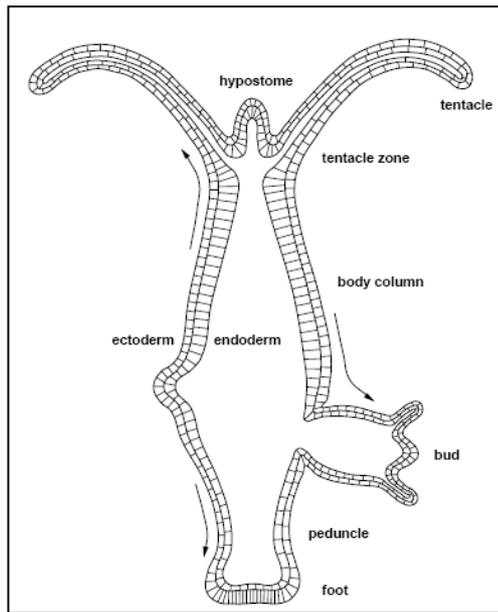


# 1 Einleitung

## 1.1 Der Modellorganismus *Hydra vulgaris*

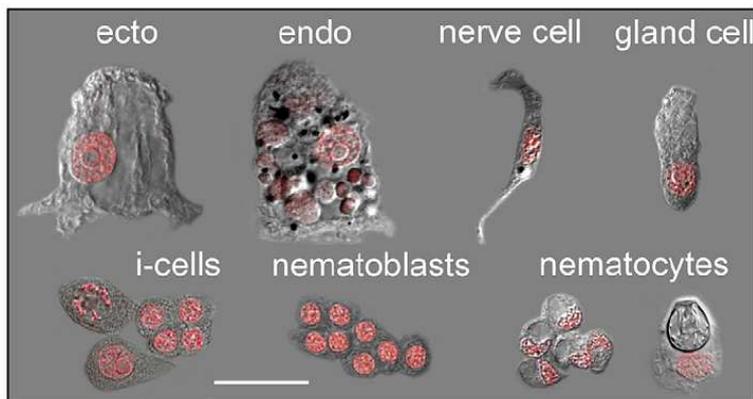
*Hydra vulgaris* zählt zu den evolutionär sehr früh entstandenen Metazoen. Schon deswegen sind Studien diverser zellulärer Prozesse wie der interzellulären Kommunikation und der zellulären Homöostase an diesem Modellorganismus von großer Bedeutung und erlauben eventuelle Rückschlüsse auf die Organisation vielzelliger Organismen im Allgemeinen.

*Hydra vulgaris* gehört zum Stamm der Cnidaria, zur Klasse der Hydrozoa und lebt in heimischen Gewässern. *Hydra* besitzt, im Gegensatz zu den meisten Hydrozoen, kein Medusenstadium. Der adulte, radiärsymmetrische Polyp besteht aus zwei Epithelien, dem Ekto- und dem Endoderm, die den flüssigkeitsgefüllten, schlauchförmigen Gastralraum umgeben. Die Körpermitte wird als Rumpf bezeichnet, an der Spitze befindet sich ein Kopf bestehend aus einem Mundfeld, dem Hypostom, das von einem Tentakelring umgeben wird. Aboral befindet sich eine klebrige Fußscheibe (auch Basalscheibe genannt), die den Polypen am Untergrund fixiert (Slautterback and Fawcett, 1959; Tardent, 1987) (Abb. 1-1).



**Abb. 1-1:** Schematische Darstellung von *Hydra* (Bode, 1996).

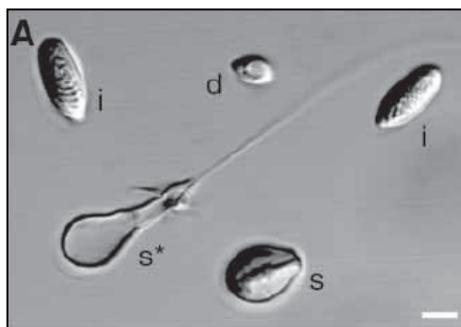
Ein adulter Polyp besteht aus ca. 100.000 Zellen, wobei 20% davon die Epithelzellen der beiden Epithelien darstellen (Bode, 1996; David and Gierer, 1974). Die Epithelzellen des Ektoderms bilden dabei einen schützenden Abschluss gegenüber der Umwelt. Zudem besitzen diese Zellen Muskelfasern an ihrer Basis, die in Bündeln parallel zur Polypenachse verlaufen. Die Epithelzellen des Endoderms, die sogenannten Gastralzellen, weisen dagegen Muskelfasern auf, die senkrecht zur Polypenachse, als Ringmuskulatur, verlaufen. Diese Epithelmuskelzellen erlauben dadurch die Fortbewegung des Polypen. Endodermale Epithelzellen nehmen zudem Nahrung aus dem Gastralraum auf und verdauen diese intrazellulär weiter. Die Epithelzellen des Rumpfes teilen sich fortwährend (Campbell, 1967). Lediglich bei den Zellen der Tentakel, der apikalen Spitze des Hypostoms und der Fußscheibe handelt es sich um differenzierte Epithelzellen, die sich nicht mehr teilen (Holstein *et al.*, 1991) (siehe Abb. 1-2).



**Abb. 1-2:** Mazerierte Zellen: ektodermale Epithelzelle (*ecto*), endodermale Epithelzelle (*endo*), Nervenzelle (*nerve cell*), Drüsenzelle (*gland cell*), einzelne interstitielle Zelle, mitotische interstitielle Zelle und Nest mit vier interstitiellen Zellen (*i-cells*), Nematoblasten (*nematoblasts*), Nematocyten (*nematocytes*) (Böttger and Alexandrova, 2007).

Die beiden Epithelien sind durch eine azelluläre Stützmatrix, die Mesoglea getrennt. In den Räumen zwischen den Epithelzellen befinden sich zudem interstitielle Zellen und deren Differenzierungsprodukte. Interstitielle Zellen sind multipotente Stammzellen, die mehrere Differenzierungsprodukte hervorbringen: die drei somatischen Zelltypen Nervenzellen, Drüsenzellen und Nematocyten, sowie beide Gametentypen (siehe Abb. 1-2). Insgesamt machen interstitielle Zellen und ihre Differenzierungsprodukte 80% aller Zellen einer adulten *Hydra* aus. Nervenzellen bilden in beiden Zellschichten ein dichtmaschiges Netz mit einer leichten Anhäufung an Hypostom und Fußscheibe. Drüsenzellen befinden sich ausschließlich im Endoderm. Nematocyten oder Nesselzellen, als namensgebender Zelltyp der Cnidarier oder Nesseltiere, dienen dem Beutefang, Schutz gegenüber Freßfeinden und der Fortbewegung. Die unterschiedlichen Aufgaben werden von vier Nesselzelltypen übernommen, die alle eine dickwandige Kapsel oder Nematozyste mit einem mit Dornen besetzten Schlauch enthalten. Die Nematozyste ist mit einem Deckel verschlossen und besitzt

zudem ein Cnidocil, das über die Zelloberfläche herausragt und das bei mechanischer Reizung zur explosionsartigen Entladung der Kapsel führt. Bei den unterschiedlichen Nematozysten-Typen handelt es sich um Desmonemen (Wickelkapseln), die sich zunächst um Borsten oder sonstige Körperanhänge der Beute wickeln, um das Tier festzuhalten, Stenothelen (Durchschlagkapseln), die die Beutetiere lähmen, sowie atriche und holotriche Isorhizen (Klebekapseln), die klebrige Schläuche aufweisen und dadurch bei der Fortbewegung helfen (Tardent, 1987) (siehe Abb. 1-3).



**Abb. 1-3:** Nematozysten; d: Desmoneme, i: holotriche Isorhizen, s: Stenothele, s\*: entladene Stenothele; Maßstab: 5µm (Engel *et al.*, 2002).

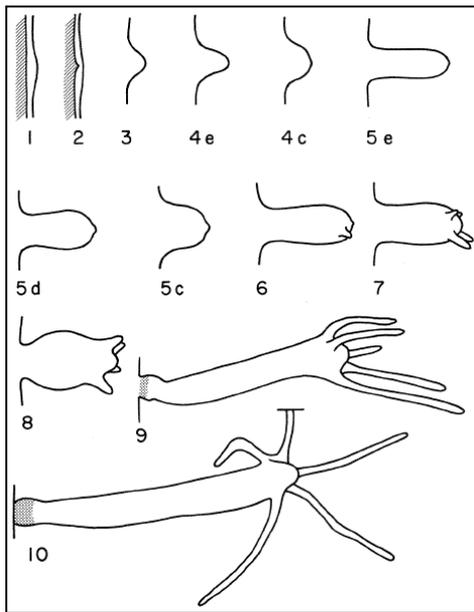
Sowohl Drüsen- als auch Nervenzellen und Nematocyten entstehen aus interstitiellen Stammzellen. Letztere allein machen 4% aller Zellen einer adulten *Hydra* aus, liegen stets einzeln oder im Paar vor und teilen sich fortwährend mit einer mittleren Zellzyklusdauer von 24 Stunden, um einerseits ihre eigene Population zu erhalten und andererseits die Differenzierung zu oben genannten Zelltypen zu erlauben (Campbell and David, 1974; David and Gierer, 1974). Dabei bilden ca. 60% der interstitiellen Zellen weiterhin den Stammzellpool, während die verbleibenden 40% determiniert sind (David and Murphy, 1977). Ein sehr geringer Anteil an interstitiellen Zellen wird für die Differenzierung zu Drüsenzellen verwendet, die

im Endoderm von Rumpf und Kopf stattfindet. Dazu wandert der im Ektoderm befindliche Vorläufer zunächst über die Mesoglea. Nervenzelldifferenzierung findet dagegen im Rumpf und Kopf sowohl im Ektoderm als auch im Endoderm statt. Etwa 10% der interstitiellen Stammzellen dienen als Vorläufer für Nervenzellen. Dazu teilt sich eine solche Zelle zunächst ein weiteres Mal, bevor sie differenziert. Etwa 30% der interstitiellen Zellen werden für die Differenzierung von Nematocyten verwendet, die ausschließlich im Rumpf stattfindet (Tardent, 1987). Dabei teilt sich eine Vorläuferzelle zunächst mehrfach, wobei die entstehenden 4-32 Zellen über zytoplasmatische Brücken weiterhin verbunden bleiben, so dass innerhalb dieser Gruppe an Nematoblasten alle zellulären Prozesse synchron ablaufen (Slautterback and Fawcett, 1958). Schließlich kommt es zu einer terminalen Mitose und zur Differenzierung der Nematocyte, wobei alle Nematoblasten eines Nests den gleichen Kapseltyp entwickeln (Bode, 1996). Desmonemen entstehen dabei meist aus 16-zelligen Nestern, während Isorhizen und Stenothelen vorwiegend aus 8- oder 16-zelligen Nestern entstehen (David and Challoner, 1974). Erst mit vollendeter Differenzierung werden dann die zytoplasmatischen Brücken aufgelöst und die Zellen trennen sich. Etwa 10% der reifen Nematocyten werden in ektodermale Epithelzellen im Rumpf eingelagert. Die verbleibenden 90% der fertigen Nematocyten wandern in die Tentakel, wo sie in die dortigen ektodermalen Epithelzellen eingelagert werden, um zusammen sogenannte Batteriezellen zu bilden. Jede dieser Zellen enthält dabei 1-2 Stenothelen, 2-3 Isorhizen und bis zu 15 Desmonemen (Bode, 1996; David and Gierer, 1974; Slautterback and Fawcett, 1959).

Bei den interstitiellen Stammzellen sowie bei den ektodermalen und endodermalen Epithelzellen handelt es sich demnach um die drei einzigen selbsterneuernde Zelllinien, die für den Zellverlust aufkommen und somit durch dieses Fließgleichgewicht eine bestimmte Größe und Gestalt eines

adulten Polypen gewährleisten. Zellverlust geschieht einerseits durch Abstoßen der Zellen an den beiden Körperpolen. Der meiste Zellverlust, mit 80-85%, kommt jedoch durch Knospung zustande. Diese vegetative Vermehrungsform von *Hydra*, bei der bei Nahrungsüberangebot ein neuer Polyp am Rumpf eines adulten Polypen entsteht, fordert ca. 40.000 Zellen. Dabei fließen Zellen zentripetal vom Muttertier in Richtung Knospe. Otto & Campbell (1977) haben die Entwicklung von Knospen in 10 Stadien klassifiziert (siehe Abb. 1-4).

Zunächst kommt es zur Verdickung des Ektoderms an der Stelle, an der die zukünftige Knospe entstehen wird (Stadium 1 – *Kondensation*). Anschließend bildet das Endoderm einen Peak in das verdickte Ektoderm hinein (Stadium 2 – *Peak*). Es folgt Stadium 3 – *Hügel*: Ekto- und Endoderm der Knospe ragen als kleiner Hügel aus dem Muttertier hervor. Während Stadium 4 - *Schild* gleicht die kontrahierte Knospe einem Schild mit einer Spitze am distalen Ende. Anschließend wird die Knospe proximal schmaler als distal. Wenn sie kontrahiert ist, zeigt sie weiterhin eine Schildform, ausgestreckt wirkt sie wie ein Kolben (Stadium 5 – *Kolben*). Die Knospe beginnt dann mit Tentakelbildung und -wachstum (Stadium 6 – *Rudiment* und Stadium 7 – *Tentakel*). Schließlich kommt es zur Abschnürung der proximalen Region der Knospe unmittelbar neben dem Gewebe des Muttertiers (Stadium 8 – *Konstriktion*) und zur beginnenden Differenzierung der Basalscheibe, wobei Muttertier und Knospe weiterhin noch verbunden bleiben (Stadium 9 – *Basalscheibe*). Im letzten Stadium vollendet die Knospe die Differenzierung der Basalscheibe und liegt dann unabhängig, aber zunächst noch am Muttertier vor (Otto & Campbell, 1977).



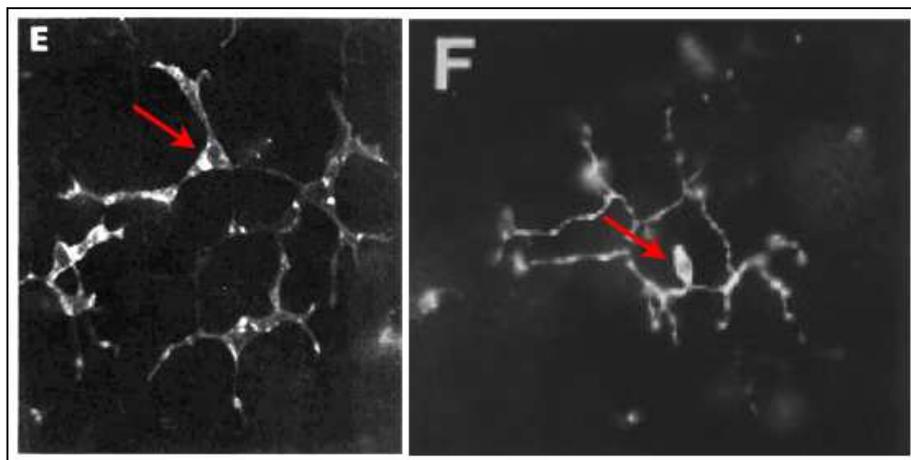
**Abb. 1-4:** Entwicklungsstadien von Knospen. Die Stadiennummern befinden sich unter den jeweiligen Skizzen. c: kontrahiert, e: entspannt, d: ausgestreckt (Otto & Campbell, 1977).

*Hydra* kann sich während kurzer Perioden zudem sexuell vermehren, wobei männliche Keimzellen ins Medium entlassen werden und eine an der Außenseite des Rumpfes befindliche Eizelle eines weiteren Polypen befruchten. Beide Keimzelltypen entstammen der interstitiellen Stammzelllinie (Tardent, 1987).

### 1.1.1 Nervenzelldifferenzierung

*Hydra* besitzt ein Nervennetz mit leichten Nervenzellanhäufungen an Hypostom und Fußscheibe. Nervenzellvorläufer entstehen nach Teilung aus interstitiellen Zellen im Rumpf und wandern dann an den spezifischen Zielort, um dort zu differenzieren (Bode *et al.*, 1990).

Nervenzellen in *Hydra* können in Ganglionzellen und sensorische Zellen unterschieden werden (David, 1973). Während die ersten unregelmäßig geformte Zellkörper und mindestens zwei Neuriten aufweisen (siehe Abb. 1-5 E), haben letztere elongierte, ovale Zellkörper sowie einen sensorischen Kegel auf einer Seite und ein bis zwei Neuriten auf der anderen (siehe Abb. 1-5 F) (Minobe *et al.*, 1995). Bei den Ganglionzellen handelt es sich zudem um die häufigsten Nervenzellen in *Hydra*.



**Abb. 1-5:** Nervenzellen visualisiert durch indirekte FITC-Färbung; (E) Nv4-Nervenzelle; Ganglionzelle im Stiel (Hobmayer *et al.*, 1990); (F) Nv1-Nervenzelle, sensorische Nervenzelle im Tentakel (Minobe *et al.*, 1995); Pfeile: Zellkörper.

Eine weitere Charakterisierung der Nervenzellen erfolgt durch Anwesenheit von spezifischen Neuropeptiden und Antigenen (Grimmelikhuijzen *et al.*, 1982; Hobmayer *et al.*, 1990; Koizumi & Bode, 1986). So sind beispielsweise bisher etwa 40 Neuropeptide von *Hydra* identifiziert worden, die in die vier Gruppen der RF-, LW-, KV- und RG-Amide eingeteilt werden können. Diese Neuropeptide dienen als Signalmoleküle mit exzitatorischen oder inhibitorischen Wirkungen und sind innerhalb der Nervenzellen in neurosekretorischen Vesikeln aufzufinden (Koizumi *et al.*,

1989). Weiterhin sind zum Beispiel Nv1-positive Nervenzellen bekannt. Ein monoklonaler Antikörper gegen dieses Nervenzell-spezifische Nv1-Antigen erkennt dabei Nervenzellen lediglich in den Tentakeln sowie im Stiel (Bereich unterhalb der Knospungsregion bis hin zur Fußscheibe). Bei den Nervenzellen in den Tentakeln handelt es sich dabei um sensorische Zellen, am Stiel dagegen um Ganglionzellen (Hobmayer *et al.*, 1990).

Die so klassifizierten Nervenzellen nehmen spezifische Positionen in *Hydra* ein. Die Entscheidung darüber, zu welchem Nervenzelltyp ein Vorläufer differenziert, wird durch lokale Signale getroffen. Durch reguläre Gewebebewegungen werden Nervenzellen dann in andere Positionen verschoben, wobei es dabei zu einer phenotypischen Konversion in andere Nervenzelltypen kommt, bestimmt durch das Zielgewebe (Koizumi & Bode, 1986).

### **1.1.2 Nematocytyendifferenzierung**

Wie bereits zuvor erwähnt, entstammen Nematocyten den interstitiellen Stammzellen. Dabei durchlaufen diese mehrere synchrone Zellteilungen, wobei man bei den resultierenden Zellen ab dem 4-zelligen Nest von Nematoblasten spricht. Es kommt schließlich zu einer terminalen Mitose und zur Differenzierung der Nematoblasten zu einem spezifischen Nematocytyentyp mit spezifischer Nematocyste. Die Kapseln erleben dabei während ihrer Entwicklung 5 Stadien. Es beginnt mit einer frühen Wachstumsphase, bei der ein Kapselvorläufer innerhalb eines vom Golgi abgeschnürten Vesikels gebildet wird und durch Fusion mit weiteren Vesikeln wächst. In einer späten Wachstumsphase kommt es zur Entstehung des Schlauchs außerhalb der Kapsel durch weitere Anfügung von Vesikeln, wobei Schlauch und Kapsel bereits verbunden werden. Dieser externe

Schlauch wird in der nächsten Phase in die Kapsel eingestülpt, man spricht von Invagination. Innerhalb dieses invaginierten Schlauches werden in der frühen Reifungsphase dornenförmige Strukturen ausgebildet, während der späten und finalen Reifungsphase kommt es schließlich zur Aushärtung der Kapselwand, bei der ein osmotischer Druck von 150 bar aufgebaut wird (Engel *et al.*, 2002). Dieser hohe Innendruck kommt durch Polymerisation von Poly- $\gamma$ -Glutamat in der Kapselmatrix zustande (Weber, 1990; Szczepanek *et al.*, 2002). Zudem bilden Minicollagene, eine Familie von sehr kurzen Kollagenen, an der Kapselinnenwand ein unlösliches Polymer durch Umlagerung von Disulfidbrücken (Engel *et al.*, 2001; Kurz *et al.*, 1991; Holstein *et al.*, 1994). In der Außenwand befindet sich das Protein Nowa (*Nematocyst outer wall antigen*), das ebenfalls durch Disulfidbrücken vernetzt vorliegt. Diese stabilen Verbindungen ermöglichen die hochfeste Struktur der Kapselwand, so dass die Nematozyste nach Stimulation des Cnidocils explosionsartig, in weniger als 3 Millisekunden mit einer maximalen Beschleunigung von 40.000g entladen werden kann (Engel *et al.*, 2002; Holstein and Tardent, 1984).

### ***Spezifische Proteine der Nematocytenzelllinie***

Einige Proteine, die in Nematocyten und Nematoblasten exprimiert werden, sind bereits identifiziert worden.

So ist zum Beispiel das bereits zuvor erwähnte Nowa durch Immunfluoreszenzfärbungen mit Hilfe des Nowa-spezifischen Antikörpers näher untersucht worden. Es konnte gezeigt werden, dass die äußere Kapselwand aus globulären Strukturen besteht, die über die gesamte Oberfläche aller Nematozystentypen gleichmäßig verteilt sind. Auch die Oberfläche des externen Schlauchs wird bei einer solchen Immunfluoreszenzanalyse

gefärbt. Zudem konnte die Anwesenheit des Proteins bereits vor der terminalen Mitose der Nematoblasten bis hin zur reifen Kapsel in den Tentakeln nachgewiesen werden (Engel *et al.*, 2001). Durch *in situ*-Hybridisierungsexperimente konnte außerdem gezeigt werden, dass es lediglich in Nematoblasten und differenzierenden Nematocyten zu Genexpression kommt. Es konnte keine mRNA in reifen Nematocyten nachgewiesen werden (Engel *et al.*, 2002).

Der Schlauch der Nematozyste ist mit dornenförmigen Strukturen besetzt. Diese bestehen aus dem Protein Spinalin, das zudem auch in den großen Dornen der Stenothelen, den sogenannten Styletten, und im Kapseldeckel enthalten ist. Durch Immunfluoreszenzfärbungen konnte Spinalin in differenzierenden Nematocyten nachgewiesen werden. Es liegt dabei homogen in der Kapselmatrix, im Schlauch und am apikalen Ende zur Bildung des Deckels vor. Bei weiterer Nematozystenreifung verschwindet diese Färbung auf Grund der Kondensation des Spinalins und der Aushärtung der Kapselwand, so dass diese Struktur unter anderem für Antikörper impermeabel wird (Koch *et al.*, 1998).

Die Expression von *Cnash* (*Cnidarian Achaete-Scute Homologe*), das für ein basisches Helix-loop-Helix (bHLH)-Protein kodiert (siehe Abschnitt 1.2.3), wurde mit Hilfe von *in situ*-Hybridisierungsexperimenten an ganzen Tieren in Nematoblasten-Nestern (v.a. 8-16 Zellen) nachgewiesen. Zusätzlich dazu wurde es in sensorischen Nervenzellen im Ektoderm der Tentakel detektiert. Weder in Nervenzellen in anderen Bereichen des Tieres, noch in einzelnen oder doppelten interstitiellen Stammzellen und reifen Nematocyten konnte *Cnash*-Expression gezeigt werden (Hayakawa *et al.*, 2004).

Kontroverse Befunde lieferten allerdings *in situ*-Hybridisierungsexperimente an Mazeraten. Diese zeigten zwar entspre-

chend der Ergebnisse am ganzen Tier eine deutliche Expression in Nematoblasten, zusätzlich wurde *Cnash* aber in 25-30% der doppelten und in 10-15% der einzelnen interstitiellen Zellen nachgewiesen. Expression in Nervenzellen konnte nicht gezeigt werden (Grens *et al.*, 1995).

Deutlichere Ergebnisse wurden mit dem *Hydra* Zic-Homolog *Hyzic* erzielt. Dieses Gen exprimiert ein Protein mit einer konservierten Zinkfinger-Domänen-Struktur mit seinen fünf C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>-Zinkfingern (siehe Abschnitt 1.3). *In situ*-Hybridisierungen an ganzen Tieren konnten hier Expression in einzelnen und doppelten interstitiellen Zellen sowie in Nematoblasten-Nestern von 4 bis 16 Zellen (v.a. 4 oder 8 Zellen) zeigen. Eine Co-Expression von *Hyzic* mit *Cnash* oder *Nowa* wurde nicht nachgewiesen. Mit Hilfe von BrdU-Markierungsversuchen, die sich teilende Zellen aufzeigen, konnte bewiesen werden, dass *Hyzic* in frühen, proliferierenden Nematoblasten exprimiert wird, gefolgt von *Cnash* und schließlich *Nowa* in nicht-proliferierenden Zellclustern. Es wird in Folge dieser Versuche vermutet, dass HyZic interstitielle Zellen in den Nematocytyendifferenzierungsweg lenkt (Lindgens *et al.*, 2004).

## 1.2 Der Notch-Signaltransduktionsweg

In Metazoen gibt es etwa 20 verschiedene Signalwege, die die hohe Diversität an Zelltypen, Mustern und Geweben gewährleisten. Während der Entwicklung von tierischen Organismen sorgen sieben dieser Signaltransduktionswege für die meisten Zellkommunikationsvorgänge: Wnt-, TGF- $\beta$  (*transforming growth factor  $\beta$* )-, Hedgehog-, Rezeptor-Tyrosin-Kinase (RTK)-, Jak/STAT-, *nuclear hormone receptor*- und Notch-Signalwege. Dabei kommt es zur Ausbildung von Polarität und Körperachsen sowie zur Koordination von Musterbildung und Morphogenese. Dies

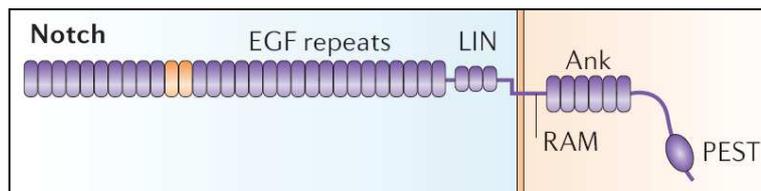
geschieht meist durch Transkriptionsregulation spezifischer Zielgene durch Signal-spezifische Transkriptionsfaktoren (Pires-daSilva & Sommer, 2003).

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit dem Notch-Signaltransduktionsweg. Dieser direkte, parakrine Signalweg ist an der Kontrolle der Zellidentität, Proliferation, Differenzierung und Apoptose beteiligt (Gazave *et al.*, 2009). Entdeckt wurde dieser Kommunikationsweg 1914 in Folge einer Mutation im *Notch*-Gen von *Drosophila melanogaster*, die sich durch Einkerbungen am Flügel äußert (Mohr, 1919). Weitere klassische genetische Analysen an „*loss-of-function*“-Mutationen von *Notch* und anderen Mitspielern des Notch-Signalwegs durch Poulson konnten erstmals den neurogenen Phänotypen aufzeigen, bei dem Zellen, die ursprünglich eine epidermale Bestimmung hatten, stattdessen neuronales Gewebe ausbilden (Poulson, 1937). Im Folgenden wird der kanonische Notch-Signalweg im Detail betrachtet.

### **1.2.1 Der kanonische Notch-Signaltransduktionsweg**

Im Allgemeinen kommt es beim kanonischen Notch-Signalweg zum direkten Kontakt zwischen zwei Zellen. Dabei interagiert ein membranständiger Ligand auf der das Signal sendenden Zelle mit dem membranständigen Notch-Rezeptor auf der benachbarten das Signal empfangenden Zelle. Der Notch-Rezeptor besitzt eine extrazelluläre Domäne mit bis zu 36 EGF- und 3 LNR-(*Lin-12 Notch Repeat*)-Wiederholungen, sowie eine intrazelluläre Domäne NICD (*Notch intracellular domain*) mit einer RAM23-Domäne, 6-7 Ankyrin-Wiederholungen, einer NLS-Sequenz und einer PEST-Region (Fleming, 1998). Bereits während des regulären Sekretionsprozesses wird das Notch-Protein im trans-Golgi durch die Furin-Convertase geschnitten, wobei das Fragment, das die EGF- und LNR-Wiederholungen enthält, ei-

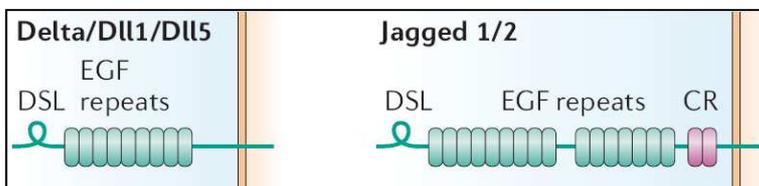
nen nicht-kovalenten, stabilen Komplex mit dem restlichen Protein ausgebildet, so dass Notch letztendlich als Heterodimer an der Zelloberfläche vorliegt (Gordon *et al.*, 2007; Logeat *et al.*, 1998; Nichols *et al.*, 2007) (siehe Abb. 1-6 und Abb. 1-8). *Drosophila* besitzt lediglich ein *Notch*-Gene, während Säugetiere vier (*Notch1-4*) und *C.elegans* zwei Homologe (*Lin-12*, *Glp-1*) aufweisen.



**Abb. 1-6:** Reifer Notch-Rezeptor; Extrazelluläre Domäne mit EGF-Wiederholungen („EGF repeats“) und LNR-Wiederholungen („LIN“); Intrazelluläre Domäne mit RAM23-Domäne, Ankyrin-Wiederholungen („Ank“) und PEST-Region (Bray, 2006).

Auch der Notch-Ligand ist in unterschiedlichen Zahlen vorhanden. *Drosophila* besitzt ein *Delta*- sowie ein *Serrate*-Gen. Säugetiere weisen dagegen 3 *Delta*- (*Delta1, 3, 4*) sowie 2 *Jagged*-Gene (*Jagged 1, 2*) auf, wobei letztere homolog zu *Serrate* sind. *C.elegans* besitzt zwei *Delta*-Homologe, *Apx-1* und *Lag-2* (Lissemore & Starmer, 1999). Beide Ligandentypen zeichnen sich durch eine Cystein-reiche DSL (*Delta*, *Serrate*, *Lag-2*)-Domäne aus, die die Interaktion mit den EGF-Wiederholungen im Notch-Rezeptor vermittelt (Fehon *et al.*, 1990; Fleming, 1998; Rebay *et al.*, 1991). An die DSL-Domäne anschließend weisen auch Notch-Liganden zahlreiche EGF-Wiederholungen in ihrer extrazellulären Domäne auf. Zwischen diesen Domänen sowie der Transmembrandomäne besitzen Jagged und Serrate außerdem eine weitere Cystein-reiche Sequenz, die sogenannte von Willebrand Typ C (VWC)-Domäne. Die intrazellulären

Domänen von Jagged und Delta sind nicht konserviert und variabel in der Länge (Fleming, 1998) (siehe Abb. 1-7).



**Abb. 1-7:** Notch-Liganden; Extrazelluläre Domäne mit DSL-Domäne („DSL“), EGF-Wiederholungen („EGF repeats“); Delta und Serrate/Jagged unterscheiden sich durch die zusätzliche Cystein-reiche WWC-Domäne bei Serrate/Jagged („CR“) (Bray, 2006).

In *C.elegans* kommen zudem nicht kanonische Liganden vor. Dieser Organismus besitzt neben seinen kanonischen Liganden LAG-2 und APX-1 natürliche sezernierte Notch-Liganden (DSL-1-7 und ARG-1), wobei bisher lediglich die Funktionalität von DSL-1 bei der Aktivierung des Notch-Rezeptors bewiesen wurde. Alle weisen jedoch EGF-Wiederholungen sowie die charakteristische DSL-Domäne auf (Chen & Greenwald, 2004).

Infolge der Interaktion des Liganden mit dem Notch-Rezeptor kommt es zu einem ersten proteolytischen Schnitt durch die membranständige Protease ADAM17/TACE (*a disintegrin and metallopeptidase / tumor-necrosis factor  $\alpha$ -converting enzyme*) an der S2-Schnittstelle im extrazellulären Bereich N-terminal der Transmembrandomäne (Mumm *et al.*, 2000; Nichols *et al.*, 2007). Diese Proteolyse ist Grundvoraussetzung dafür, dass das resultierende weiterhin Membran-gebundene Fragment anschließend innerhalb der Transmembrandomäne an der S3-Stelle durch die  $\gamma$ -Sekretase geschnitten werden kann (Mumm *et al.*, 2000; Song *et al.*, 1999; Struhl & Greenwald, 1999; De Strooper *et al.*, 1999). Dieser Enzymkomplex, be-

stehend aus Presenilin als katalytischer Einheit, Nicastrin, APH1 und PEN2 (Wolfe, 2006), setzt durch seine proteolytische Aktivität die Notch intrazelluläre Domäne NICD frei, so dass dieses Fragment aus dem Zytoplasma in den Nukleus transloziert werden kann (Kopan *et al.*, 1996; Schroeter *et al.*, 1998). Dort kommt es zur Interaktion von NICD mit dem DNA-bindenden Protein CSL (CBF1 in Säugetieren, Su(H) in *Drosophila*, Lag-1 in *C.elegans*), wobei ein Korepressor-Komplex durch einen Koaktivator-Komplex ersetzt wird, so dass schließlich die Transkription spezifischer Zielgene aktiviert wird (Fortini & Artavanis-Tsakonas, 1994; Jarriault *et al.*, 1995). Bei den *hairy* / *Enhancer of split* (HES) – Zielgenen handelt es sich um die wohl bekanntesten (Bailey & Posakony, 1995; Kageyama & Nakanishi, 1997). Diese sind basische *Helix-loop-Helix* (bHLH) Proteine, die wiederum selbst als Transkriptionsrepressoren wirken (siehe Abschnitt 1.2.3 und Abb. 1-8).

### **1.2.2 Regulationsmöglichkeiten von Notch-Signaltransduktion**

Die endogene intrazelluläre Domäne von Notch NICD ist mittels Immunfluoreszenzfärbungen nicht detektierbar (Schroeter *et al.*, 1998). Dies verdeutlicht einerseits, dass NICD bereits in geringen Konzentrationen als Transkriptionsaktivator wirkt, andererseits wird die schnelle Regulation des Notch-Signalwegs aufgezeigt. Endogenes NICD wird rasch durch CDK8 phosphoryliert, durch Sel-10 ubiquitinyliert und degradiert (Fryer *et al.*, 2004).

Die weitere Regulation kommt durch die Ubiquitinligasen Deltex und Nedd4/Itch/Su(dx) zustande. Beide Proteine ubiquitinylieren Notch, so dass der Rezeptor internalisiert wird. Doch während Deltex positiv auf das Notch-Signalling wirkt (Matsuno *et al.*, 1995), bewirkt Nedd4 die Inaktivie-

rung von Notch durch Lokalisation und Abbau in Lysosomen (Sakata *et al.*, 2004). Bei dem Membran-assoziierten Protein Numb handelt es sich zudem um einen weiteren negativen Regulator von Notch, der zu Endocytose und Abbau des Rezeptors führt (Berdnik *et al.*, 2002).

Durch diese diversen, mit Notch interagierenden Proteine werden die Mengen des beständig an der Zelloberfläche vorhandenen Notch-Rezeptors und damit auch die Notch-Signalübertragungsereignisse reguliert. So ist erklärbar, weshalb wider den Erwartungen ein großer Anteil des Notch-Rezeptors im Zytoplasma innerhalb endozytotischer Vesikel aufzufinden ist.

Bereits während des Sekretionsprozesses interagiert der Notch-Rezeptor zudem mit regulatorischen Proteinen. Die EGF-Wiederholungen sind bekannte Glykosylierungsstellen (Haines & Irvine, 2003), die zunächst von der O-Fucosyltransferase1 (O-Fut1) modifiziert werden. Dieses Enzym, das Fucose an Serin oder Threonin anfügt, ist für die Erzeugung eines funktionellen Rezeptors notwendig (Okajima & Irvine, 2002; Shi & Stanley, 2003). Neben seiner enzymatischen Aktivität als O-Fucosyltransferase fungiert O-Fut1 als Chaperon, um die korrekte Faltung und den Transport von Notch vom endoplasmatischen Reticulum zur Plasmamembran zu gewährleisten (Okajima *et al.*, 2005). Fucosylierte EGF-Wiederholungen können anschließend von weiteren Glykosyltransferasen wie der  $\beta$ -1,3-N-Acetylglucosaminyltransferase Fringe, die im Golgi agiert, modifiziert werden (Brückner *et al.*, 2000; Haines & Irvine, 2003). *Drosophila* hat ein *Fringe*-Gen, während Vertebraten drei Homologe – *Radical*, *Manic* und *Lunatic Fringe*, und *C.elegans* kein solches Gen aufweisen (Okajima & Irvine, 2002). Durch die durch O-Fut1- und Fringe-Aktivitäten entstehenden diversen Glykosylierungsmuster können die Affinitäten von Liganden für den Notch-Rezeptor und die damit verbundene Aktivierung modifiziert werden (Sakamoto *et al.*, 2002). Während Lunatic Fringe im Hühnchen

beispielsweise einen inhibitorischen Effekt auf Delta-abhängige Notch-Signaltransduktion hat (Dale *et al.*, 2003), kommt es in dorsalen Zellen des *Drosophila* Flügels zu einer Affinitätssteigerung von Delta für Notch-Rezeptoren, die zuvor durch Fringe glykosyliert wurden (Haines & Irvine, 2003). Dagegen zeigt *Drosophila* Serrate eine erhöhte Affinität zu fucosylierten und eine verminderte Affinität zu durch Fringe weiter modifizierte Notch-Rezeptoren (Okajima *et al.*, 2003) (siehe Abb. 1-8).

Auch Notch-Liganden werden auf verschiedene Weisen reguliert. So ist zum Einen bekannt, dass Liganden ebenfalls proteolytisch durch ADAM und anschließend durch  $\gamma$ -Sekretase gespalten werden. Dadurch entsteht ein intrazelluläres Fragment, das sowohl in der zytoplasmatischen als auch in der nukleären Zellfraktion aufgefunden werden kann (Six *et al.*, 2003). Es ist demnach möglich, dass dieses Fragment ebenfalls eine eigene Transkriptions-beeinflussende Rolle spielt.

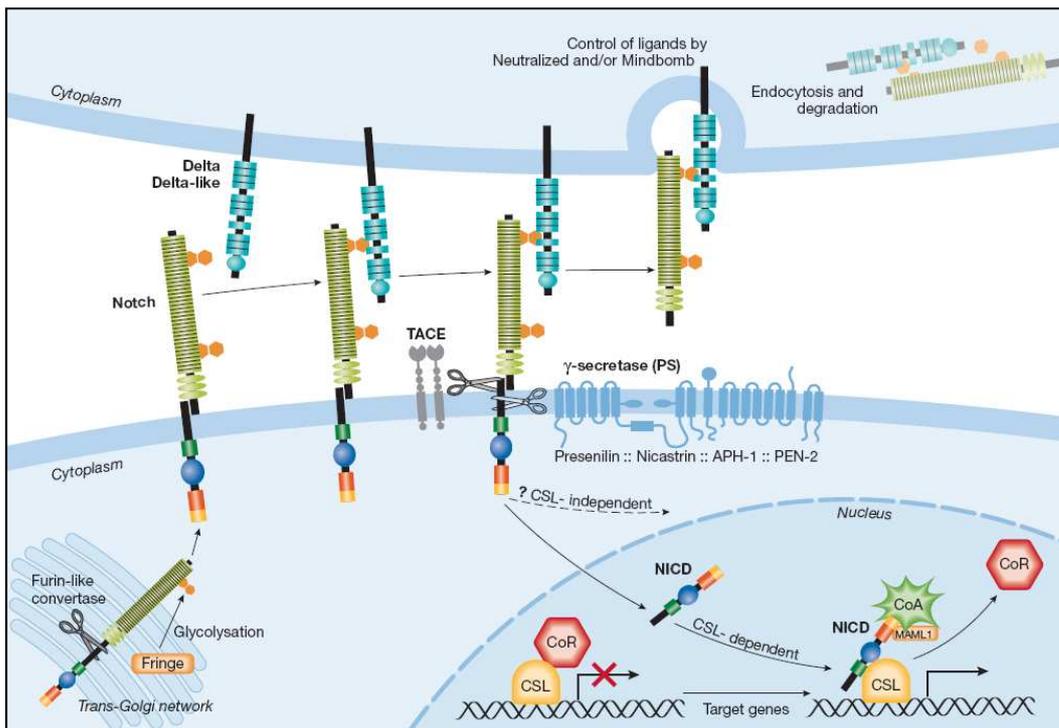
Liganden sind zudem, genauso wie Notch-Rezeptoren, Ziel für Modifikationen durch E3-Ubiquitinligasen. Die beiden Enzyme Neuralized und Mindbomb interagieren direkt mit Liganden und sind sogar erforderlich für die Liganden abhängige Aktivierung von Notch (Chitnis, 2006). Sowohl Neuralized als auch Mindbomb besitzen RING-Domänen, sind aber ansonsten strukturell unterschiedlich (Le Borgne *et al.*, 2005). Während Neuralized zusätzlich einzigartige Neuralized-Domänen aufweist, besitzt Mindbomb HERC2/MIB-, ZZ Zinkfinger-, MIB- und Ankyrin-Domänen. Beide E3-Ubiquitinligasen führen jedoch dieselbe Funktion aus, indem sie Liganden ubiquitinylieren, die dann anschließend endozytiert werden. Dies geschieht mit Hilfe des Adaptorproteins Epsin, das monoubiquitinylierte Zelloberflächenproteine mit der Endozytosemaschinerie verbindet (Wendland, 2002). Diese Epsin-abhängige Endozytose stellt nur einen Bruchteil

der endozytotischen Ereignisse zur Internalisierung von DSL-Proteinen dar, ist jedoch entscheidend für die Aktivierung von Notch (Wang & Struhl, 2004).

Es gibt Beweise für die Notwendigkeit von Ligandenendozytose für die Dissoziation der extrazellulären Domäne von Notch. Deshalb wird vermutet, dass die Endozytose von DSL-Proteinen einen Zug auf einen gebundenen Notch-Rezeptor ausübt, der wiederum eine Konformationsänderung der extrazellulären Domäne von Notch zur Folge hat (Parks *et al.*, 2000). Durch diese Bewegung könnte die zuvor maskierte S2-Schnittstelle freigelegt und für ADAM zugänglich gemacht werden (Gordon *et al.*, 2007). Die geschnittene Ektodomäne wird wiederum durch die Ligandenzelle aufgenommen - man spricht von Transendozytose - während NICD nach Freisetzung durch die  $\gamma$ -Sekretase in den Zellkern der Rezeptorzelle gelangt. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Bindung von DSL-Liganden an Notch allein nicht ausreichend für die Signaltransduktion ist. Auch die Ligandenendozytose sowie die Dissoziation des Rezeptors sind erforderlich (Nichols *et al.*, 2007). Unterstützt wird dies durch die Beobachtung, dass lösliche Liganden in Clustern vorliegen oder sogar immobilisiert werden müssen, um eine Notch-Aktivierung hervorzurufen (Wang *et al.*, 1998; Varnum-Finney *et al.*, 2000). So ist es denkbar, dass *C.elegans* einen noch unbekanntem Adaptor aufweist, der die natürlichen, löslichen Liganden stabil an die Membran bindet, um damit die notwendige Zugkraft aufbringen zu können (Gordon *et al.*, 2007) (siehe Abb. 1-8).

Weiterhin wird vermutet, dass Liganden im Vorlauf an die Endozytose in „coated pits“ rekrutiert und damit lokal in einer erhöhten Anzahl an der Zelloberfläche vorliegen (Le Borgne & Schweisguth, 2003). Auch eine post-translationale Modifikation innerhalb des endozytotischen Kompartiments und eine Aktivierung eines inaktiven Pro-Liganden, sowie die Rückführung an spezifische Stellen in der Plasmamembran sind denkbar. Zu-

dem besteht die Möglichkeit, dass sich Liganden durch den Recycling-Prozess der gebundenen Notch-Ektodomäne entledigen und bereit für eine neue Bindung an der Zelloberfläche erscheinen (Wang & Struhl, 2004).



**Abb. 1-8:** Notch-Signaltransduktion; Notch-Rezeptor wird als einzelner Vorläufer synthetisiert und im Golgi durch Furin-Convertase während dem Transport zur Zelloberfläche geschnitten. Dort liegt er als Heterodimer vor. Fringe-Glycosyltransferase modifiziert EGF-Wiederholungen im Golgi. Notch-Signaltransduktion wird durch Ligand-Rezeptor-Interaktion initiiert, wobei es zu zwei aufeinanderfolgende proteolytische Schnitte kommt. Der erste geschieht durch die Metalloprotease TACE (*tumor-necrosis factor  $\alpha$ -converting enzyme*). Das entstehende extrazelluläre Fragment wird durch die Ligand exprimierende Zelle transendozytiert, wobei dieser Prozess durch Neuralized und/oder Mindbomb E3-Ubiquitinligasen kontrolliert wird. Der zweite proteolytische Schnitt von Notch geschieht innerhalb der Transmembrandomäne durch  $\gamma$ -Sekretase (bestehend aus Presenilin, Nicastrin, APH-1 und PEN-2). Die freigesetzte intrazelluläre Domäne NICD gelangt in den Zellkern und bindet an den Transkriptionsfaktor CSL (C<sub>BF</sub>1, S<sub>u</sub>(H), L<sub>AG</sub>). Diese Interaktion führt zur Transkriptionsaktivierung durch Verdrängung des Korepressors (CoR) und Rekrutierung von Koaktivatoren (CoA) (Radtke *et al.*, 2005).

### 1.2.3 Proneurale Proteine und Notch-Signaltransduktion

Mitglieder der basischen *Helix-loop-Helix*-(bHLH)-Familie von Transkriptionsfaktoren spielen eine Schlüsselrolle bei einer Vielzahl von Entwicklungsprozessen in Metazoen. Die bHLH-Domäne mit ihren ca. 60 Aminosäuren wird in eine basische Domäne, die für die DNA-Bindung zuständig ist, und eine *Helix-loop-Helix*-Domäne unterteilt, wobei letztere mit ihren beiden  $\alpha$ -Helices und der variablen *Loop*-Region für die Ausbildung von Homo- oder Heterodimeren verantwortlich ist. Ein solcher Komplex ist dann in der Lage, spezifische Hexanukleotid-Sequenzen zu binden. Die bHLH-Proteine können in sechs Gruppen eingeteilt werden: Gruppe A und B binden eine spezifische Hexanukleotid-Sequenz, die sogenannte E-Box (CANNTG), wobei Gruppe A an CACCTG oder CAGCTG bindet, Gruppe B dagegen an CACGTG oder CATGTG. Die Gruppe C-Proteine enthalten neben der bHLH-Domäne eine zusätzliche PAS-Domäne, den Proteinen der Gruppe D fehlt die basische Domäne, so dass eine DNA-Bindung nicht möglich ist. Gruppe E-Proteine sind mit den *Drosophila* „Hairy/Enhancer of Split“-Proteinen verwandt und binden vorzugsweise an sogenannte N-Boxen mit der Hexanukleotid-Sequenz CACGCG oder CACGAG. Gruppe F-Proteine enthalten schließlich ebenfalls eine zusätzliche Domäne, die COE-Domäne (Ledent *et al.*, 2002).

Basische *Helix-loop-Helix* Proteine sind sowohl in Metazoen als auch in Fungi und Pflanzen vorhanden, in Prokaryoten treten keine solchen Proteine auf. Die Zahlen variieren allerdings stark: während *C.elegans* lediglich 39 verschiedene bHLH-Proteine besitzt, hat *Drosophila* 58, der Mensch 125, *Arabidopsis thaliana* mehr als 100 (Ledent *et al.*, 2002).

Sehr gut studierte bHLH-Proteine sind die im Achaete-Scute-Komplex (AS-C) kodierten Proteine Achaete, Scute, Lethal of Scute und Asense. Diese sind bekannte Regulatoren der Neurogenese in *Drosophila*. Wäh-

rend Asense in bereits determinierten neuronalen Zellen exprimiert wird (Alonso & Cabrera, 1988), erlauben Achaete, Scute und Lethal of Scute die Entstehung von neuronalem Gewebe innerhalb einer Gruppe gleichartiger undeterminierter Zellen und hemmen dies wiederum in Nachbarzellen. Wegen dieser Eigenschaften werden letztere als proneurale Proteine bezeichnet, die in proneuralen Zellclustern exprimiert werden (Murre *et al.*, 1989). Auch strukturell verwandte bHLH-Proteine von *Drosophila* und anderer Organismen, die die neuronale Entwicklung fördern, werden nun als proneurale Proteine bezeichnet. Sie regulieren die Expression von Genen, die für das neurale Schicksal letztendlich verantwortlich sind (Villares & Cabrera, 1987).

Innerhalb des proneuralen Zellclusters wird eine zukünftige neurale Zelle ausgewählt und ein neurales Schicksal in den Nachbarzellen inhibiert. Dies geschieht mit Hilfe der Notch-Signaltransduktion. Ursprünglich exprimieren alle AS-C-Zellen sowohl den Notch-Rezeptor als auch den Liganden Delta (Kooch *et al.*, 1993). Durch Interaktion des Rezeptors mit dem Liganden kommt es zur Notch-Aktivierung und in Folge dessen zur Expression der Gene des *Enhancer of split* [E(spl)]-Komplexes, die wiederum bHLH-Proteine kodieren. Diese wirken als direkte Repressoren für Gene des Achaete-Scute-Komplexes (Schweisguth & Posakony, 1994). AS-C-Proteine ihrerseits sind aktivierende bHLH-Proteine, die die Delta-Expression fördern (Kunisch *et al.*, 1994). So kommt es letztendlich in Notch-Rezeptor- und Liganden-Zellen zu einem „*feedback loop*“, der die Delta-Expression reprimiert bzw. aktiviert. Die spätere neurale Zelle trägt schließlich den Liganden, in der Notch-Rezeptor-Zelle wird dagegen das neurale Schicksal verhindert, so dass diese Zelle das epidermale Schicksal annimmt. Ausgangspunkt für die initiale Notch-Signaltransduktion sind vermutlich minimale Unterschiede in den Achaete-Scute-Mengen, die zu variablen Proteinmengen von Delta und Notch führen (Cubas *et al.*, 1991).

Auch Regulation durch zusätzliche Faktoren ist denkbar. So ist beispielsweise die essentielle Wirkung des Zinkfinger-Transkriptionsfaktors „Senseless“ in *Drosophila* beschrieben, der die Differenzierung zu neuronalen Vorläuferzellen durch synergistische Interaktion mit proneuralen Proteinen erlaubt (Nolo *et al.*, 2000).

#### **1.2.4 Modalitäten und Funktionen von Notch-Signaltransduktion**

Die Funktionen der Notch-Signaltransduktion können in drei Hauptmodalitäten klassifiziert werden: Laterale Inhibition, Zelllinien-Entscheidungen und Grenzbildung/induktive Mechanismen. Im Folgenden werden diese an ausgewählten Beispielen erläutert.

##### ***Laterale Inhibition***

Bei der lateralen Inhibition kommt es zu binären Schicksalsentscheidungen innerhalb einer Population von gleichwertigen Zellen. Die Notch-Signaltransduktion kann dabei kleine Unterschiede innerhalb dieser Population durch „*feedback*“-Mechanismen amplifizieren, die sowohl die Expression von Rezeptor als auch von Ligand beeinflussen.

Ein bereits erforschtes Beispiel betrifft die AC/VU-Entscheidung in den hermaphroditen Gonaden von *C.elegans*. Die beiden Zellen Z1.ppp und Z4.aaa sind anfangs äquivalent, doch nur eine wird zur „*anchor cell*“ (AC), die andere zum „*ventral uterine*“ (VU)-Vorläufer (Kimble, 1981; Seydoux & Greenwald, 1989). Die Entscheidung wird durch den Notch-Rezeptor LIN-12 und den Liganden LAG-2 vermittelt, wobei beide Proteine anfänglich innerhalb Z1.ppp und Z4.aaa gleichermaßen exprimiert werden. Sto-

chastische Variationen zwischen den Aktivitäten werden dann aber durch „*feedback*“-Mechanismen in beiden Zellen amplifiziert, so dass die Expressionsmuster sich reziprok verhalten. Die Aktivierung von LIN-12 bestimmt das VU-Schicksal, in diesen Zellen wird die *Lin-12*-Expression gefördert, die *Lag-2*-Expression reprimiert. Letztere ist dagegen auf die mutmaßliche AC beschränkt (Greenwald *et al.*, 1983).

Ein weiteres Beispiel betrifft die Entwicklung von Vorläuferzellen des sensorischen Organs („*sensory organ precursors*“ – SOP) in *Drosophila*, die die späteren Borsten des Notum hervorbringen.

Während der Entwicklung des peripheren Nervensystems in *Drosophila* interagiert ein Cluster äquivalenter proneuraler Zellen durch Notch-Signaltransduktion. Dabei wird eine Zelle zur SOP-Zelle, aus der Neurone und akzessorische Zellen hervorgehen, während die anderen Zellen innerhalb des Clusters zu Epidermis differenzieren. Die Signal sendende, DSL-Ligand tragende Zelle bringt stets die SOP-Zelle hervor, die Notch-Signal empfangende Zelle entwickelt Epidermis (Heitzler & Simpson, 1991). Dies geschieht durch negative Regulation proneuraler Gene in Folge der Notch-Aktivierung in der späteren epidermalen Zelle, sowie der positiven Regulation dieser Gene und des Notch-Liganden in der späteren SOP-Zelle (siehe Abschnitt 1.2.3).

### **Zelllinien-Entscheidungen**

Die Zelllinien-Entscheidung zwischen zwei Tochterzellen basiert auf der asymmetrischen Verteilung von regulatorischen Proteinen zum Beispiel von Numb in der SOP-Zelle von *Drosophila*.

Die SOP-Zelle bringt zwei Tochterzellen hervor, wobei aus der einen eine Haar- und eine Sockelzellen entstehen, aus der anderen entstehen Neuron und Scheidenzelle (Hartenstein & Posakony, 1989). Diese Zelllinien-Entscheidungen kommen jeweils durch Notch-Signaltransduktion zustande, wobei auch der Notch-Repressor Numb jeweils eine Rolle spielt. Er wird stets neu synthetisiert, asymmetrisch verteilt und damit in nur eine Tochterzelle weitergegeben. Dadurch vermindert sich die Notch-Aktivität in diesem Nachkommen (Rhyu *et al.*, 1994).

### ***Induktive Mechanismen***

Induktive Mechanismen führen nach Signalgebung zwischen benachbarten, unterschiedlichen Zellpopulationen zur Aneignung eines dritten Zellschicksals, so dass eine Grenze entsteht. Dies ist z.B. bei der Flügelanlage von *Drosophila* der Fall.

Wichtig für die Ausbildung einer Grenze zwischen dorsalen und ventralen Zellen des Flügels in *Drosophila* ist die Tatsache, dass in Anwesenheit von Fringe die Bindung von Notch an Delta bevorzugt wird gegenüber der an Serrate.

In der frühen Flügelentwicklung werden Serrate und Fringe in allen Zellen des dorsalen Kompartiments unter Kontrolle des „apterous“-Proteins exprimiert, während Delta ventral exprimiert wird. Ventrale Zellen können auf die Bindung von Serrate an den dorsalen Zellen reagieren, während dorsale Zellen durch Anwesenheit von Fringe lediglich auf Delta reagieren, das auf benachbarten ventralen Zellen exprimiert wird (Diaz-Benjumea & Cohen, 1995). Die auf dorsale Zellen limitierte Fringe-Expression ist demnach ausschlaggebend für die Notch-Aktivierung in einem dünnen Streifen zwischen dorsalen und ventralen Zellen (Panin *et al.*, 1997). Notch bewirkt

dann die Expression von *Wingless*, das wiederum *Serrate*- und *Delta*-Expression außerhalb der dorso-ventralen Grenze fördert. Dort kommt es zudem zu einem inhibitorischen Effekt: ein hohes Liganden-Niveau verhindert die Notch-Signaltransduktion in diesen Zellen, möglicherweise durch intrazelluläre Ligand-Notch- oder interzelluläre Ligand-Ligand-Interaktionen, so dass Liganden bzw. Rezeptor nicht mehr für weitere Signaltransduktionen verfügbar sind (de Celis & Bray, 1997; Fehon *et al.*, 1990; Parks *et al.*, 2000; Sakamoto *et al.*, 2002). Alles zusammen bewirkt eine lokale Begrenzung der Notch-Aktivierung auf die dorso-ventrale Grenze und damit eine Lokalisation des „Wingless“. Dieses wird zusammen mit dem dorsalen „apterous“ benötigt, um die Expression von „vestigial“, dem ersten Marker für die Flügelgrenze, voranzutreiben (Doherty *et al.*, 1996) (siehe Abb. 1-9).



### 1.2.5 Der Notch-Signaltransduktionsweg in *Hydra*

Der Notch-Signaltransduktionsweg ist unter den Metazoen stark konserviert (Gazave *et al.*, 2009). So konnte auch in *Hydra* bereits die Existenz dieses Signalweges nachgewiesen werden (Käsbauer *et al.*, 2007). Dieser Organismus weist einen perfekten Notch-Rezeptor HvNotch mit 6 EGF- und 3 LNR-Wiederholungen in seiner extrazellulären Domäne, sowie einer RAM23-Domäne, 6 Ankyrin-Wiederholungen und einer PEST-Region in der intrazellulären Domäne auf. Auch der Transkriptionsfaktor HvSu(H), das Zielgen *HyHes* und der Notch-Repressor HvNumb konnten bereits nachgewiesen werden (Käsbauer *et al.*, 2007; Münder *et al.*, 2010).

Ausgehend von diesen bisher entdeckten Bestandteilen kann man annehmen, dass *Hydra* einen funktionellen Notch-Signaltransduktionsweg aufweist. Zudem konnte mit Hilfe des synthetischen  $\gamma$ -Sekretase Inhibitors DAPT (N-[N-(3,5-difluorphenacetyl)-L-alanyl]-S-phenylglycin t-butylester) die Funktion und Wirkungsweise des Notch-Signalwegs in *Hydra* analysiert werden. Dabei zeigte sich, dass Notch-Signaltransduktion wie in höheren Organismen mittels Presenilin-abhängiger Proteolyse und Translokation des intrazellulären Bereichs geschieht. Bei Hemmung des Notch-Signalwegs durch DAPT ist auf zellulärer Ebene keinerlei Effekt auf die Nervenzelldifferenzierung festzustellen, während die Nematocyten- sowie die Oozytendifferenzierung stark beeinflusst werden. Nach Inhibierung des Notch-Signalwegs kommt es dabei zur Blockierung der Nematocytendifferenzierung zum Zeitpunkt der beginnenden Ausbildung der post-Golgi Vakuole. Zellen, die bei einsetzender Inhibierung bereits eine Vakuole aufweisen, vollenden dagegen die Kapselreifung. Während der Oogenese in *Hydra* scheint der Notch-Signalweg einen Effekt auf die Anzahl der Oozyten-Vorläufer GCI zu haben. Eine Blockierung dieses Signalwegs führt zu einer vermehrten Proliferation dieser Vorläufer, die Differenzierung zu GCII-Zellen wird inhibiert. Bemerkenswert bleibt, dass

der Notch-Signalweg demnach nicht für die Entscheidung für ein spezifisches Zellschicksal innerhalb der interstitiellen Zelllinie, sondern für die frühe Differenzierung maßgeblich ist (Käsbauer *et al.*, 2007).

Weiterhin ist bekannt, dass der Notch-Signalweg in *Hydra* bei der Knospung eine entscheidende Rolle spielt. So konnten Münder *et al.* (2010) zeigen, dass die Notch-Signaltransduktion benötigt wird, um eine breite Expression des *Hydra* FGF-Rezeptors *kringelchen* an der Knospbasis zu schärfen. In Folge dieser Schärfung kommt es zur Expression der Matrix Metalloprotease MMP-A3, die vermutlich zum Kollagenabbau in der extrazellulären Matrix führt und damit den Umbau der Mesoglea und die zunehmende Einschnürung der Knospe fördert. In der einschnürenden Knospe wird die Notch-Aktivierung durch Expression des Zielgens *HyHes* erkennbar.

### 1.3 Zic-Transkriptionsfaktoren

Mitglieder der Zic-Familie von Transkriptionsfaktoren spielen eine wichtige Rolle bei Zellschicksalsentscheidungen. So werden diese Proteine unter anderem bei der Segmentierung in *Drosophila*, der neuronalen Entwicklung und Muskelentwicklung in Urchordaten und Vertebraten benötigt. Außerdem sind sie bei der Bildung der Neuralleiste, der Entstehung des Neuralrohrs, und der links-rechts-Symmetrie in Vertebraten von Bedeutung und werden im adulten Kleinhirn exprimiert. Zic-Transkriptionsfaktoren tragen im Allgemeinen zur Zellspezifikation und Proliferationsförderung bei (Aruga, 2004; Benedyk *et al.*, 1994; Imai *et al.*, 2002; Merzdorf, 2007; Nishida & Sawada, 2001).

Als Transkriptionsfaktoren mit Kernlokalisierungssignalen wirken Zic-Proteine sowohl als Transkriptionsaktivatoren als auch als

Transkriptionsrepressoren (Merzdorf, 2007). In undifferenzierten Geweben, in denen *zic* Gene hauptsächlich exprimiert werden, stimulieren sie die Proliferation, während Proteine, die die Differenzierung fördern, reprimiert werden. So wird beispielsweise die Expression der proneuralen Gene *Math1* in Maus und *Cath1* und *Cash1* in Hühnchen während der Neurogenese direkt durch Zic1 verhindert (Ebert *et al.*, 2001). Beim Übergang von Proliferation zu Differenzierung im Bereich des dorsalen Neuralrohrs der Maus wird dann die Zic1-Menge reduziert, während die *Math1*-Expression beginnt (Merzdorf, 2007). Es sind jedoch auch Fälle bekannt, in denen *zic* Gene in differenzierten Zellen exprimiert werden - vor allem im postnatalen Kleinhirn (Aruga *et al.*, 1998).

Vertebraten besitzen in der Regel fünf *zic* Gene, die homolog zum *Drosophila odd-paired (opa)* sind. Zic-Transkriptionsfaktoren besitzen fünf Tandem-C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>-Zinkfinger-Domänen, die einerseits mit der DNA interagieren, andererseits Protein-Protein-Interaktionen erlauben. So existieren beispielsweise Heterodimere von Zic mit dem C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>-Zinkfinger-Transkriptionsfaktor Gli. Dieser nahe Verwandte hält sich je nach Kontext überwiegend im Zytoplasma auf, wird aber durch die Heterodimerbildung mit Zic in den Zellkern rekrutiert. Das entstandene Heterodimer verhindert vermutlich eine Bindung der einzelnen Transkriptionsfaktoren an die DNA (Koyabu *et al.*, 2001; Merzdorf, 2007).

#### **1.4 POU-Domänen-Transkriptionsfaktoren**

POU-Domänen-Transkriptionsfaktoren sind entscheidend bei diversen Entwicklungs- und Zelldifferenzierungsprozessen. Ihren Namen erhielten sie durch die erstmalige Entdeckung der spezifischen POU-Domäne in den Säugerproteinen Pit-1, Oct-1, Oct-2 und dem *C.elegans* Homolog

Unc-86. Die POU-Domäne wird in zwei Subdomänen unterteilt, die N-terminale, ca. 75 Aminosäuren lange POU-spezifische- (POU<sub>S</sub>)- sowie die 60 Aminosäuren lange POU-Homeodomäne (POU<sub>HD</sub>). Beide sind durch eine 15-27 Aminosäuren lange, variable Linkerregion verbunden. Während die POU<sub>S</sub>-Domäne einzigartig unter den POU-Domänen-Proteinen ist, ist die POU<sub>HD</sub>-Domäne verwandt zur klassischen Homeodomäne, die für DNA-Bindung verantwortlich ist. Auch die POU<sub>HD</sub>-Domäne vermittelt DNA-Bindung, allerdings wird für eine effiziente, sequenzspezifische Bindung zusätzlich die POU<sub>S</sub>-Domäne benötigt (Sturm & Herr, 1988).

POU-Domänen-Transkriptionsfaktoren werden entsprechend der Länge und Zusammensetzung der Linkerregion in sieben Gruppen klassifiziert: Klasse I besteht lediglich aus neuronal exprimierten Pit-Proteinen, während Klasse II aus dem ubiquitär exprimierten Oct-1 und dem Gewebespezifischen Oct-2 zusammengesetzt wird. Brn-1, -2, -4 und Tst-1 werden in die Gruppe III eingeordnet. Genauso wie die Mitglieder der Klasse IV, Brn3.x und Unc-86, sind sie an neuronaler Entwicklung beteiligt. Klasse V-Proteine, wie z.B. Oct3/4, sind an früher Embryogenese beteiligt. Klasse VI-Proteine, wie Brn-5, werden im zentralen Nervensystem exprimiert und Klasse VII-Proteine sind kritisch während früher Entwicklungsstadien (in Phillips & Luisi, 2000 zusammengefasst).

Im Allgemeinen scheinen Mitglieder der Familie der POU-Domänen-Transkriptionsfaktoren eher spät in Transkriptionskaskaden der embryonalen Entwicklung wichtig zu sein, indem sie terminale Differenzierungsergebnisse regulieren (Ryan & Rosenfeld, 1997). In adulten Tieren sind sie dagegen nur in einer limitierten Anzahl von spezifischen Zelltypen vorhanden (Verrijzer & Van der Vliet, 1993).

POU-Transkriptionsfaktoren interagieren zudem mit anderen Transkriptionsfaktoren. So wurde beispielsweise die Interaktion mit dem proneuralen Mash1 während der Neurogenese nachgewiesen. Dabei kommt es zur synergistischen Regulation zahlreicher Zielgene wie zum Beispiel *Delta1* (Castro *et al.*, 2006). Auch Interaktionen mit Mitgliedern der Sox-Familie wurden gezeigt (Kuhlbrodt *et al.*, 1998).

## 1.5 Ziel dieser Arbeit

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit Notch-Signaltransduktion im Süßwasserpolypen *Hydra vulgaris*. Dieser Cnidarier steht am Anfang der Evolution vielzelliger Tiere. Deshalb ist es von Interesse, den unter Metazoen stark konservierten Notch-Signalweg an diesem Modellorganismus zu untersuchen.

Zuerst sollten im Rahmen dieser Arbeit die fehlenden Mitglieder der Notch-Signaltransduktion in *Hydra* ermittelt und untersucht werden. Der wohl wichtigste Mitspieler ist dabei, neben dem bereits bekannten Notch-Rezeptor, der DSL-Ligand. Dieser sollte identifiziert, sowie die Expression am ganzen Tier und auf zellulärer Ebene betrachtet werden. Auch die Anwesenheit weiterer Proteine der Notch-Signaltransduktion sollte untersucht werden, um das Bild des kanonischen Signalwegs in *Hydra* zu vervollständigen.

Außerdem sollte die Auswirkung der Notch-Signaltransduktion auf die Nematocytyendifferenzierung genauer beobachtet werden. Dabei sollten Expressionen bekannter, an der Nematocytyendifferenzierung beteiligter Gene und Proteine in Folge von Notch-Inhibierung betrachtet werden.

Des Weiteren sollten POU-Domänen-Transkriptionsfaktoren in *Hydra* identifiziert und deren Funktionen bei der Zellentwicklung und -differenzierung, auch in Zusammenhang mit Notch-Signaltransduktion betrachtet werden.

## 2 Ergebnisse

### 2.1 Der Notch-Ligand in *Hydra*

Der Notch-Signaltransduktionsweg in *Hydra* wurde bereits 2007 durch Käsbauer *et al.* identifiziert. Dabei wurde unter anderem die Existenz des Notch-Rezeptors bestätigt. Da ein Ligand bisher nicht nachgewiesen werden konnte, wurde dies in der vorliegenden Arbeit angestrebt.

#### 2.1.1 Identifikation von DSL-Domänen in *Hydra*

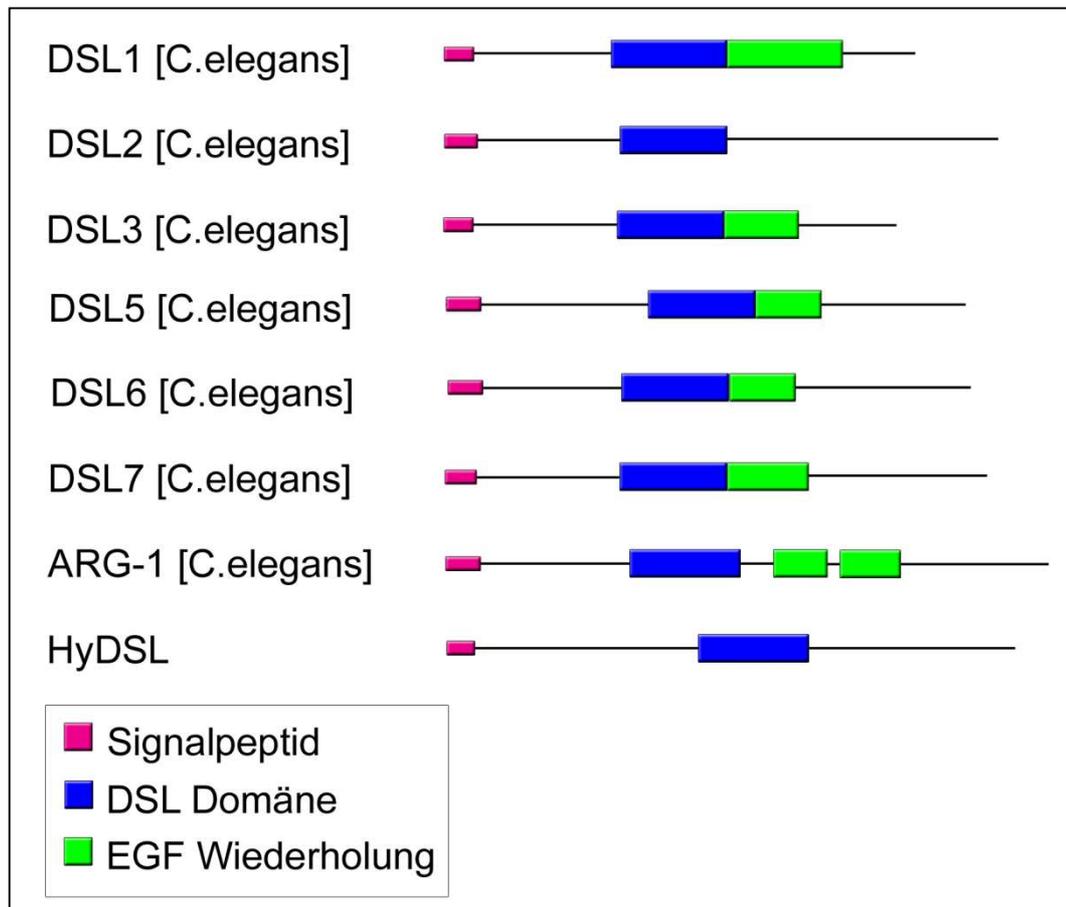
Die DSL-Domäne ist eine für Notch-Liganden charakteristische, stark konservierte Sequenz. Bei der Suche nach dem *Hydra* Liganden wurden deshalb diverse DSL-Proteine zahlreicher Organismen bei einem „Blast“ gegen das *Hydra*-Genom eingesetzt. Dabei wurden zwei Kandidatengene identifiziert, die im Folgenden genauer betrachtet wurden.

#### ***Der lösliche Ligand HyDSL***

Der erste Kandidat weist neben seiner DSL-Domäne lediglich ein Signalpeptid auf. Es handelt sich dabei demnach um einen potentiellen sezernierten Notch-Liganden. *C.elegans* besitzt einige natürliche sezernierte Notch-Liganden (DSL1-7 und ARG-1). Diese haben neben ihren EGF-Wiederholungen auch charakteristische DSL-Domänen. Bisher wurde allerdings lediglich die Funktionalität von DSL-1 als Notch-Ligand bewiesen (Chen & Greenwald, 2004).

Dieser erste Kandidat wurde aus cDNA kloniert, sequenziert und anschließend weiter untersucht. Der schematische Vergleich der Domänenstruktura-

ren der löslichen Liganden von *C.elegans* mit dem Homologen aus *Hydra* zeigt, dass auch *C.elegans* ein Protein, DSL-2, mit lediglich einer DSL-Domäne besitzt. Die anderen sezernierten Homologen haben mindestens eine zusätzliche EGF-Wiederholung (siehe Abb. 2-1).



**Abb. 2-1:** HyDSL-Domänenstruktur im Vergleich zu sezernierten Notch-Liganden aus *C.elegans*; Signalpeptid (pink); DSL-Domäne (blau); EGF-Wiederholungen (grün).

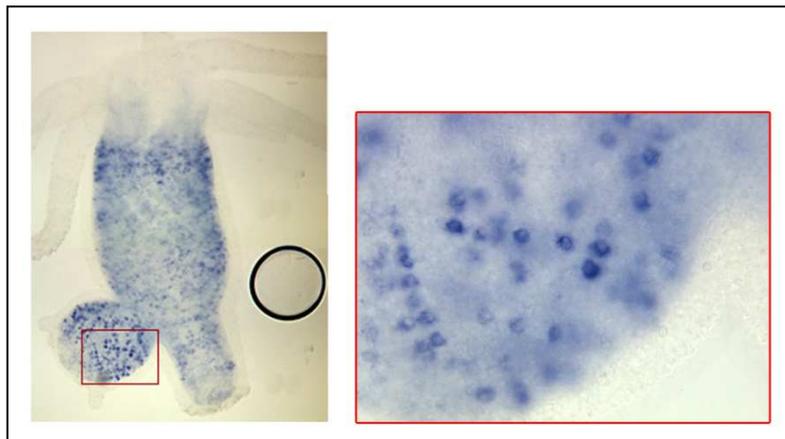
Auf Grund dieser Domänenstruktur wurde das homologe Protein aus *Hydra* HyDSL genannt. Es wurde anschließend mit dem *C.elegans* DSL-2 weiter verglichen. Die Gegenüberstellung der entsprechenden Aminosäuresequenzen kann der Abb. 2-2 entnommen werden. Erkennbar

werden dabei die konservierte DSL-Domäne sowie das Signalpeptid. Ansonsten sind nur wenige weitere Übereinstimmungen vorhanden.

HyDSL		SP	
Dsl-2 [C.elegans]	MIFIVILYLCO <del>TLQFL</del> ES		BVLVKINLETFDTRCSKNRDFNGIPCKVLPASECSFKFEICYGSSSLHCFETH
	MRNLFVFFSLSS <del>LFL</del> SNA	SP	MFIDP-----GKSGALELVLKVESSQTTQIAVNSNVTSIDLHTNSTH
HyDSL			
Dsl-2 [C.elegans]	TLTQDKNTRITRFPLKLSNDMTNPLILKTS <del>SHKVS</del> FNLSVTIYTQFHENDKNINLNFRLSKQFSLDAIGIK		YIEYREMDFRGIISIRLQTKFMKSRYGSRNWHMVVFDPLQ-----
HyDSL			DSL
Dsl-2 [C.elegans]	KHIIILG <del>INPMIS</del> NGISFTTSFD--CDGN-FKPPN <del>GLEK</del> VCI <del>EHDDDD</del> INGHYTCEKNGVITCRVGT <del>DSK</del>		DSL
	-----EIIINVDQLPRPFDGMVVKV <del>CERNWF</del> -GEYCD-KYCEDEAAH-LVGMRCNKKGV <del>MGCNEGFC</del> GEN-		
HyDSL			
Dsl-2 [C.elegans]	KC-----LVSTLQPPSKVGCYHDFG-----ILGK--RPF		CDQTKSQCSMMCA <del>CENDAP</del> CYSSTDPRTSREYVYCECLTGFEGKYCQNVTFPEMPKFRVMLGANGKIF
HyDSL			
Dsl-2 [C.elegans]	PIFVN---YRSLIDWNNKKVSPENITMKCSSYAKENGFEYFGIEFWGECWTGATPNIN <del>YARD</del> GESTL <del>CWPT</del>		KVLENK <del>NLVKNEFY</del> WANSSAKFELLAENAENFPAPESFWQLAREFLEDLFSETDPWTPVIFIGIFGLFLVF
HyDSL			
Dsl-2 [C.elegans]	PDENLGPMLV <del>GQD</del> STIMVYKRNK <del>LRS</del>		HCQAVD---VESSKKLIVFDV-----

**Abb. 2-2:** Gegenüberstellung von DSL-2 mit HyDSL; Signalpeptid (SP, pink); DSL-Domäne (DSL, blau); Identische Aminosäuren sind grau hinterlegt.

Hwang *et al.* konnten 2007 Zelltyp-spezifische Gene identifizieren. Dabei wurde unter anderem das Gen *hydmg002bw\_40* entdeckt, das dem zeitgleich identifizierten *HyDsl* entspricht. Durch Hwang *et al.* durchgeführte *in situ*-Hybridisierungen zum Nachweis dieses Gens konnten die Expression auf Drüsenzellen lokalisieren (siehe Abb. 2-3).



**Abb. 2-3:** *In situ*-Hybridisierung an ganzen Tieren für *hydmg002bw\_40* (Hwang *et al.*, 2007).

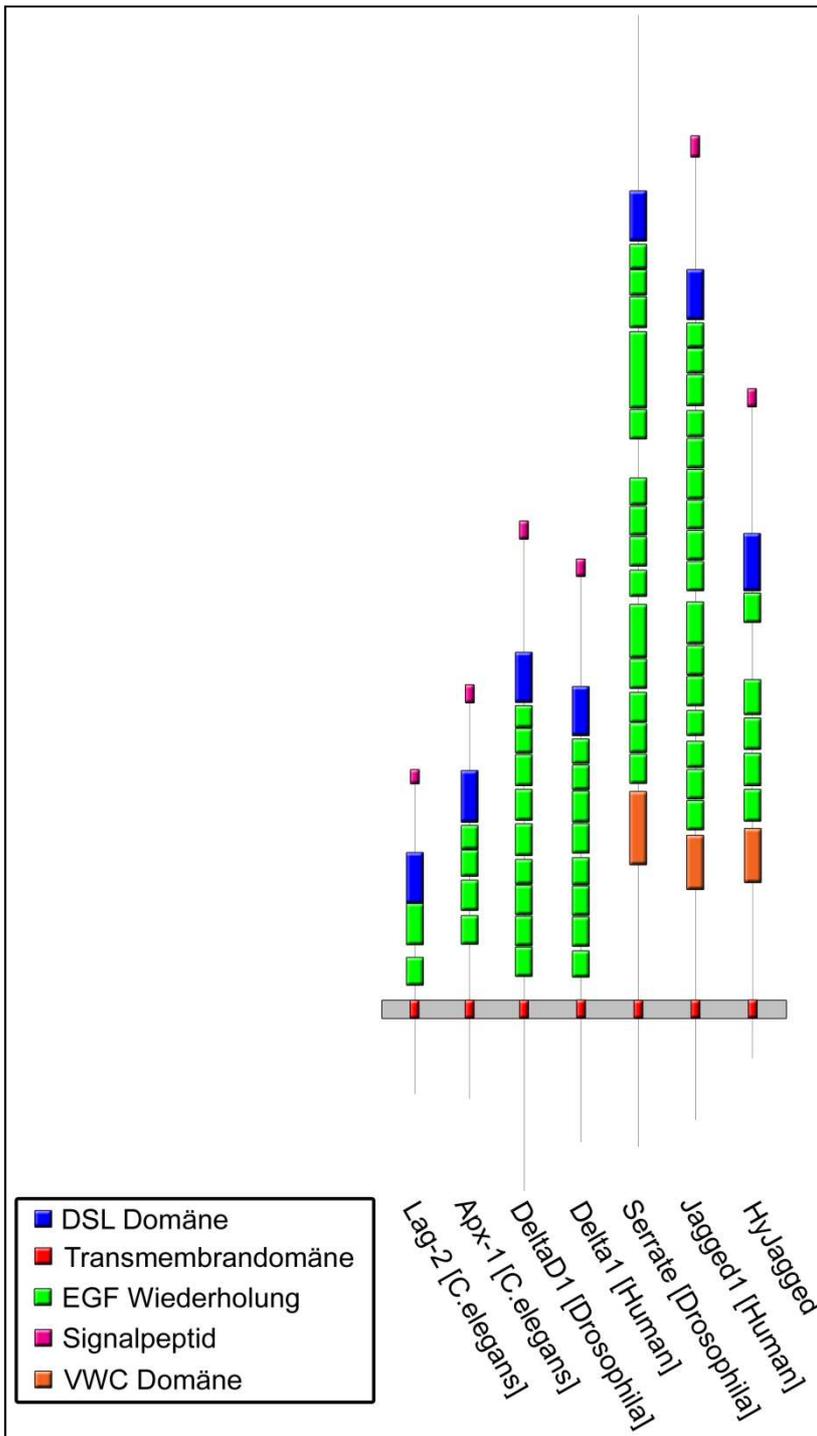
### ***Der kanonische Notch-Ligand HyJagged***

Schließlich wurde ein weiterer Kandidat mit einer DSL-Domäne identifiziert, dessen vollständige Sequenz durch 5' und 3' RACE-Experimente ermittelt wurde. Der Sequenzvergleich der resultierenden Proteinsequenz mit Jagged1 aus Maus zeigt starke Homologien auf (siehe Abb. 2-4). Das *Hydra* Protein enthält neben der charakteristischen DSL-Domäne ein Signalpeptid, 5 EGF-Wiederholungen und eine Transmembrandomäne. Demnach besitzt das *Hydra* Protein alle für einen Notch-Liganden notwendigen Domänen. Zudem wird anhand dieser Gegenüberstellung deutlich, dass *Hydra* zwischen den EGF-Wiederholungen und der Transmembrandomäne eine zusätzliche Cystein-reiche von Willebrand Typ C (VWC)-Domäne aufweist. Diese ist charakteristisch für Jagged/Serrate-ähnliche Liganden, so dass dies zur Benennung dieses Proteins als HyJagged führte.

HyJagged	SP MAKIVY-----CWVVVA SQFQNTKS	IGNIEIHIEYFKFOK----DYLNCA-----DTCLQYASVCL---
mJagged1	MRSPRTGRGPRP SLLLAL CALRAKVCQ	ASGQFELEILSMQNVNGLQNGNC CGGVRNP GDRKCTRDEQDTYFKVCLKEY
HyJagged	SP	
HyJagged	-SNINHTNCDIGY-IEQEQYQYNFNLSFIN-----FTLPLVVPVKDLYMISFEVNOQTSMNNSALLKXYSTYISFTPH-N	
mJagged1	QSRVTAGGPCSFGSGSTPVI GGNTFN LKASRGNDRNRIVLPFSFAWPRS YTLLEAWDS-SNDTTIQPDSII EKA-SHSGMIN	
HyJagged		DSL RNC DKNN TICIPRDN YRCRNNQK ICNPGW
mJagged1	PSRQ-----	WOTL KONTG----IAHFYQIRVTCDDHY
HyJagged		DSL
HyJagged	TCINCEVSTYKKLCKPRDDHTGHYGC SYE GNKVCNVG WEGENC LK-----	
mJagged1	YGFQGNK-----FCRPRDDFFGHYACDQNGNKT CMEGWMPDCNKAL	ICRQGCSPKHGSKCLPGDCRCQYGWQGLYCKCIPH
HyJagged		EGF1 EGF2
HyJagged		EGF3 EGF4
mJagged1	PGCVHGT CNEP WQCLCETNWGGQLCDKDLNYCGTHQPCLNRGTCSNTGPDKYQCSCPEGYSGPNCEIAEHA	ACLSDPCHNRGS
HyJagged		EGF1
mJagged1	-----NIDDCLSNPCLNNGSCIDLHANFE CVCPGEYGGKQCEIDFR---NEPCKNKGI-----	
HyJagged	CKETSSSGFECECSPGWTGPTCSINIDDCSPNNGSHGGTQDLVNGFKCVCPQWTKTQQLDANECEAKPCVNRASCKNLLIA	
mJagged1		EGF5 EGF6
HyJagged		MLPDNTCKCRFGYK
mJagged1	SYDCDCLPGWMGQNCIDININDCLGQCQNDASCRDLVNGYR TICPPG YAGDHCERDIDECASNPCLNGGHCCQNEINRFQCLCP	
HyJagged		EGF7 EGF8
HyJagged	-----GNKCEICIPY---HLCVDHGTCKNH---DT-CNGLCI	
mJagged1	TGFSGNLCLDIDYCEPNPCQNGAQCYNRASDYFC--KCPEDYEGKNCSHLKDHCRTTTCVEID	SCTVAMASNDTPEGVRYI
HyJagged		EGF9 EGF10
HyJagged		EGF2
mJagged1	-----PGGWVGFCHIEQDGC SHNRGKFKFCSSKGCIVNDQKVS VSGQAWKCLCYE	
HyJagged	SSNVCGPHGKCKSQSGGKFTCDCNKGFTGTYC-----HE-NINDCESNP-----CKNGGTCIDG-----VNSYKCIQSD	
mJagged1		EGF11
HyJagged		EGF3
mJagged1	GWVGHCEIKIHL CNKRSPCQNGGTCL-----KSKHFNDQDIYNCRCPLGFSGK	
HyJagged	SWEGAHCEININDCSQ-NPCHYGGTCRDLVNDYFCCKNGWKGTCHSRDSQCDEATCNNGTCYDEVDTFKCMCPGGWGBT	
mJagged1		EGF12 EGF13
HyJagged		EGF4
mJagged1	NCELEINVCEKLSPCQNGGTCLNIGKHF-----NDNLIYEQCCPIGFSKNCID	
HyJagged	TCNLARNSCLPNPC HNGGTICVNVGDSFTCVCKEGWEGPICTQNTNDCSPHPCYNSGT CVDGDNWWRCECAPGAGPDRIN	
mJagged1		EGF14 EGF15
HyJagged		EGF5
mJagged1	MFVGNKQSPCQNGGTCLKSGKHFNDQVYDCRCLGFSKNCIEITSIQYKQCMYREMWYIHNDDWDA	GV R DD VAK TD
HyJagged	TNECQS-SPCAFATCVD-----EINGYQICPPGHSGAKCH--EVSGRSICITMGRVILDGAKWDD	GV R DD VAK TD
mJagged1		EGF16
HyJagged		VWC
mJagged1	VWC LPN -YOIEDPN - - - - K -KFVEGHIT - PCLPWCMNFQTI - - - -LYMG - FTEFTELAEN - AKVIFFNVRMLPKG	
HyJagged		VWC
mJagged1	VWC PRPRLHKSHNEPSGQSIPVLDQCFVRCPTGVCE - RSSLQFVTK - TSD - - - -SYQDN - ANITFTFNKEMMSPG	
HyJagged	ILLEELCQQFH IYKRVQSLFISNEVSLQCSHVRFNSSLDQLIINIYSKKAIQLSLEIAKYKHTLVEQFENFKWHAPPTLVL	
mJagged1	LTTEHICSELRNLNILKNVSAEYSIYIACEPSSLANNEIHVAISAEDIRDDGNPVKEITDKIIDLVS-----KRDGNSSLI-	
HyJagged		TM
mJagged1	FFRSVA YTTIEKPSTMHSFLKEEGYFPPLVGC MV - - - - VCVLVLFVCLYLWLYKYM-----TVKKRYV--LSDT	
HyJagged	--AAVAEVRVQR-----RPLKNRTDFLVPLLSVLTVAWVCLL--VTAFYWCVRKRRKPSSTHSAPEDNTTNNVREQLNQI	
mJagged1		TM
HyJagged	TTILEHN-----K LKENTLLVNKDNL-----KKGIFKTISRKSE--	
mJagged1	KNPIEKHGANTVPIKDYENKSKMSKIRTHNSEVEEDMDKHKQKVRFAKQPVYTLVDR EEPKAPSGTPTKHPNWTNKQDNRD	
HyJagged		-LL
mJagged1	LESAQSLNRMEYIV	

**Abb. 2-4:** Gegenüberstellung von mJagged1 mit HyJagged; Signalpeptid (SP, pink), DSL-Domäne (DSL, blau); EGF-Wiederholungen (EGF; grün); VWC-Domäne (VWC, gelb); Transmembrandomäne (TM, rot); Identische Aminosäuren sind grau hinterlegt.



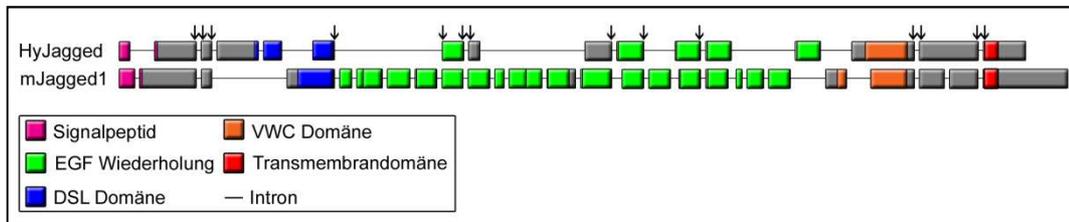


**Abb. 2-6:** HyJagged-Domänenstruktur im Vergleich zu Jagged- und Delta-Proteinen aus Mensch, *Drosophila* und *C.elegans*; Signalpeptid (pink); DSL-Domäne (blau), EGF-Wiederholungen (grün), VWC-Domäne (orange), Transmembrandomäne (rot).

Eine Verwandtschaftsbeziehung kommt durch den phylogenetischen Stammbaum von Jagged/Serrate- und Delta-Proteinen diverser Organismen zum Vorschein (siehe Abb. 2-7). Dieser Stammbaum beruht dabei auf einem „*Alignment*“ der jeweiligen Vollängenproteinsequenzen unter Ausschluss der Positionen mit Lücken. Delta- und Jagged-Proteine erscheinen dabei deutlich voneinander getrennt und auch innerhalb dieser beiden Gruppen kommt es zu weiteren Aufspaltungen in Delta1-, Delta2/3- und Delta4-ähnliche Proteine bzw. Jagged1- und Jagged2-ähnliche Proteine. Außerhalb dieser Gruppen befinden sich die beiden Notch-Liganden von *Drosophila*, Delta und Serrate. Die kanonischen Liganden Apx-1 und Lag-2 von *C.elegans* und HyJagged spalten sich sogar noch eher von den restlichen Proteinen ab. Dies deutet auf die frühe evolutionäre Entwicklung dieser Liganden hin.



kiert sind außerdem stark konservierte Exon-Intron-Schnittstellen. Diese verteilen sich entlang des gesamten Proteins. Der modulare Aufbau der DSL-Liganden zeigt sich demnach auch in der Exon-Intron-Struktur.



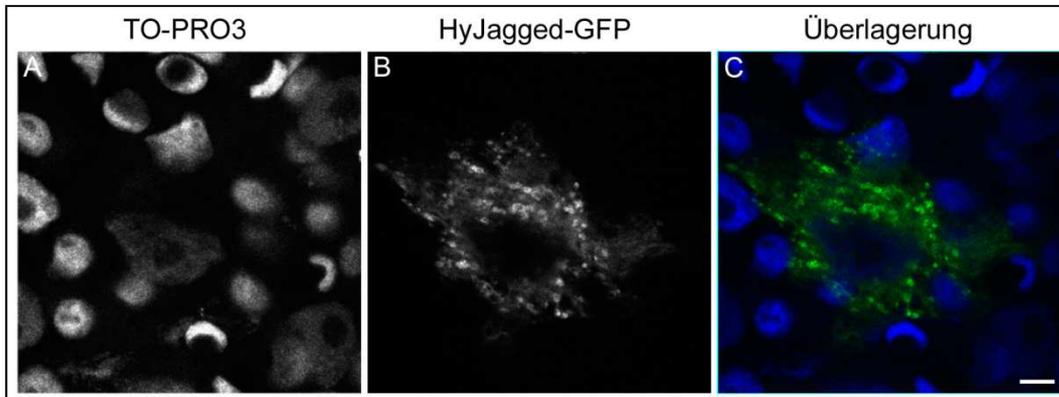
**Abb. 2-8:** Exon-Intron-Struktur von HyJagged im Vergleich zu mJagged1; Signalpeptid (pink); DSL-Domäne (blau); EGF-Wiederholungen (grün); VWC-Domäne (orange), Transmembrandomäne (rot); Exonsequenzen maßstabsgetreu dargestellt durch Balken; Intronsequenzen nicht maßstabsgetreu dargestellt durch einfache Striche; konservierte Exon-Intron-Schnittstellen durch Pfeile dargestellt.

Damit wurden zwei DSL-Proteine als potentielle Notch-Liganden identifiziert werden - das nicht kanonische, lösliche Protein HyDSL, sowie der kanonische Ligand HyJagged. Dieser letzte wurde im Folgenden genauer bezüglich seiner Expression und Lokalisation untersucht, um so einen Zusammenhang zum bisher bekannten Notch-Signalweg in *Hydra* herstellen zu können.

### 2.1.2 Zelluläre Lokalisation von HyJagged

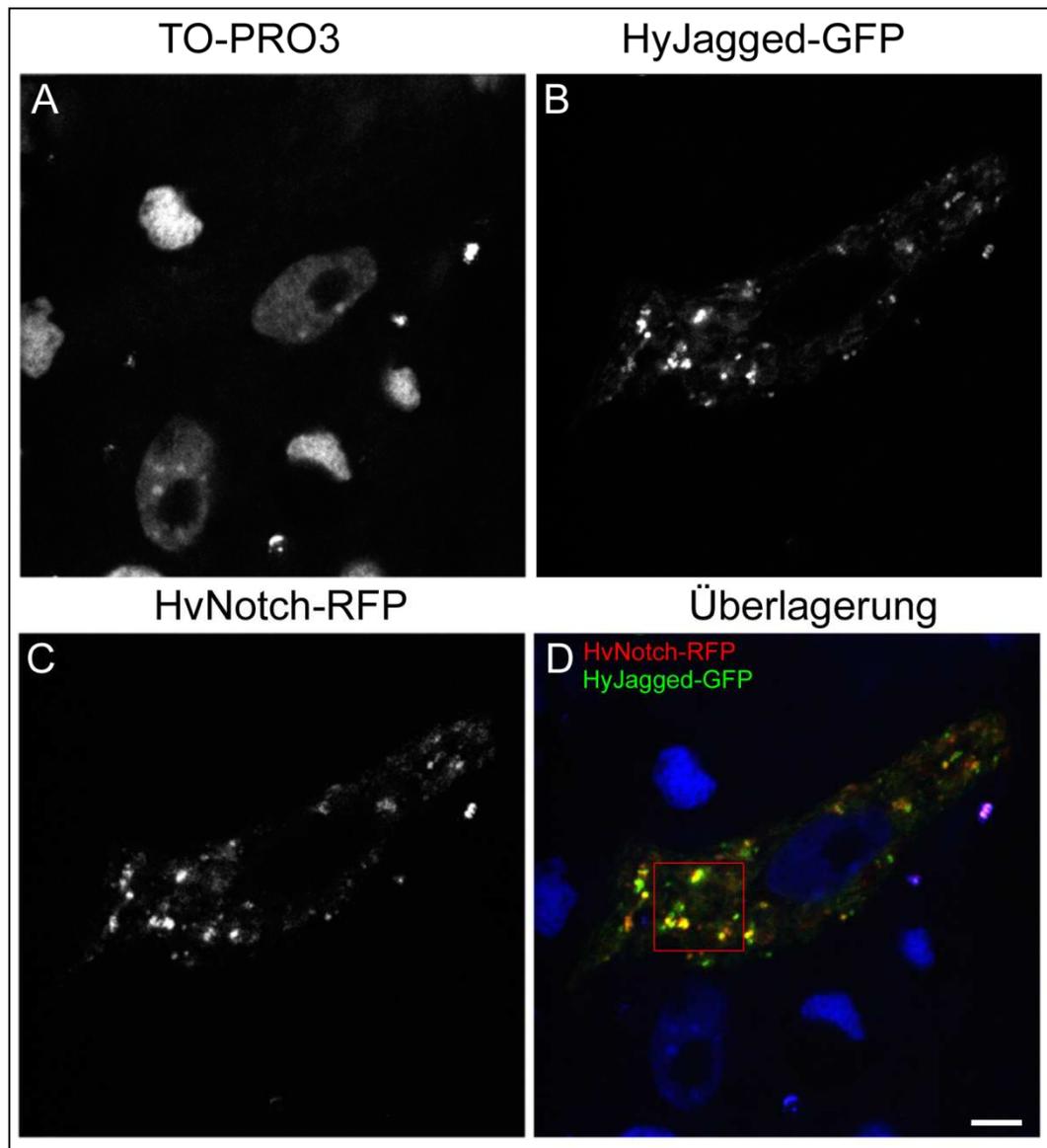
Um die Lokalisation von HyJagged innerhalb einzelner Zellen zu betrachten, wurde *Hyjagged* in den hoT G-Vektor eingebracht, so dass nach biolistischer Transformation von *Hydra* mit diesem Konstrukt HyJagged-GFP als überexprimiertes Fusionsprotein entsteht. Derart transformierte und fixierte Tiere zeigen globuläre und ringförmige Strukturen im Zyto-

plasma (siehe Abb. 2-9). An der Membran ist dagegen kein Signal zu erkennen.

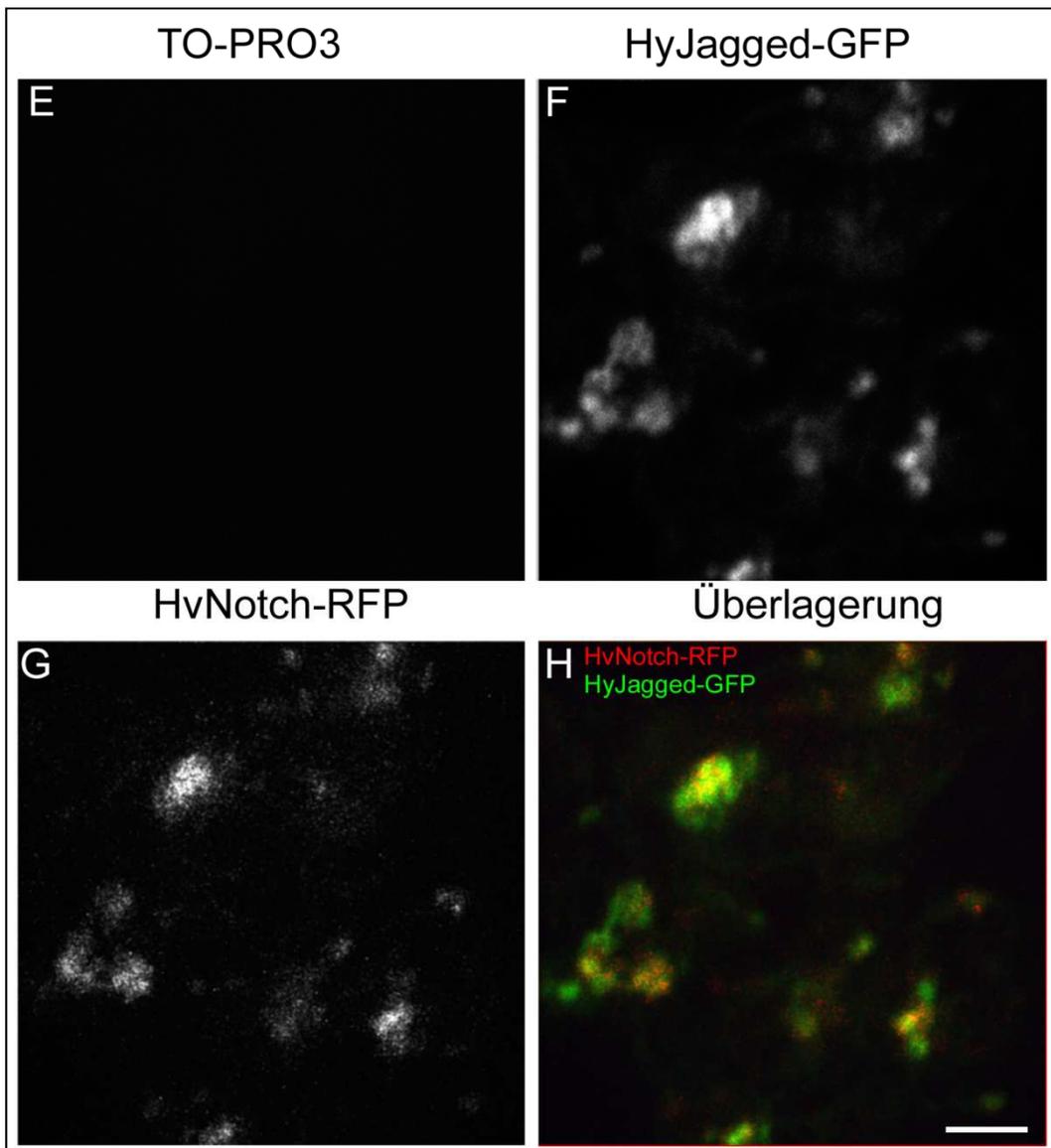


**Abb. 2-9:** Überexpression von HyJagged-GFP in *Hydra*, fixiert; (A) DNA-Färbung mit TO-PRO3; (B) HyJagged-GFP; (C) Überlagerung aller Kanäle in Falschfarben: DNA (blau), HyJagged-GFP (grün); Konfokale Schnitte; Maßstab: 5µm.

Dies erinnert an die durch Käsbauer *et al.* (2007) gezeigten Strukturen von überexprimiertem und fixiertem HvNotch-GFP. Um diese beiden Proteine deshalb direkt zu vergleichen, wurden Hydren mit *Hyjagged*-hoT G und *Hvnotch*-hoT Red zugleich transformiert. Aus Abb. 2-10 A-D und der Vergrößerung in Abb. 2-10 E-H wird ersichtlich, dass es überwiegend zu einer Überlagerung von beiden Proteinen in den globulären Strukturen kommt. Globuläre Strukturen mit lediglich Notch-Ligand oder -Rezeptor sind allerdings auch detektierbar.



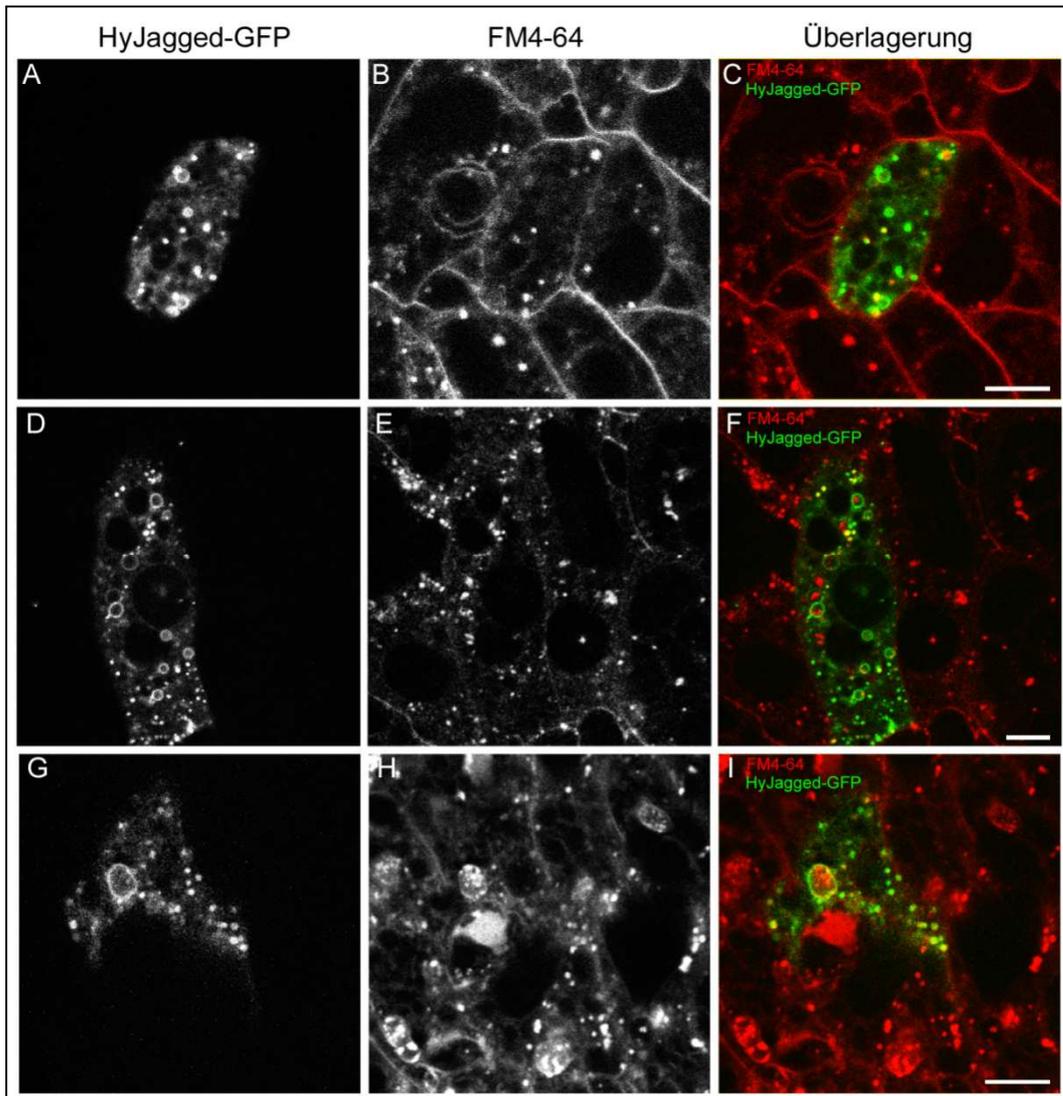
**Abb. 2-10:** Überexpression von HyJagged-GFP und HvNotch-RFP; (A, E) DNA-Färbung mit TO-PRO3; (B, F) HyJagged-GFP; (C, G) HvNotch-RFP; (D, H) Überlagerung aller Kanäle in Falschfarben: DNA (blau), HyJagged-GFP (grün), HvNotch-RFP (rot); Konfokale Schnitte; Maßstab: (A-D) 5 $\mu$ m, (E-H) 2 $\mu$ m – Fortsetzung auf nächster Seite.



**Abb. 2-10 – Fortsetzung:** Überexpression von HyJagged-GFP und HvNotch-RFP; (A, E) DNA-Färbung mit TO-PRO3; (B, F) HyJagged-GFP; (C, G) HvNotch-RFP; (D, H) Überlagerung aller Kanäle in Falschfarben: DNA (blau), HyJagged-GFP (grün), HvNotch-RFP (rot); Konfokale Schnitte; Maßstab: (A-D) 5 $\mu$ m, (E-H) 2 $\mu$ m.

Eine Membranlokalisation ist auch hier weder von HyJagged noch von HvNotch am fixierten Tier erkennbar. Käsbauer *et al.* (2007) konnten dies

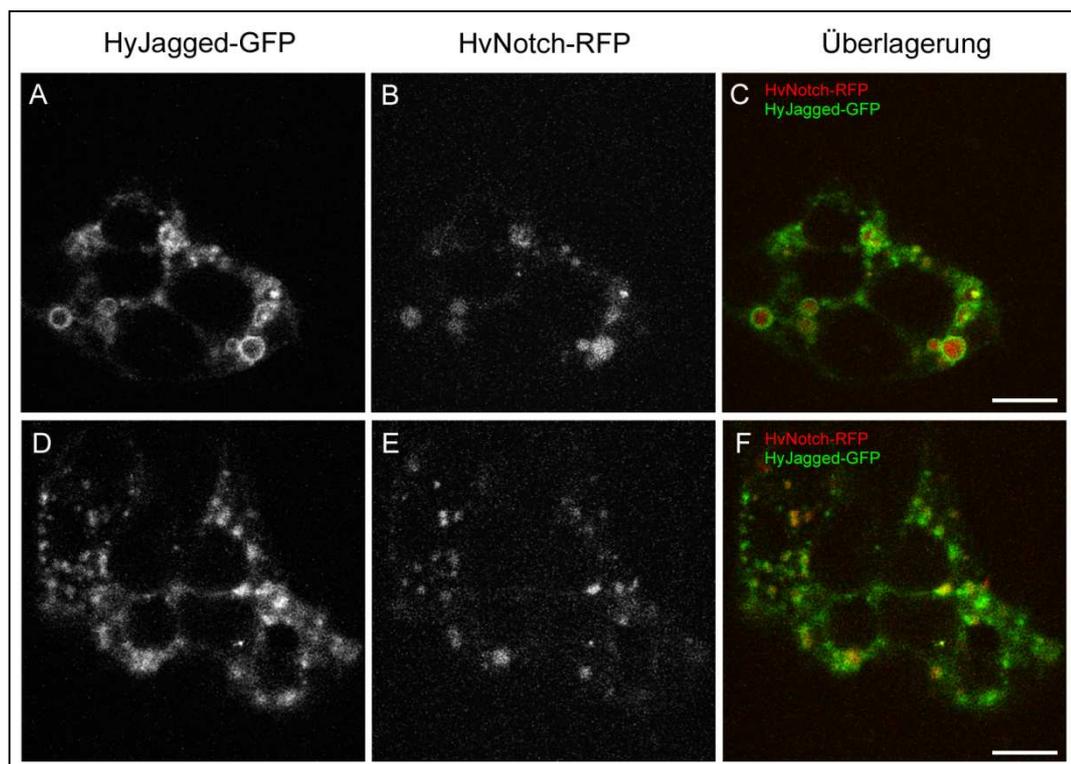
bereits im Falle des HvNotch beobachten. Am lebendigen Tier konnten sie allerdings ektopisches HvNotch an der Membran zeigen. Aus diesem Grund wurden Lokalisationen von HyJagged-GFP und HvNotch-RFP an lebenden Hydren untersucht. Zunächst wurde HyJagged-GFP allein beobachtet, wobei in den Gastralraum transfizierter Hydren zusätzlich der Membran- und Endosomenmarker FM4-64 injiziert wurde. Solche Tiere wurden nach unterschiedlichen Inkubationszeiten in diesem Farbstoff lebendig am konfokalen Mikroskop betrachten (siehe Abb. 2-11). Der Membran- und Endosomenmarker FM4-64 färbt bei kurzer Inkubationszeit (ca. 20-30 Minuten) überwiegend die Zellmembran, einzelne globuläre Strukturen im Zytoplasma liegen ebenfalls vor (siehe Abb. 2-11 A-C). Es handelt sich dabei um endozytotische Vesikel. Bei längerer Inkubation von ca. einer Stunde verschwindet dieser Farbstoff von der Membran und erscheint nur noch in endozytotische Vesikel (siehe Abb. 2-11 D-F), die bei noch weiterer Inkubation (ca. 20 Stunden) an Größe zunehmen (siehe Abb. 2-11 G-I). Vergleichend dazu wird deutlich, dass HyJagged-GFP auch im lebenden Tier nicht an der Membran bzw. nur in sehr geringen, nicht detektierbaren Mengen vorliegt. Dagegen sind globuläre und ringförmige Strukturen unterschiedlicher Größen eindeutig zu erkennen. Anhand der Überlagerung von HyJagged-GFP mit dem Farbstoff FM4-64 (siehe Abb. 2-11 C, F und I) konnte so gezeigt werden, dass sich ektopisches HyJagged-GFP in endozytotischen Vesikeln unterschiedlicher Größen im Zytoplasma verteilt.



**Abb. 2-11:** Überexpression von HyJagged-GFP in *Hydra*, lebend; (A, D, G) HyJagged-GFP; (B, E, H) FM4-64; (C, F, I) Überlagerung aller Kanäle in Falschfarben: HyJagged-GFP (grün), FM4-64 (rot); Konfokale Schnitte; Maßstab: 10µm.

HyJagged-GFP wurde zudem zeitgleich mit HvNotch-RFP am lebenden Tier beobachtet. Während HyJagged-GFP dabei wie zuvor in kleinen globulären und größeren ringförmigen Strukturen erscheint (siehe Abb. 2-12 A, D), bildet HvNotch-RFP lediglich globuläre Strukturen unterschied-

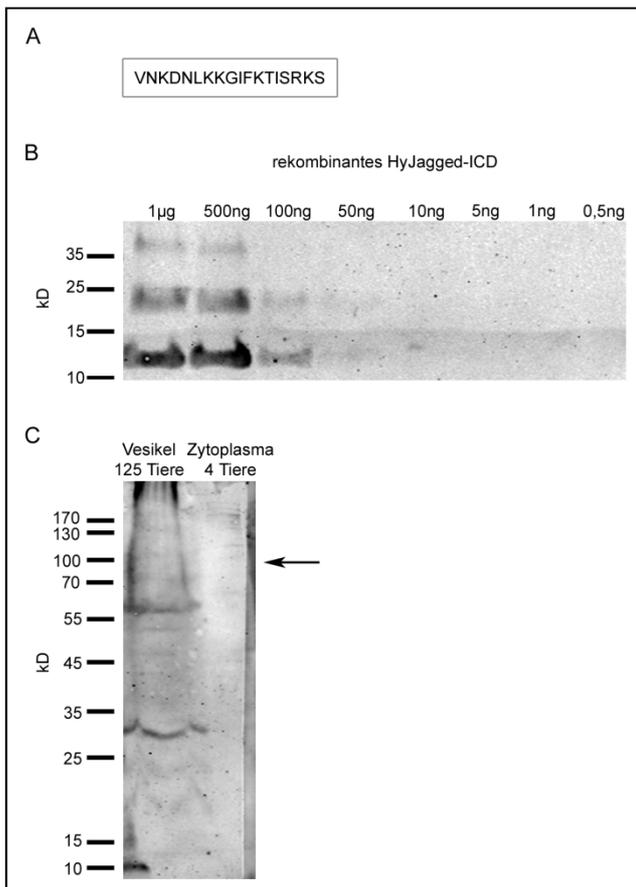
licher Größen (siehe Abb. 2-12 B, E). Die kleineren überlagern dabei mit denen des HyJagged-GFP (siehe Abb. 2-12 C, F), die größeren füllen dagegen die HyJagged-GFP-Ringe aus. HvNotch und HyJagged halten sich demnach beide in endozytotischen Vesikeln unterschiedlicher Größen auf. Im Falle von HvNotch bestätigen diese Ergebnisse die von Käsbauer *et al.* (2007).



**Abb. 2-12:** Überexpression von HyJagged-GFP und HvNotch-RFP in *Hydra*, lebend; (A, D) HyJagged-GFP; (B, E) HvNotch-RFP; (C, F) Überlagerung aller Kanäle in Falschfarben: HyJagged-GFP (grün), HvNotch-RFP (rot); Konfokale Schnitte; Maßstab: 10µm.

Schließlich sollte untersucht werden, wie sich endogenes HyJagged bezüglich seiner Expression und Lokalisation verhält. Dazu wurde ein Peptidantikörper in Kaninchen hergestellt. Das synthetisch hergestellte Peptid entspricht einem Bereich der intrazellulären Domäne von HyJagged

(siehe Abb. 2-13 A und Abschnitt 5.1.6), so dass der entsprechende Antikörper anti-JAG-IC-Antikörper benannt wurde. Dieser benötigt für eine spezifische Erkennung mindestens 100ng rekombinantes HyJagged-IC (siehe Abb. 2-13 B).



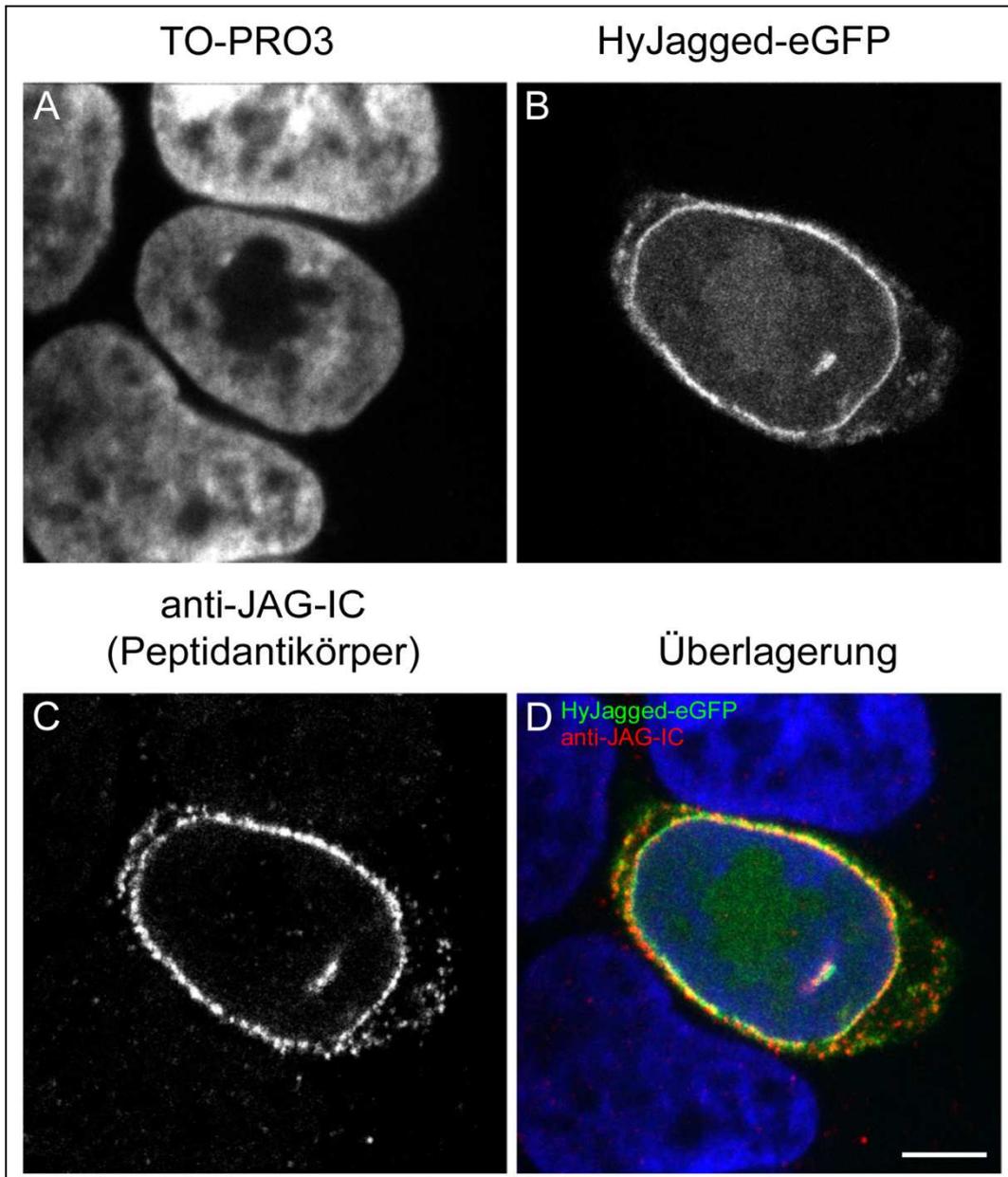
**Abb. 2-13:** Eigenschaften von anti-JAG-IC-Peptidantikörper; (A) Synthetisches, HyJagged-spezifisches Peptid zur Immunisierung von Kaninchen; (B) Erkennung von rekombinatem HyJagged-IC durch anti-JAG-IC-Peptidantikörper; (C) Nachweis von endogenem HyJagged in der Vesikel- und Zytoplasmafraktion von je 125 bzw. 4 Tieren; Endogenes HyJagged: ~96kD, rekombinantes HyJagged-IC: ~10kD.

Auch endogenes Protein sollte dieser Antikörper erkennen. Dazu wurden Hydren homogenisiert, die Hydrazellen durch differentielle Zentrifugation

fraktioniert und die resultierenden Vesikel- und Zytoplasmafraktionen in einem Western Blot mit dem anti-JAG-IC-Antikörper eingesetzt. Aus Abb. 2-13 C wird ersichtlich, dass dieser Antikörper mehrere Banden in der Vesikelfraktion erzeugt, mit deutlichen Banden bei ~60kD und ~30kD. Eine dem Vollängen-HyJagged entsprechende sehr schwache Bande bei ~96kD ist ebenfalls erkennbar. Im Verlauf der Fraktionierung kommt es demnach scheinbar zur Fragmentierung des Vollängenproteins, so dass nur wenig endogenes HyJagged identifiziert werden kann.

Der anti-JAG-IC-Antikörper wurde außerdem auf seine Eignung für Immunfluoreszenzexperimente getestet. Dazu wurde *Hyjagged* zunächst in den pEGFP-N1-Vektor kloniert, so dass es nach Transfektion von humanen HEK293T-Zellen mit diesem Konstrukt zur Überexpression des HyJagged-GFP-Fusionsproteins kommt. Derart transformierte Zellen wurden mit dem anti-JAG-IC-Antikörper gefärbt.

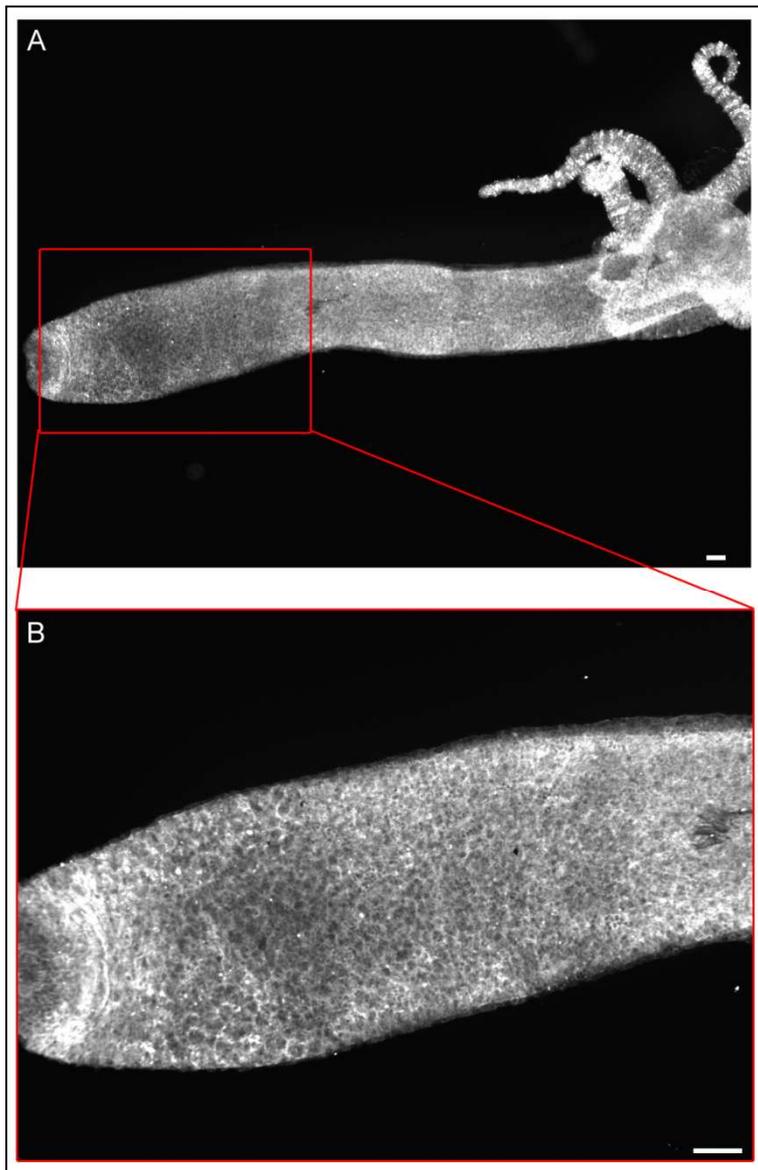
Ektopisches HyJagged-GFP erscheint dabei überwiegend in der Kern- und ER-Membran. Zusätzlich ist es in einer unbekanntem Struktur im Zellkern lokalisiert (siehe Abb. 2-14). Dies entspricht nicht der zuvor an Hydrazellen beobachteten Lokalisation von überexprimiertem HyJagged-GFP in endozytotischen Vesikeln und lässt vermuten, dass es in humanen Zellen zur falschen Prozessierung des *Hydra* Proteins kommt. In Abb. 2-14 D wird allerdings die Überlagerung von HyJagged-GFP mit der anti-JAG-IC-Färbung sichtbar. Demnach erkennt dieser Peptidantikörper spezifisch überexprimiertes HyJagged und kann für weitere Immunfluoreszenzfärbungen an *Hydra* eingesetzt werden.



**Abb. 2-14:** Nachweis von HyJagged-GFP mit anti-JAG-IC-Peptidantikörper; (A) DNA-Färbung mit TO-PRO3; (B) HyJagged-GFP; (C) anti-JAG-IC-Färbung; (D) Überlagerung aller Kanäle in Falschfarben: DNA (blau), HyJagged-GFP (grün), anti-JAG-IC-Färbung (rot); Konfokale Schnitte; Maßstab: 5µm.

Die Expression des HyJagged sollte deshalb am Ganztierpräparat betrachtet werden. Nachdem es sich bei HyJagged um ein Transmembranprotein handelt, das als Ligand für den Notch-Rezeptor agieren sollte, wird es an der Plasmamembran erwartet. Um dies zu zeigen, wurden ganze Hydren nach Fixierung mit 2% PFA/70% Ethanol in PBS und anschließender Ethanolreihe mit dem anti-JAG-IC-Antikörper gefärbt.

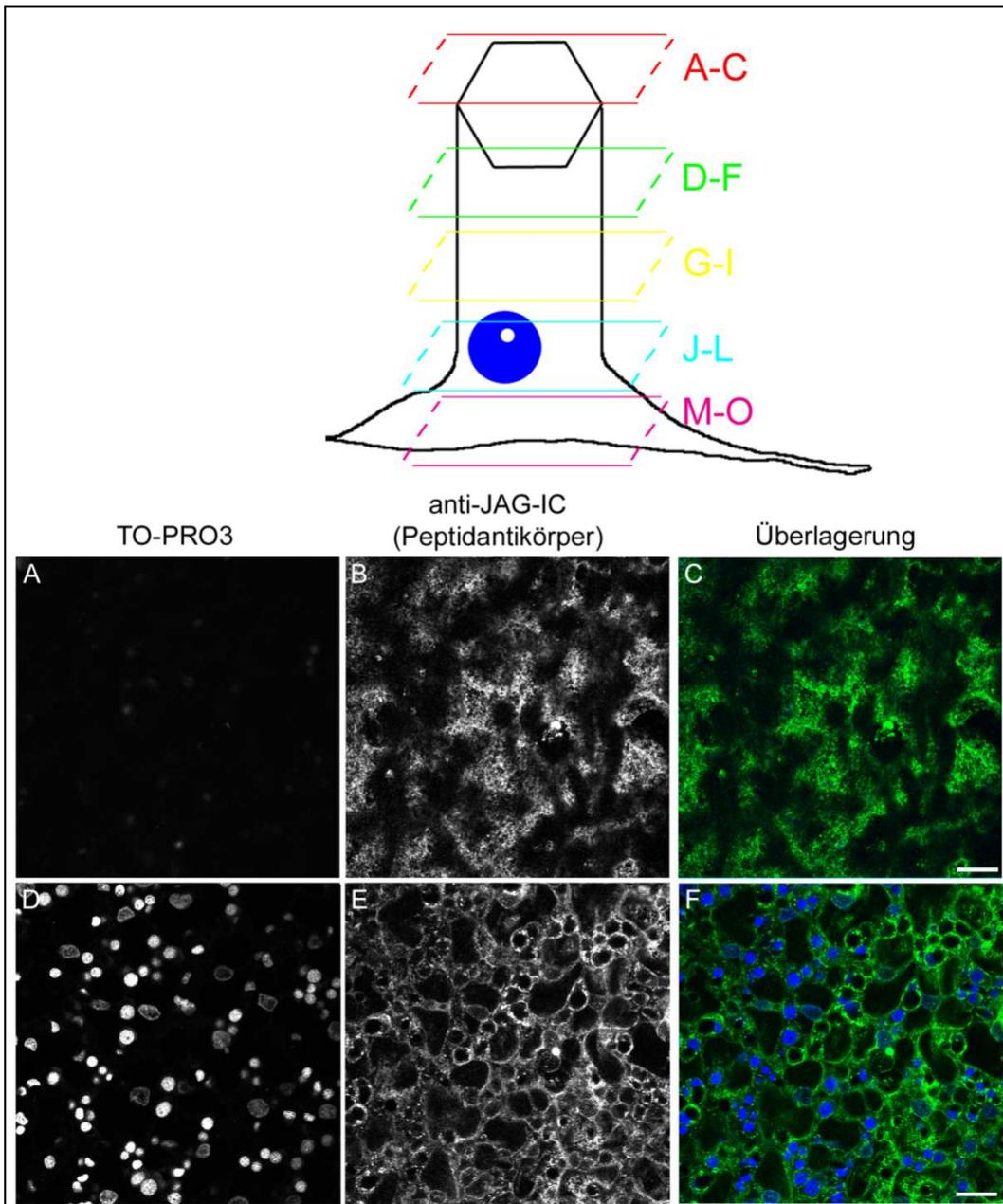
Dabei erkennt man eine Membranfärbung im gesamten Tier, vor allem aber im Stiel (siehe Abb. 2-15).



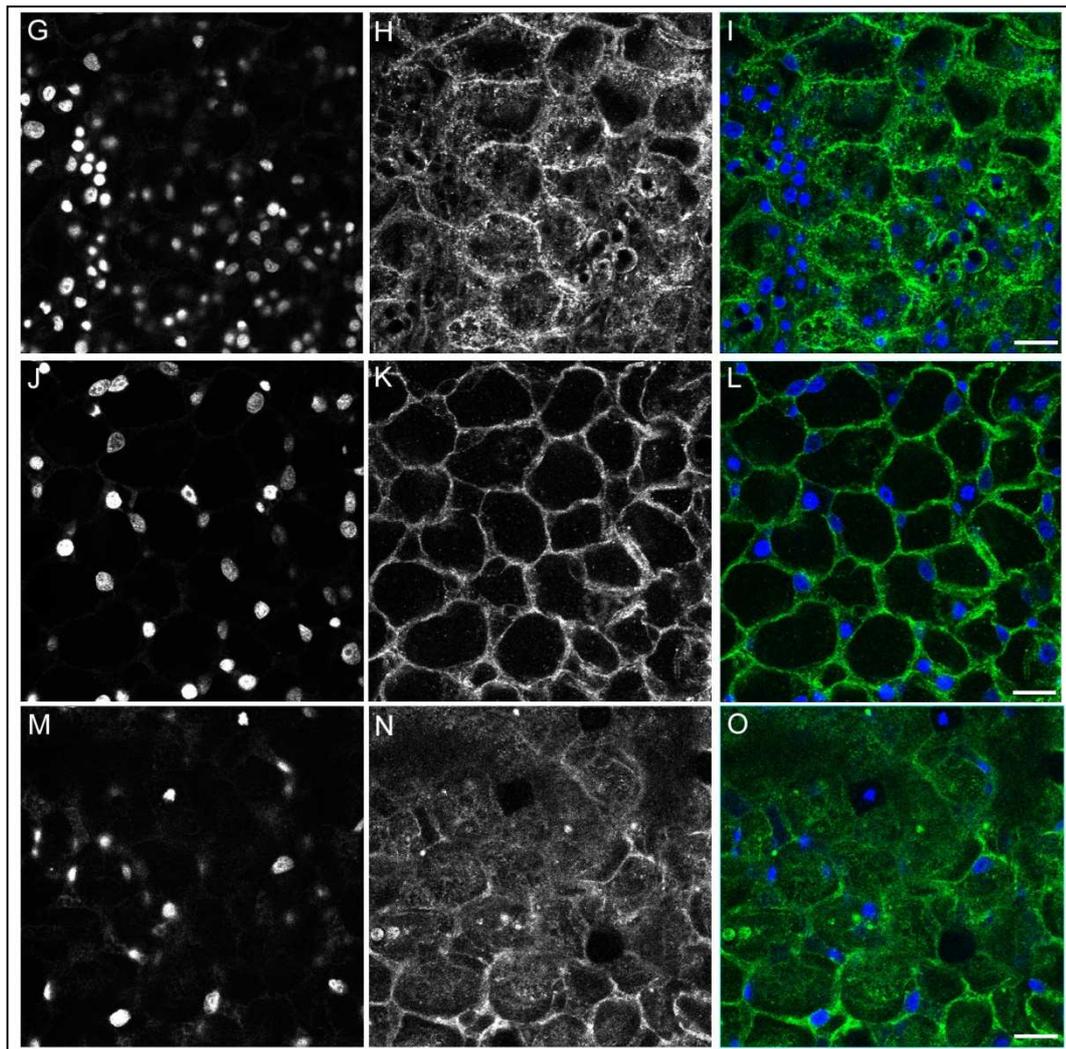
**Abb. 2-15:** Immunfluoreszenzfärbung an ganzer *Hydra* mit dem anti-JAG-IC-Peptidantikörper nach Fixierung mit 2% PFA/70% Ethanol und Ethanolreihe; Maßstab: 100µm.

Derart gefärbte Hydren wurden anschließend genauer betrachtet. Es wurden konfokale Schnitte von der Oberfläche des Tieres bis zur Mesoglea angefertigt. Dabei wird zunächst die unebene Außenfläche erkennbar

(siehe Abb. 2-16 A-C). In einer tieferen Ebene erscheinen die interstitiellen Zellen und ihre Differenzierungsprodukte, wobei der anti-JAG-IC-Antikörper in diesen Zellen globuläre Strukturen im Zytoplasma färbt (siehe Abb. 2-16 D-F). Eine eindeutige Lokalisation von HyJagged an der Membran ist nicht festzustellen. Erst in tieferliegenden Schnitten wird eine Membranfärbung deutlich sichtbar (siehe Abb. 2-16 G-I). Diese wird in einer Ebene, in der ausschließlich Epithelzellen und die Zellkerne dieser ektodermalen Zellen vorliegen, noch eindeutiger. Neben der Membranfärbung liegt auch eine Färbung im Zytoplasma vor, vermehrt um den Zellkern herum (siehe Abb. 2-16 J-L). Diese Färbungen verschwinden schließlich auf Höhe der Mesoglea (siehe Abb. 2-16 M-O).



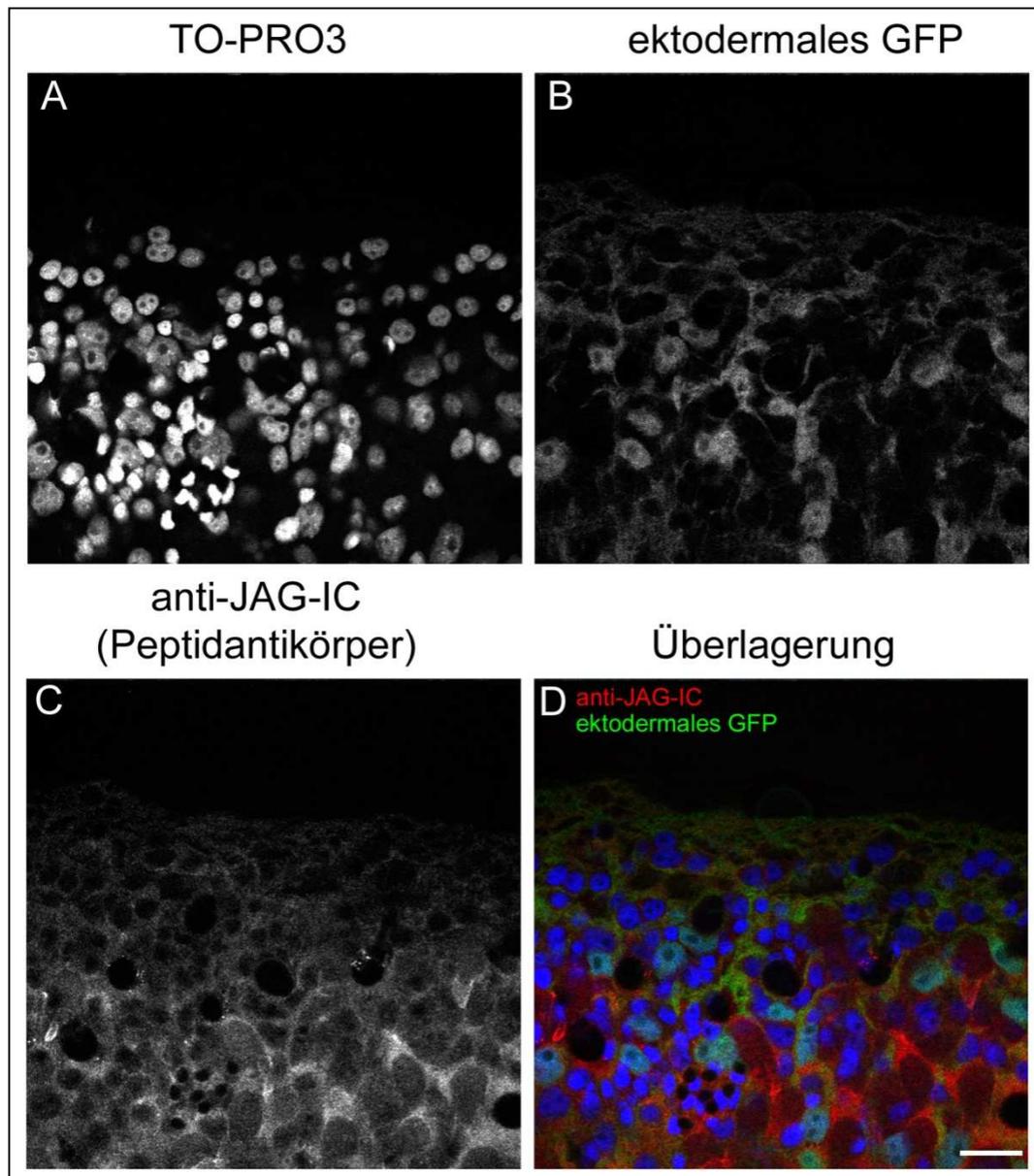
**Abb. 2-16:** Immunfluoreszenzfärbungen an ganzen Tieren mit dem anti-JAG-IC-Peptidantikörper; Membranfärbung; (A, D, G, J, M) DNA-Färbung mit TO-PRO3; (B, E, H, K, N) anti-JAG-IC-Färbung; (C, F, I, L, O) Überlagerung aller Kanäle in Falschfarben: DNA (blau), anti-JAG-IC-Färbung (grün); Konfokale Schnitte, Maßstab: 20µm - Fortsetzung auf nächster Seite.



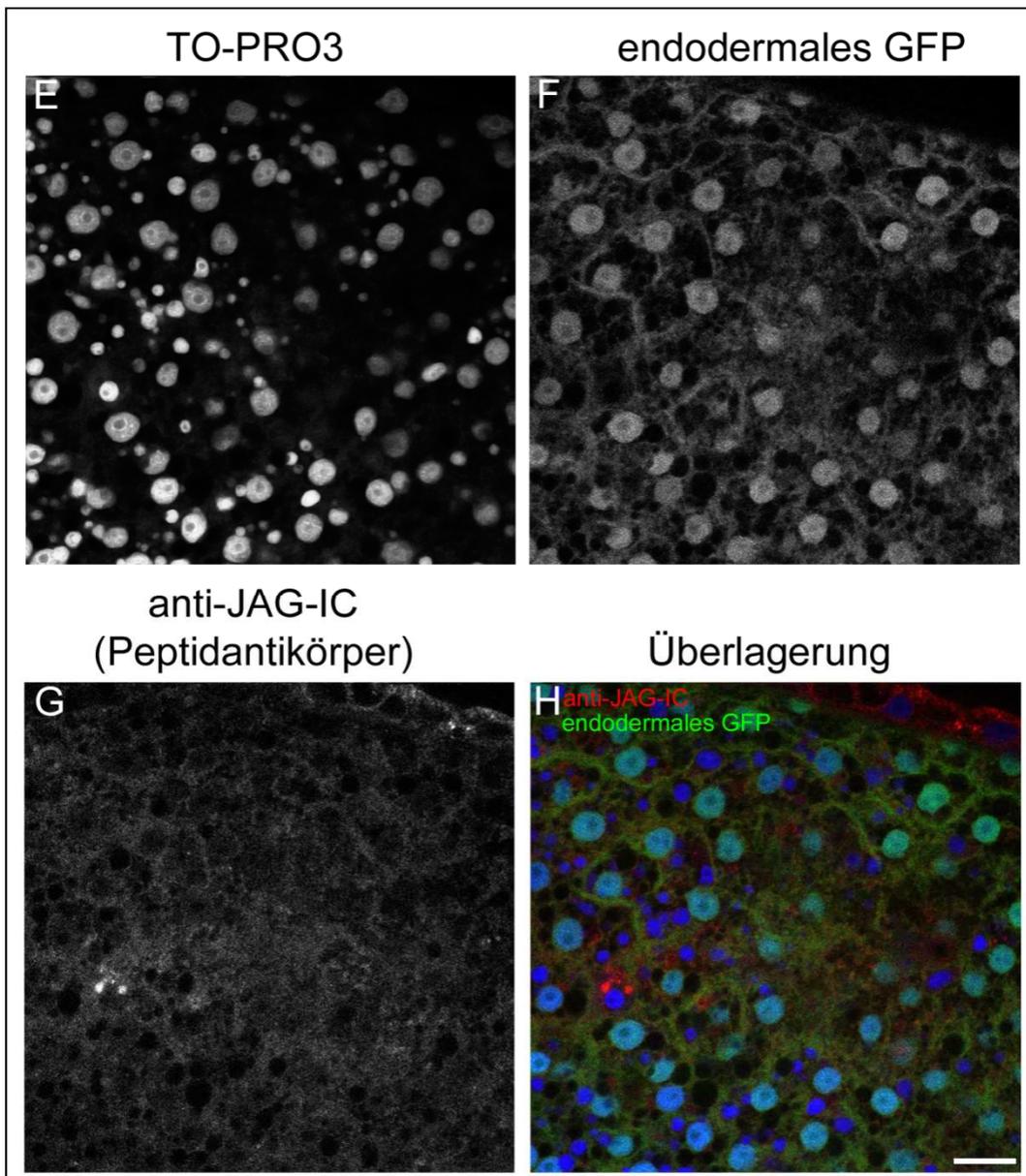
**Abb. 2-16 – Fortsetzung:** Immunfluoreszenzfärbungen an ganzen Tieren mit dem anti-JAG-IC-Peptidantikörper; Membranfärbung; (A, D, G, J, M) DNA-Färbung mit TO-PRO3; (B, E, H, K, N) anti-JAG-IC-Färbung; (C, F, I, L, O) Überlagerung aller Kanäle in Falschfarben: DNA (blau), anti-JAG-IC-Färbung (grün); Konfokale Schnitte, Maßstab: 20µm.

Um welche Zelltypen es sich bei den HyJagged-positiven Zellen genau handelt wurde im Folgenden durch Doppelfärbungen untersucht. Zunächst wurden transgene Hydren, die in den ektodermalen bzw. endodermalen Epithelzellen GFP unter Kontrolle des Aktin-Promoters exprimieren

(Wittlieb et al., 2006), mit dem anti-JAG-IC-Antikörper gefärbt. Dabei wurde 4%PFA als Fixativ gewählt, das überexprimiertes GFP zwar erhält, das aber gleichzeitig zum Verlust der Membranfärbung führt. Ektopisches GFP ist überwiegend in den Zellkernen der jeweiligen Epithelzellen aufzufinden (siehe Abb. 2-17 B, F). Die anti-JAG-IC-Färbung ist dagegen im Zytoplasma der entsprechenden Zellen erkennbar (siehe Abb. 2-17 C, G). HyJagged liegt demnach in den Epithelzellen beider Epithelien vor.

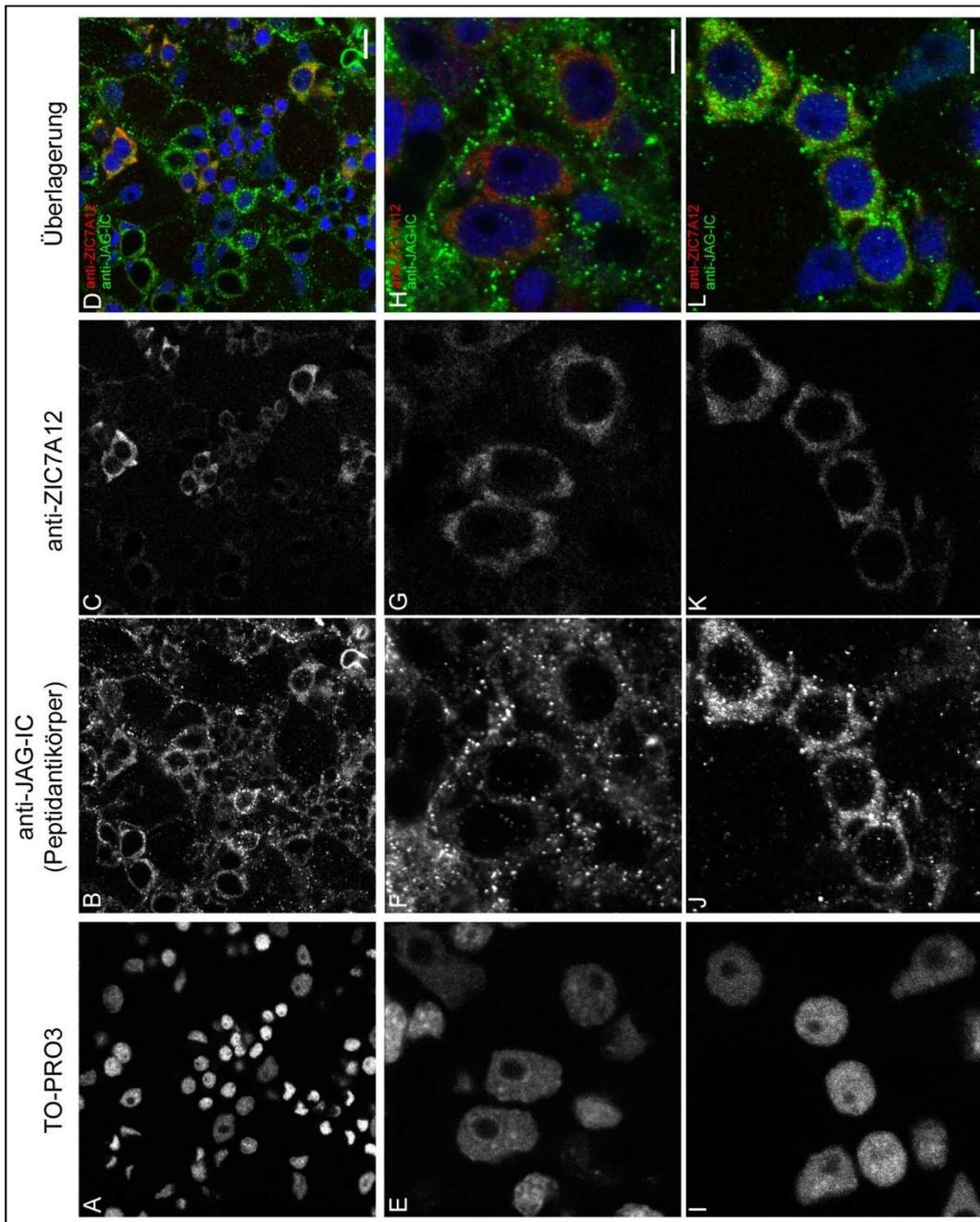


**Abb. 2-17:** Immunfluoreszenzfärbungen an ganzen Tieren mit dem anti-JAG-IC-Peptidantikörper; (A, E) DNA-Färbung mit TO-PRO3; (C, G) anti-JAG-IC-Färbung; (B) ektodermales GFP; (F) endodermales GFP; (D, H) Überlagerung aller Kanäle in Falschfarben: DNA (blau), ekto-/endodermales GFP (grün), anti-JAG-IC-Färbung (rot); Konfokale Schnitte, Maßstab: 20µm – Fortsetzung auf nächster Seite.

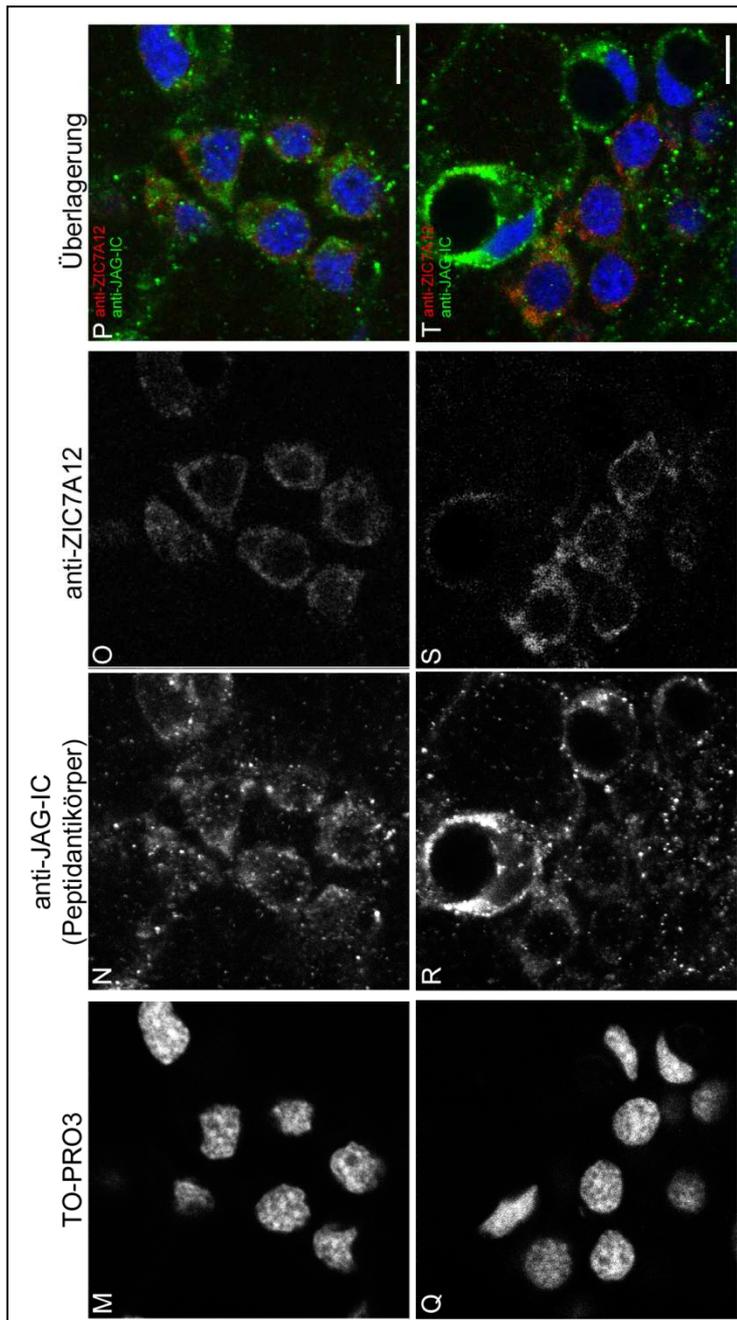


**Abb. 2-17 – Fortsetzung:** Immunfluoreszenzfärbungen an ganzen Tieren mit dem anti-JAG-IC-Peptidantikörper; (A, E) DNA-Färbung mit TO-PRO3; (C, G) anti-JAG-IC-Färbung; (B) ektodermales GFP; (F) endodermales GFP; (D, H) Überlagerung aller Kanäle in Falschfarben: DNA (blau), ekto-/endodermales GFP (grün), anti-JAG-IC-Färbung (rot); Konfokale Schnitte, Maßstab: 20µm.

Die HyJagged-Expression wurde weiterhin in den interstitiellen Zellen und deren Differenzierungsprodukten untersucht. Dazu wurden Co-Immunfluoreszenzfärbungen mit dem anti-ZIC7A12-Antikörper durchgeführt. Dieser färbt einzelne und doppelte interstitielle Zellen, sowie Nematoblasten (siehe Abschnitt 2.3.1).



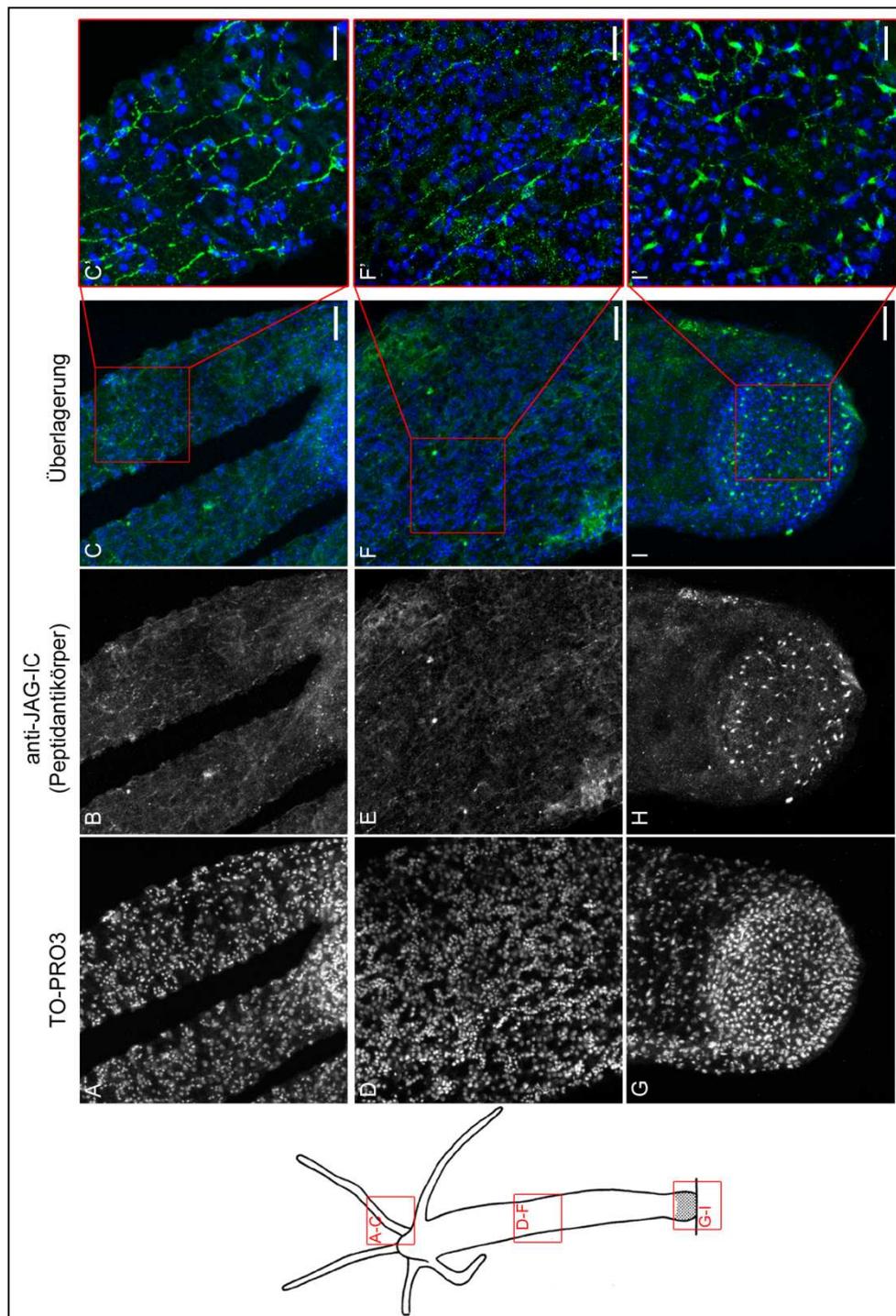
**Abb. 2-18:** Co-Immunfluoreszenzfärbungen an ganzen Tieren mit anti-JAG-IC-Peptidantikörper und anti-ZIC7A12-Antikörper; (A, E, I, M, Q) DNA-Färbung mit TO-PRO3; (B, F, J, N, R) anti-JAG-IC-Färbung; (C, G, K, O, S) anti-ZIC7A12-Färbung; (D, H, L, P, T) Überlagerung aller Kanäle in Falschfarben: DNA (blau), anti-JAG-IC-Färbung (grün), anti-ZIC7A12-Färbung (rot); Konfokale Schnitte, Maßstab: (A-D) 10µm, (E-T) 5µm – Fortsetzung auf nächster Seite.



**Abb. 2-18 – Fortsetzung:** Co-Immunfluoreszenzfärbungen an ganzen Tieren mit anti-JAG-IC-Peptidantikörper und anti-ZIC7A12-Antikörper; (A, E, I, M, Q) DNA-Färbung mit TO-PRO3; (B, F, J, N, R) anti-JAG-IC-Färbung; (C, G, K, O, S) anti-ZIC7A12-Färbung; (D, H, L, P, T) Überlagerung aller Kanäle in Falschfarben: DNA (blau), anti-JAG-IC-Färbung (grün), anti-ZIC7A12-Färbung (rot); Konfokale Schnitte, Maßstab: (A-D) 10µm, (E-T) 5µm.

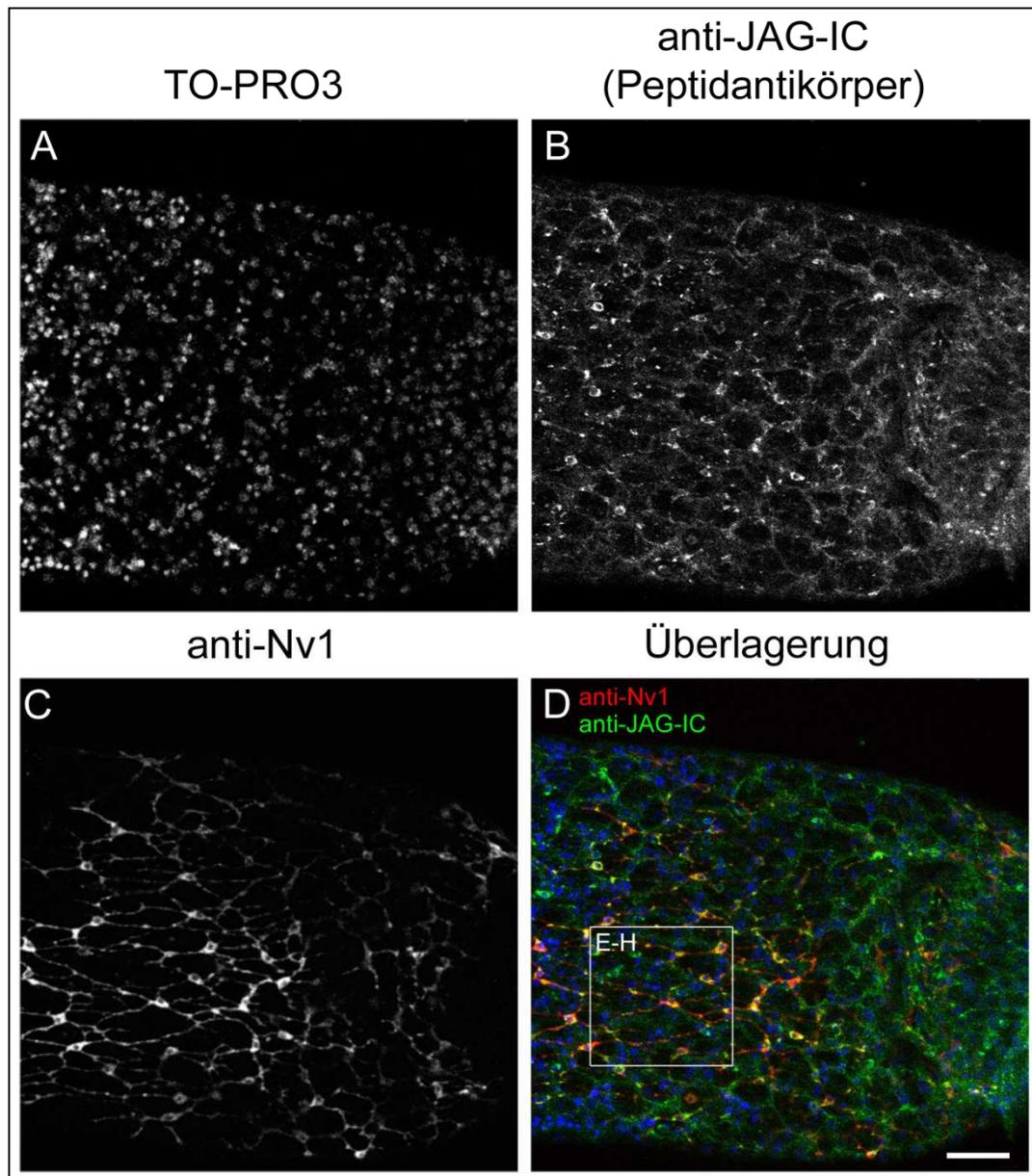
Bereits im Überblick wird die Überlagerung der anti-JAG-IC- mit der anti-ZIC7A12-Färbung in einzelnen Zellen erkennbar (siehe Abb. 2-18 A-D). Abb. 2-18 E-H zeigt dabei einzelne und doppelte interstitielle Zellen, die durch beide Antikörper detektiert werden, während Abb. 2-18 I-L eine Doppelfärbung von Nematoblasten ohne Vakuole zeigt. Auch Nematoblasten mit sehr kleiner Vakuole enthalten sowohl HyJagged als auch HyZic (siehe Abb. 2-18 M-P). Lediglich reife Nematocyten zeigen zwar keine anti-ZIC7A12-, aber anti-JAG-IC-Färbung (siehe Abb. 2-18 Q-T).

Im Überblick über die gesamte *Hydra* erscheinen allerdings in unterschiedlichen Regionen Nervenzellen besonders stark mit dem anti-JAG-IC-Antikörper gefärbt. Sowohl in den Tentakeln (siehe Abb. 2-19 A-C), als auch im Rumpf (siehe Abb. 2-19 D-F) sind diese Zellen erkennbar. Besonders auffällig sind allerdings Nervenzellen in der Fußscheibe, wie man bereits im Überblick über das gesamte Tier erkennt (siehe Abb. 2-19 G-I).

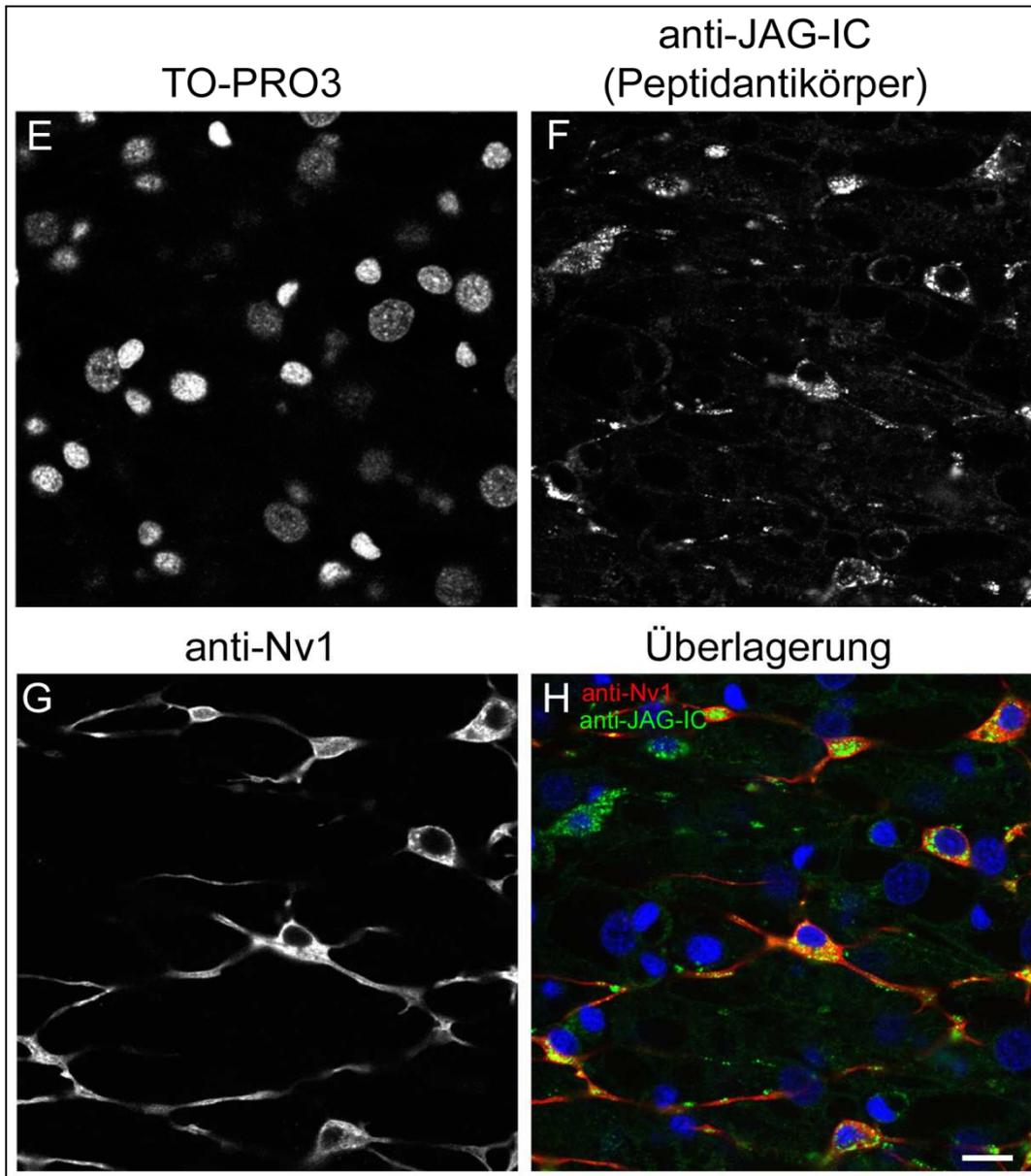


**Abb. 2-19:** Immunfluoreszenzfärbungen an ganzen Tieren mit dem anti-JAG-IC-Peptidantikörper; (A, D, G) DNA-Färbung mit TO-PRO3; (B, E, H) anti-JAG-IC-Färbung; (C, F, I, C', F', I') Überlagerung aller Kanäle in Falschfarben: DNA (blau), anti-JAG-IC-Färbung (grün); Konfokale Projektionen; Maßstab: (A-I) 50µm, (C', F', I') 20µm.

Dass es sich bei diesen Färbungen um Nervenzellen handelt, wurde durch Co-Immunfluoreszenzen mit dem anti-Nv1-Antikörper bestätigt (siehe Abb. 2-20). Durch die Überlagerung dieser Färbungen wird zudem deutlich, dass es sich bei diesen HyJagged-positiven Zellen um Ganglionzellen handelt, nachdem Nv1-positive Zellen im Stiel als solche identifiziert wurden (Hobmayer *et al.*, 1990).



**Abb. 2-20:** Co-Immunfluoreszenzfärbungen an ganzen Tieren mit anti-JAG-IC-Peptidantikörper und anti-Nv1-Antikörper; Stiel; (A, E) DNA-Färbung mit TO-PRO3; (B, F) anti-JAG-IC-Färbung; (C, G) anti-Nv1-Färbung; (D, H) Überlagerung aller Kanäle in Falschfarben: DNA (blau), anti-JAG-IC-Färbung (grün), anti-Nv1-Färbung (rot); Konfokale Projektionen, Maßstab: (A-D) 50µm, (E-H) 10µm – Fortsetzung auf nächster Seite.



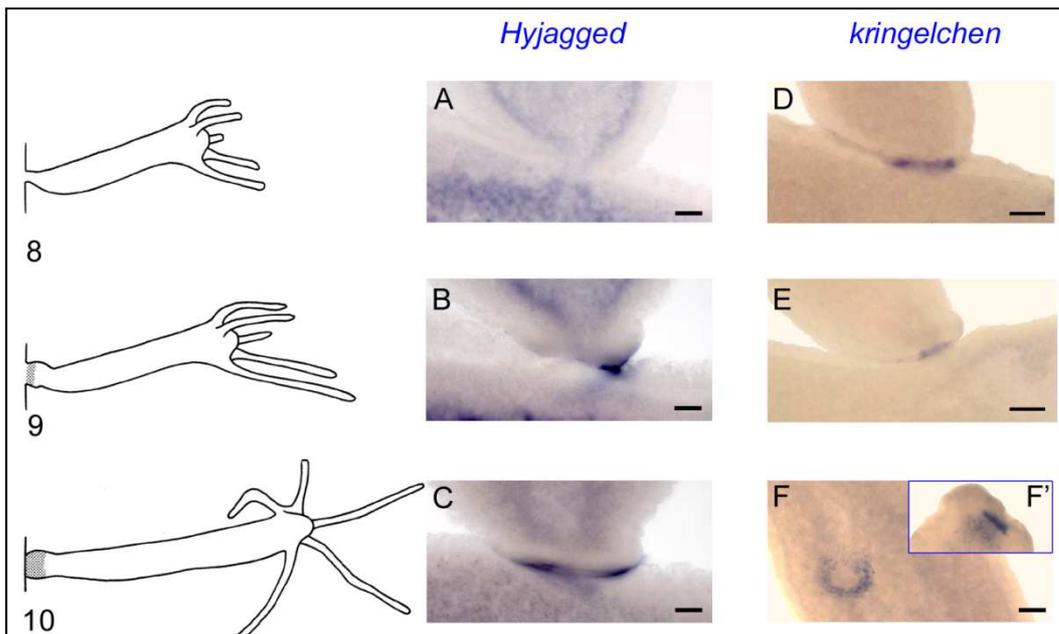
**Abb. 2-20 – Fortsetzung:** Co-Immunfluoreszenzfärbungen an ganzen Tieren mit anti-JAG-IC-Peptidantikörper und anti-Nv1-Antikörper; Stiel; (A, E) DNA-Färbung mit TO-PRO3; (B, F) anti-JAG-IC-Färbung; (C, G) anti-Nv1-Färbung; (D, H) Überlagerung aller Kanäle in Falschfarben: DNA (blau), anti-JAG-IC-Färbung (grün), anti-Nv1-Färbung (rot); Konfokale Projektionen, Maßstab: (A-D) 50µm, (E-H) 10µm.

Die hier durchgeführten Immunfluoreszenzfärbungen konnten zeigen, dass HyJagged einerseits an Membranen vorliegt, andererseits in endozytischen Vesikeln im Zytoplasma aller Zelltypen. So wurden mit dem anti-JAG-IC-Antikörper sowohl ektodermale als auch endodermale Epithelzellen am gesamten Tier gefärbt. Auch Nematocyten und Nematoblasten zeigten eine solche Färbung. Co-Immunfluoreszenzen mit den anti-ZIC7A12- und ant-Nv1-Antikörpern konnten zudem HyJagged in zahlreichen einzelnen und doppelten interstitiellen Zellen sowie in Nervenzellen nachweisen.

Für effiziente Notch-Signaltransduktion wird eine vermehrte HyJagged-Expression erwartet. Dies konnte auf Proteinebene allerdings nicht beobachtet werden, weshalb im Folgenden die Genexpression betrachtet wurde.

### **2.1.3 Expressionsmuster von *Hyjagged***

Münder *et al.* (2010) konnten zeigen, dass die Notch-Signaltransduktion in *Hydra* eine entscheidende Rolle bei der Knospung spielt. Aus diesem Grund wurden *in situ*-Hybridisierungen an knospenden Hydren unterschiedlicher Stadien mit einer *Hyjagged*-Volllängen-Sonde durchgeführt. Erkennbar wird, dass *Hyjagged* in späten Knospenstadien exprimiert wird. Dies geschieht zu einem Zeitpunkt, wenn die Knospe mit der Differenzierung von Fußzellen beginnt. Die *Hyjagged*-Expression wird auf das Muttertier in ektodermalen Zellen unmittelbar angrenzend an die Knospe lokalisiert (siehe Abb. 2-21 B, C). Das Signal ist weiterhin bis zum Ablösen der Knospe als Ring vorhanden.



**Abb. 2-21:** *In situ*-Hybridisierungen an ganzen Tieren für *Hyjagged* und *kringelchen*; Zeichnungen nach Otto & Campbell (1977) zeigen späte Knospenstadien; (A) keine *Hyjagged*-Expression im Stadium 8; (D) *kringelchen*-Expression im Stadium 8; (B, E) *Hyjagged* und *kringelchen* im Stadium 9, wenn die Differenzierung der Fußzellen beginnt; (C, F) *Hyjagged* und *kringelchen* am Ende der Knospung, wenn sich die Knospe ablöst. In F löste sich die Knospe während der Färbeprozedur, die Expression als Ring auf der Mutter (F) sowie am Fußende der Knospe (F') wird getrennt gezeigt; NBT/BCIP wurde für die Färbereaktion von *Hyjagged* verwendet (blaue Signale); *kringelchen in situ*-Hybridisierungen aus Münder *et al.*, 2010 (D, E) und von S. Münder (F, F'); Maßstab: 20µm.

Dieses Signal in den späten Knospenstadien ist dem des FGF-Rezeptors *kringelchen* sehr ähnlich (Sudhop *et al.*, 2004; Münder *et al.*, 2010). Erkennbar wird, dass bei Einschnürung der Knospe ein *kringelchen*-Signal vorhanden ist, während *Hyjagged* dagegen zu diesem Zeitpunkt nicht detektiert wird (siehe Abb. 2-21 A und D). Sobald die Differenzierung von Epithelzellen zu Fußscheibe beginnt, Mutter und Knospe allerdings noch verbunden sind (Stadium 9), ist sowohl *kringelchen*- als auch *Hyjagged*-

Expression erkennbar (siehe Abb. 2-21 B und E). Im weiteren Verlauf der Knospung löst sich der junge Polyp vom Elterntier ab. Zurück bleiben sowohl ein ringförmiges *Hyjagged*-Signal als auch ein ringförmiges *kringelchen*-Signal am Muttertier (siehe Abb. 2-21 C und F). Zusätzlich ist *kringelchen* am Fuß der Knospe detektierbar (siehe Abb. 2-21 F'), *Hyjagged* jedoch nicht.

Die Expression von *Hyjagged* sollte außerdem nach Inhibierung der Notch-Signaltransduktion durch DAPT betrachtet werden. Dazu wurden Hydren, die gerade eben mit der Knospung begannen (Stadium 3-5 nach Otto & Campbell, 1977), für 48 Stunden mit DAPT behandelt. Münder *et al.* (2010) zeigten bereits zuvor, dass bei solcher Inhibierung des Notch-Signalwegs die Einschnürung der Knospe verhindert wird. Stattdessen entstehen Y-Tiere, die niemals Fußzellen bilden. Aus diesem Grund konnten nach DAPT-Behandlung auch hier keine Knospen in den Stadien 8-10 gefunden werden, also auch keine Stadien, in denen die *Hyjagged*-Expression erwartet wird. In den früheren Knospenstadien kommt es außerdem auch nach DAPT-Behandlung zu keiner vermehrten Expression von *Hyjagged* (Daten nicht gezeigt).

Zusammengenommen zeigen diese *in situ*-Hybridisierungsexperimente, dass *Hyjagged* lediglich an der Knospenbasis später Stadien exprimiert wird. Die Lokalisation des Signals im Ektoderm des Muttertiers wird dabei durch den Vergleich mit *kringelchen* deutlich.

## **2.2 Modulatoren der Notch-Signaltransduktion in *Hydra***

Mit Ausnahme der Nervenzellen, die durch den anti-JAG-IC-Antikörper besonders stark gefärbt werden, zeigten bisherige Ergebnisse keine gravierenden Unterschiede in der Anwesenheit von HvNotch- und HyJagged-

Proteinen in verschiedenen Zellen von *Hydra*. Dennoch muss man davon ausgehen, dass der Notch-Signalweg in *Hydra* im adulten Tier auch differenziell an der Signaltransduktion beteiligt ist. Inhibierung des Notch-Signalwegs mit DAPT hat gezeigt, dass zum Beispiel Nematocyten differenzierung und Knospung, aber auch Musterbildung am Kopf spezifisch von Notch kontrolliert werden (Käsbauer *et al.*, 2007; Münder *et al.*, 2010; Doktorarbeit T. Käsbauer).

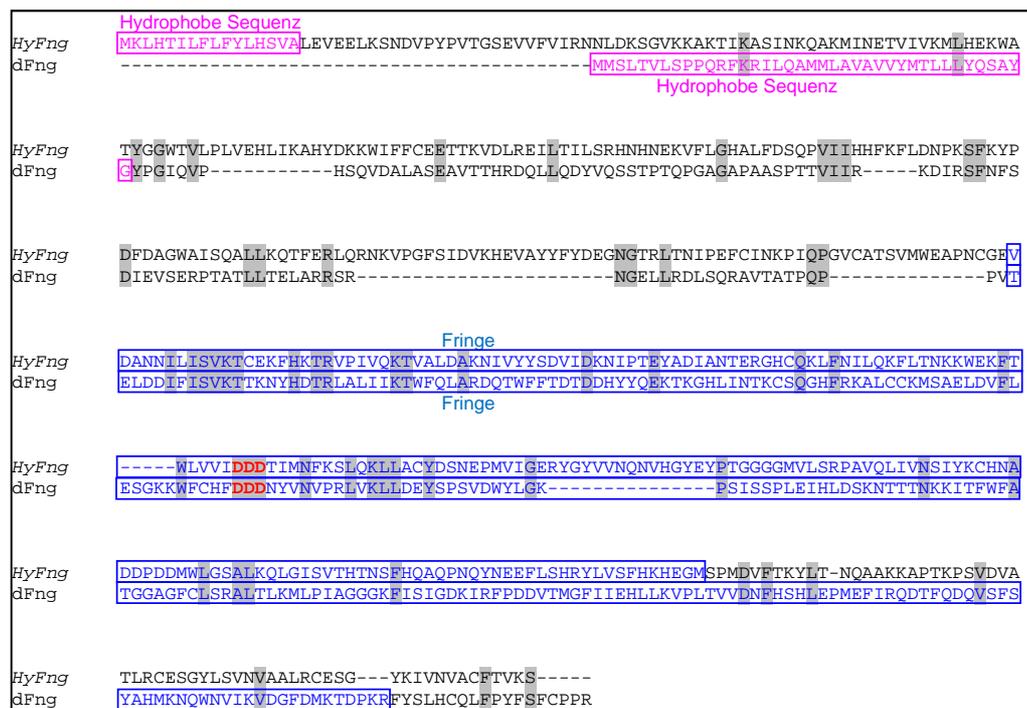
Es ist möglich, dass die Unterschiede in HvNotch- und HyJagged-Proteinen dabei nicht sehr groß sein müssen, möglicherweise zu klein, um sie mit Antikörpern zu detektieren. Es ist aber bekannt, dass die Notch-Signaltransduktion sehr stark durch post-translationale Modifikationen gesteuert wird. Bekannte Modulatoren sind dabei die  $\beta$ -1,3-N-Acetylglucosaminyltransferase Fringe, die bereits fukosylierte EGF-Wiederholungen von Notch glykosyliert (Munro & Freeman, 2000), sowie die E3-Ubiquitinligasen Neuralized und Mindbomb. Die beiden letzteren führen zur Monoubiquitinylierung der intrazellulären Domäne von DSL-Proteinen und erlauben damit die Epsin-abhängige, aktivierende Endozytose des Liganden (Chitnis, 2006). Diese Modulatoren wurden bisher in *Hydra* nicht identifiziert, so dass sich die vorliegende Arbeit damit befasst.

### **2.2.1 Fringe**

Die  $\beta$ -1,3-N-Acetylglucosaminyltransferase Fringe fügt Glykosylreste an bereits fukosylierte EGF-Wiederholungen von Notch an. Dies geschieht im endoplasmatischen Reticulum während sich der Notch-Rezeptor auf dem Weg zur Plasmamembran befindet. Bezeichnend für Fringe ist eine hydrophobe Region am N-Terminus, die einem Signalpeptid gleicht, aber nicht proteolytisch abgespalten wird. Weiterhin besitzt Fringe eine Fringe-

spezifische Domäne, die in ihrem aktiven Zentrum die konservierte DxD-Sequenz aufweist (Munro & Freeman, 2000).

Auf diesen Kenntnissen aufbauend wurde im *Hydra*-Genom mit Hilfe von „Blast“ mit *Fringe*-Genen aus anderen Organismen nach dem Homologen in *Hydra* gesucht. Es wurde ein Kandidat identifiziert, der eine N-terminale hydrophobe Sequenz sowie eine Fringe-spezifische Domäne mit DxD-Motif besitzt. Auf Grund dieser starken Homologien wurde er als *HyFng* bezeichnet. Der Sequenzvergleich der mutmaßlichen *HyFng*-Proteinsequenz mit dem Homologen aus *Drosophila*, *dFng*, bestätigt dies weiterhin.



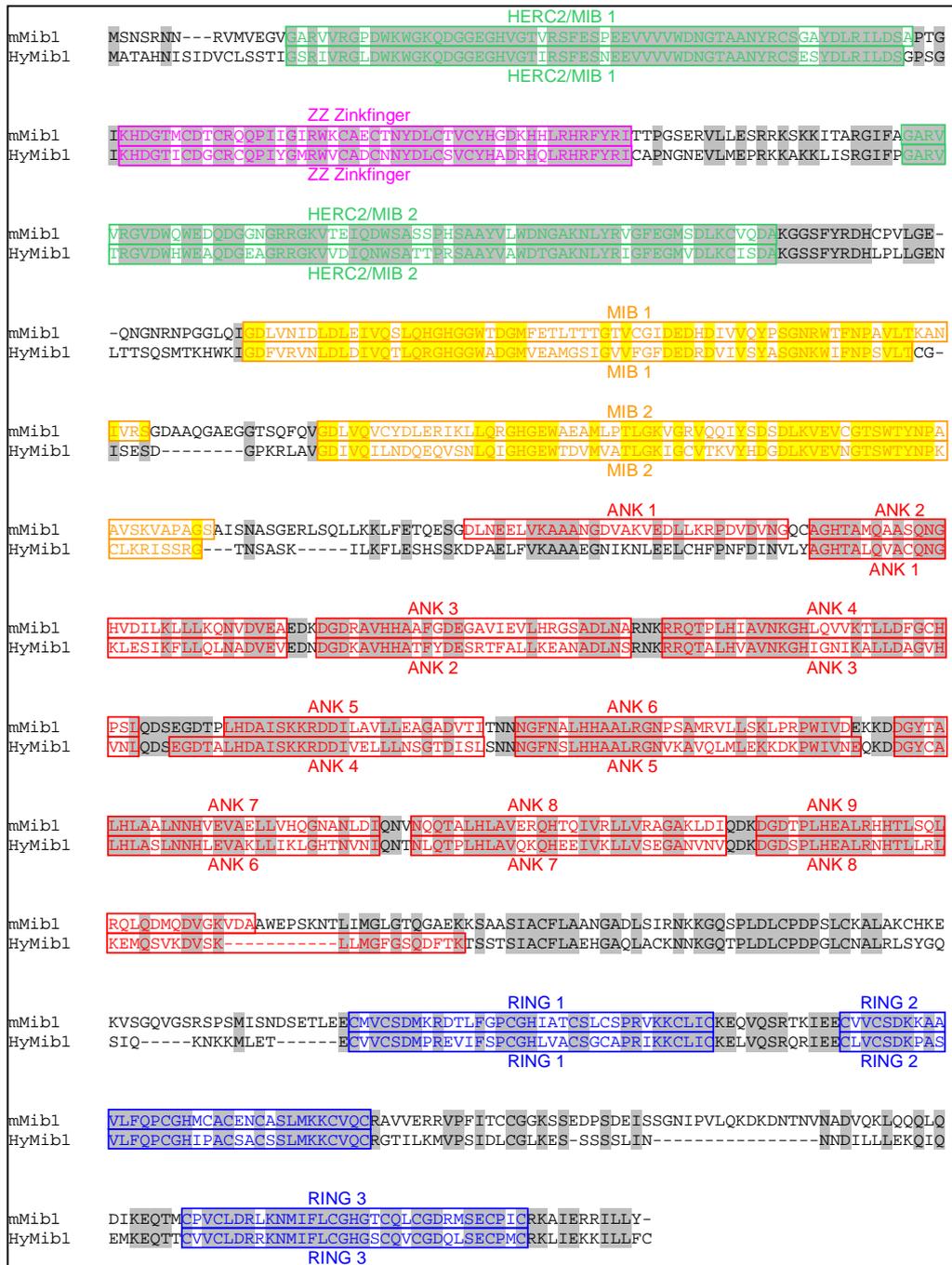
**Abb. 2-22:** Gegenüberstellung von *dFng* mit *HyFng*; Hydrophobe Sequenz (pink), Fringe-Domäne (blau); DxD-Motif (rot); Identische Aminosäuren sind grau hinterlegt.

### 2.2.2 Mindbomb

Auch die E3-Ubiquitinligase Mindbomb war bisher noch nicht identifiziert worden. Mindbomb ubiquitinyliert intrazelluläre Domänen von DSL-Liganden, genauso wie die E3-Ubiquitinligase Neuralized. Beide Enzyme sind sogar notwendig für die Liganden abhängige Aktivierung der Notch-Signaltransduktion (Chitnis, 2006). Sie besitzen eine RING-Domäne, sind aber ansonsten strukturell unterschiedlich (Le Borgne *et al.*, 2005). Neuralized weist eine spezifische Neuralized-Domäne auf, Mindbomb hat zusätzlich HERC2/MIB-, ZZ Zinkfinger-, MIB- und Ankyrin-Domänen.

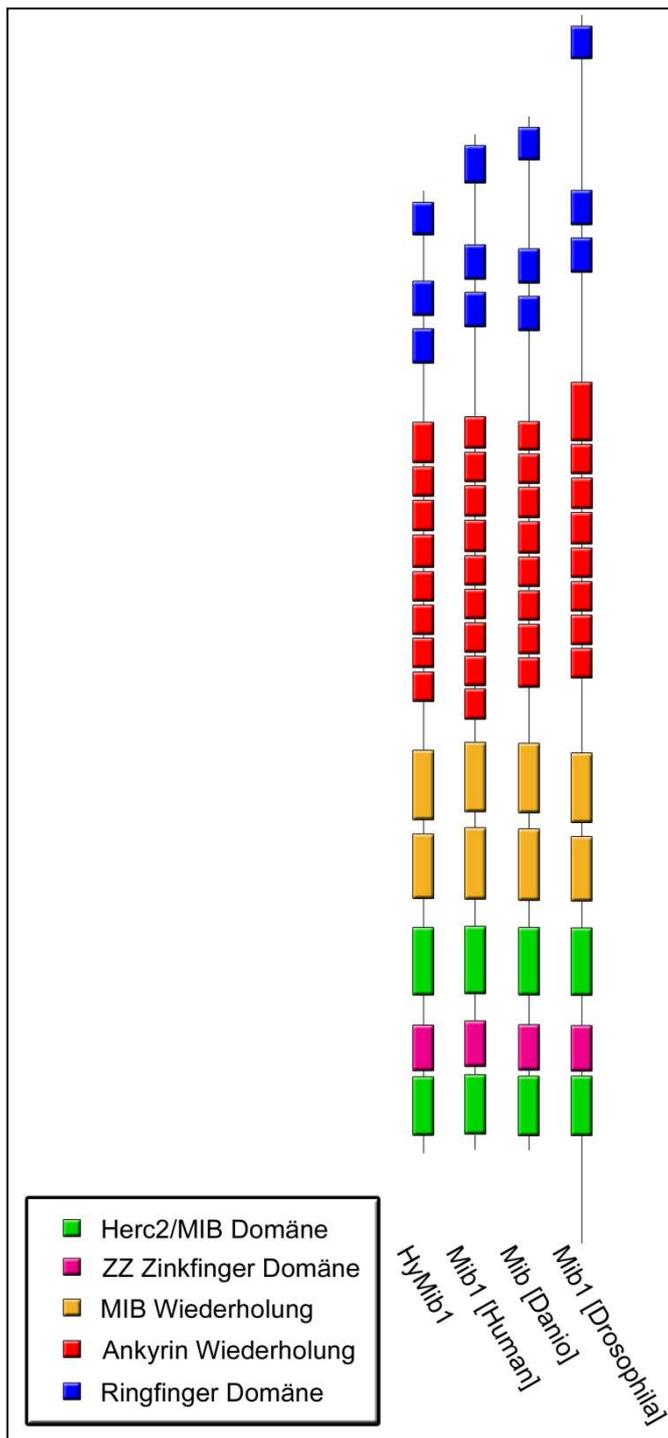
Im *Hydra*-Genom wurde durch „*Blast*“ homologer Gene aus anderen Organismen nach den entsprechenden Genen gesucht. Während kein Homolog zu *Neuralized* gefunden werden konnte, konnte ein Kandidat für *Mindbomb* identifiziert werden. Da dieser Kandidat alle erforderlichen Domänen aufweist, wurde er als *HyMib1* bezeichnet.

*HyMib1* wurde anschließend aus cDNA von *Hydra vulgaris* gewonnen, sequenziert und weiter analysiert. Der Sequenzvergleich des HyMib1 mit dem homologen Protein aus Maus, mMib1, zeigt die starke Homologie auf (siehe Abb. 2-23). Alle erforderlichen Domänen sind in HyMib1 vorhanden. Lediglich die Anzahl der Ankyrin-Wiederholungen unterscheidet sich leicht. Während mMib1 neun dieser Domänen aufweist, besitzt *Hydra* Mib1 lediglich acht Ankyrin-Wiederholungen.



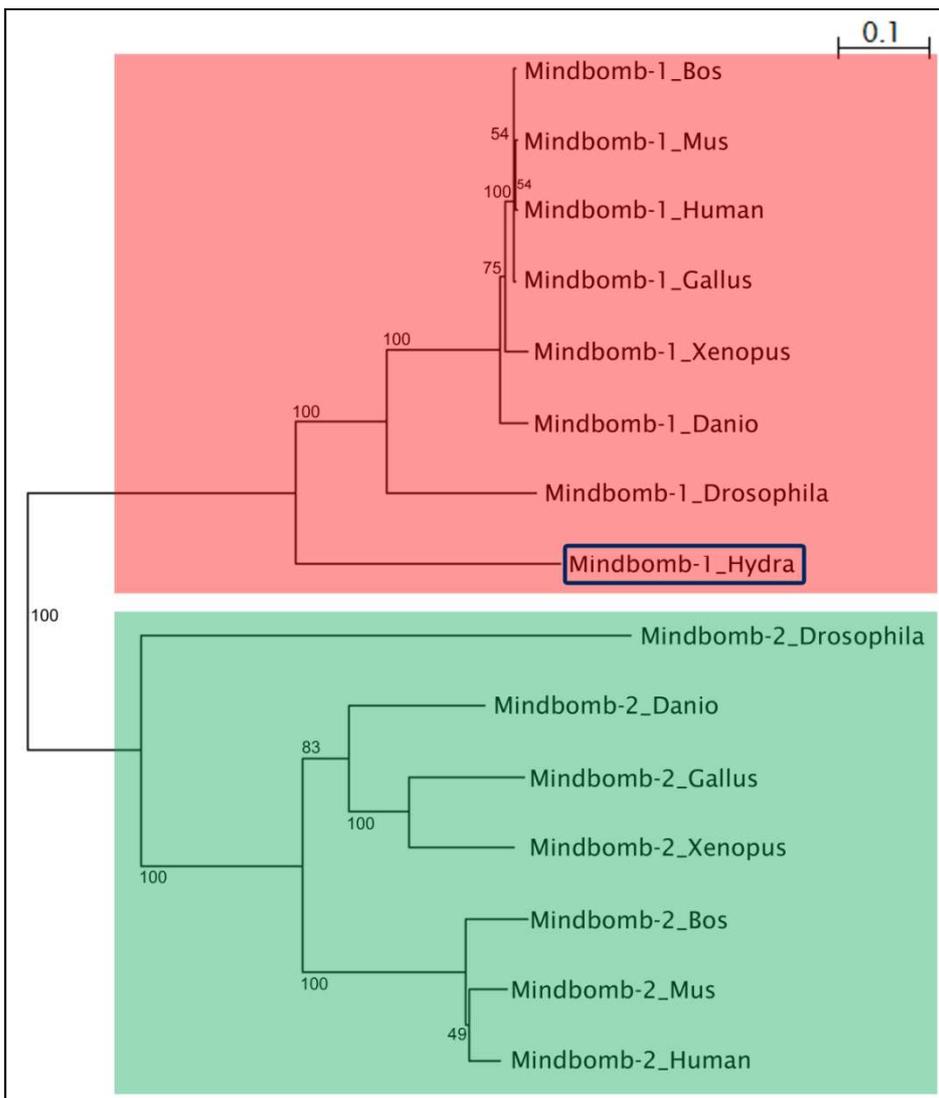
**Abb. 2-23:** Gegenüberstellung von mMib1 mit HyMib1; HERC2/MIB-Domäne (grün); ZZ Zinkfinger-Domäne (pink); MIB-Wiederholung (orange), Ankyrin-Wiederholung (rot), Ringfinger-Domäne (blau); Identische Aminosäuren sind grau bzw. gelb hinterlegt (Diplomarbeit Stefanie Eckert).

Die konservierte Domänenstruktur wird weiterhin durch die schematische Darstellung im Vergleich zu den Homologen aus *Drosophila*, Zebrafisch und Mensch deutlich (siehe Abb. 2-24). Auch hier ist erkennbar, dass lediglich die Anzahl der Ankyrin-Wiederholungen leicht unterschiedlich ist. Die Homologen aus Zebrafisch, *Drosophila* und *Hydra* besitzen acht, das humane Mib1 hat neun Ankyrin-Domänen.



**Abb. 2-24:** HyMib1-Domänenstruktur im Vergleich zu Mib1-Proteinen aus Mensch, Zebrafisch und *Drosophila*; HERC2/MIB-Domäne (grün); ZZ Zinkfinger-Domäne (pink); MIB-Wiederholung (orange), Ankyrin-Wiederholung (rot), Ringfinger-Domäne (blau).

Es wurde schließlich ein Stammbaum mit den Proteinsequenzen von HyMib1 und den Homologen aus diversen anderen Organismen erstellt (siehe Abb. 2-25). Der phylogenetische Baum basiert dabei auf einem „*Alignment*“ der Vollängenproteine unter Ausschluss der Positionen mit Lücken. Dabei wird deutlich, dass das homologe Protein in *Hydra* eindeutig zu Mindbomb1-Proteinen gruppiert.



**Abb. 2-25:** Mib-Stammbaum; *Neighbour joining tree* auf Basis eines *ClustalX-Alignments* diverser Mib-Proteine; Gruppierung in 2 Gruppen: Mib1 (rot), Mib2 (grün); Zahlen geben prozentuelle Werte der 10.000 *bootstraps* an (Diplomarbeit Stefanie Eckert).

### 2.3 Auswirkungen des Notch-Signalwegs auf die Nematocytyendifferenzierung

Während M\"under *et al.* (2010) zeigten, dass sich die Notch-signaltransduktion in *Hydra* entscheidend auf die Knospung auswirkt, konnten K\"asbauer *et al.* (2007) zeigen, dass dieser Signalweg auch bei der fr\"uhlen Nematocytyendifferenzierung eine wichtige Rolle spielt.

Homologe der Zic-Familie an Transkriptionsfaktoren werden haupts\"achlich in undifferenzierten Geweben exprimiert, wo sie einerseits die Proliferation stimulieren und andererseits an der Differenzierung beteiligte Proteine reprimieren. So ist beispielsweise die Repression der Expression proneuraler Gene wie *Math1*, *Cath1* und *Cash1* durch Zic1 bekannt (Ebert *et al.*, 2001). Diese proneuralen Gene, vor allem Homologe des Achaete-Scute-Komplexes, werden wiederum h\"aufig in Zusammenhang mit dem Notch-Signalweg gebracht. Durch Expression dieser Gene und anschließender Signaltransduktion zwischen den benachbarten Zellen eines undeterminierten Zellclusters kommt es zur Entscheidung f\"ur ein neuronales Schicksal in der einen Zelle und durch laterale Inhibition zur Inhibierung dieses Schicksals in der Nachbarzelle (siehe Abschnitt 1.2.3 und 1.2.4).

Auch in *Hydra* sind Mitglieder der Zic- und Achaete-Scute-Familien bekannt. So konnten Lindgens *et al.* 2004 das Zinkfinger-Protein HyZic nachweisen, w\"ahrend Grens *et al.* (1994) CnASH als homologes Protein zu Achaete-Scute identifizieren konnten. Beide Transkriptionsfaktoren werden w\"ahrend der Nematocytyendifferenzierung exprimiert. Da Nematocyten genauso wie Nervenzellen in *Hydra* aus dem gleichen *Pool* pluripotenter Stammzellen, den interstitiellen Stammzellen entstehen, werden beide Zelltypen als neuronale Zellen bezeichnet.

Diese Kenntnisse und die Tatsache, dass sich der Notch-Signalweg auf die frühe Nematocytyendifferenzierung auswirkt, führten dazu, dass die Expression von HyZic und CnASH auf Gen- und Proteinebene in Zusammenhang mit der Notch-Signaltransduktion untersucht werden sollte.

Zudem wurden POU-Domänen-Transkriptionsfaktoren in *Hydra* untersucht. Bei dieser Proteinfamilie handelt es sich um Faktoren, die terminale Differenzierungsereignisse während der embryonalen Entwicklung beeinflussen (Ryan & Rosenfeld, 1997). POU-Domänen-Transkriptionsfaktoren könnten so in *Hydra* beispielsweise bei der Entscheidung für Nematocytenentstehung aus interstitiellen Zellen oder aber bei der Differenzierung von Nematoblasten zu reifen Nesselzellen eine wichtige Rolle spielen.

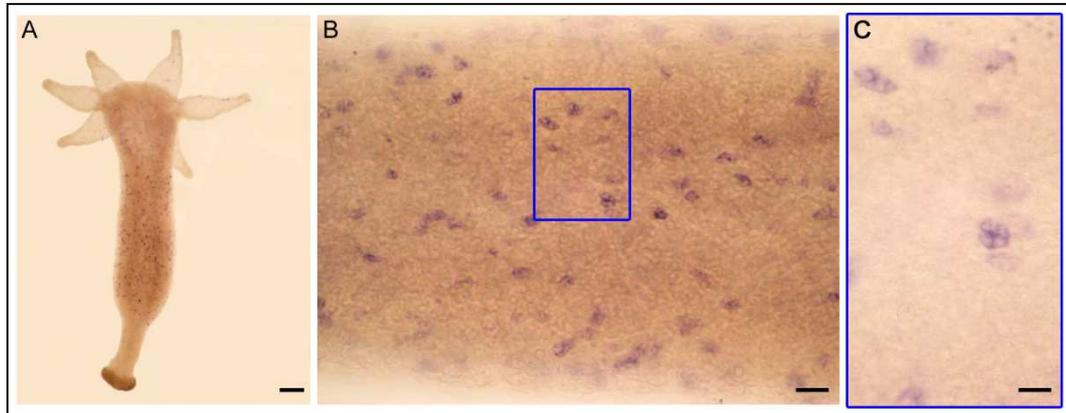
Zusätzlich zu dieser Funktion bei der terminalen Differenzierung wurden Interaktionen von POU-Domänen-Proteinen mit anderen Transkriptionsfaktoren wie zum Beispiel Mash1 beschrieben, die die Expressionen zahlreiche Zielgene wie *Delta1* synergistisch regulieren (Castro *et al.*, 2006). So wird auch die Betrachtung von POU-Domänen-Transkriptionsfaktoren in Zusammenhang mit der Notch-Signaltransduktion interessant.

### **2.3.1 HyZic**

#### ***Die Hyzic-Expression in Hydra***

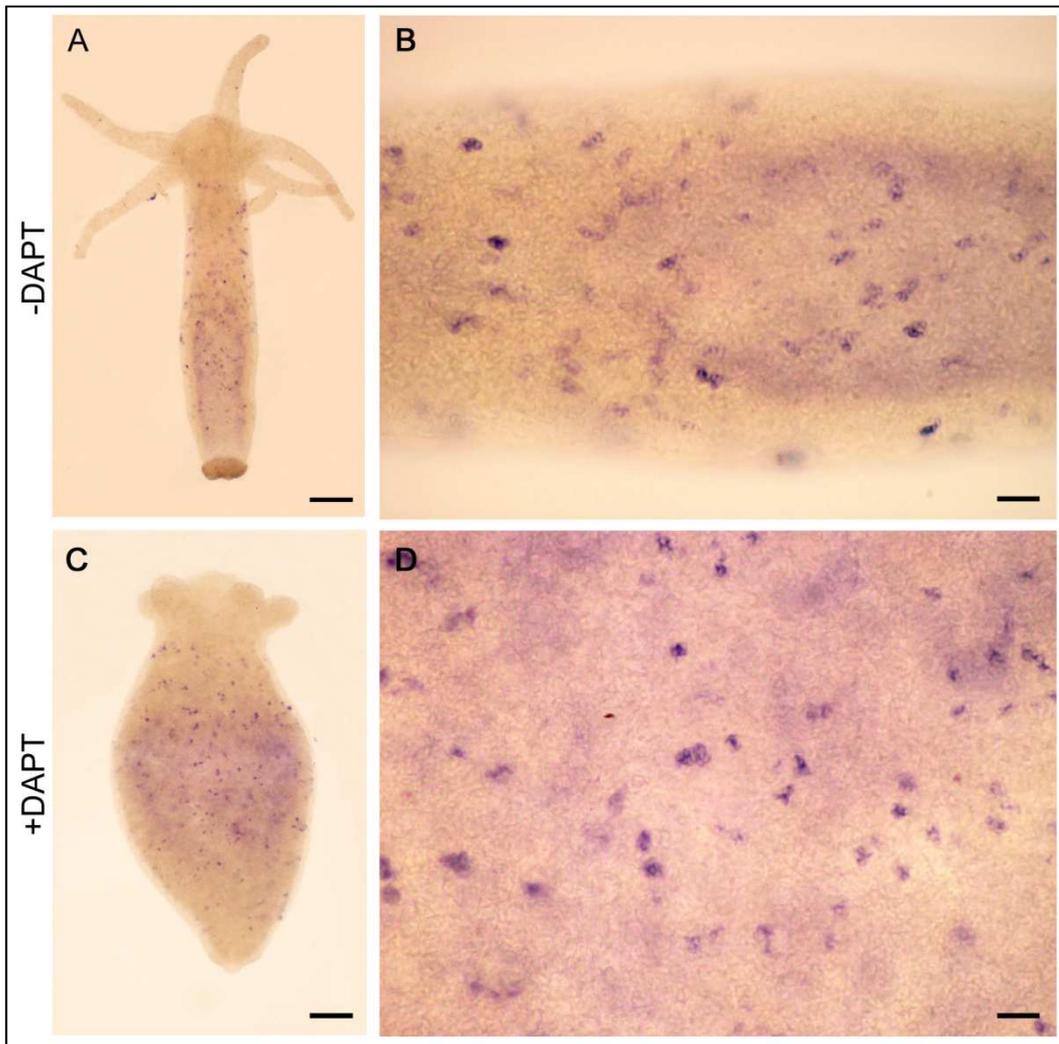
HyZic ist das *Hydra* Zic-Homolog, das eine konservierte Zinkfinger-Domäne aufweist. Lindgens *et al.* (2004) konnten diesen Transkriptionsfaktor durch *in situ*-Hybridisierungsexperimente in einzelnen und doppelten interstitiellen Zellen, sowie in Nematoblasten-Nestern von 4-16 Zellen nachweisen. Diese Ergebnisse konnten in der vorliegenden Arbeit bestä-

tigt werden (siehe Abb. 2-26). Sowohl Nematoblastennester, als auch interstitielle Zellen wurden in *in situ*-Hybridisierungsexperimenten gefärbt.



**Abb. 2-26:** *In situ*-Hybridisierungen an ganzen Tieren für *Hyzic*; NBT/BCIP wurde für die Färbereaktion verwendet (blaue Signale); Maßstab: (A) 200μm, (B) 40μm, (C) 20μm.

Anschließend wurde die Auswirkung der Notch-Signaltransduktion auf die *Hyzic*-Expression betrachtet. Dazu wurden Hydren 48 Stunden mit DAPT bzw. DMSO als Kontrolle behandelt und *in situ*-Hybridisierungen an ganzen Tieren durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass die *Hyzic*-Expression trotz Inhibierung des Notch-Signalwegs unverändert vorhanden ist. Sowohl Kontrolltiere (Abb. 2-27 A, B) als auch DAPT-behandelte Tiere (Abb. 2-27 C, D) wiesen weiterhin Färbungen in Nematoblastennestern und interstitiellen Zellen auf. Käsbauer *et al.* (2007) zeigten, dass diese beiden Zelltypen nach DAPT-Behandlung unverändert vorhanden sind, so dass die erzielten Ergebnisse hier den Erwartungen entsprachen.

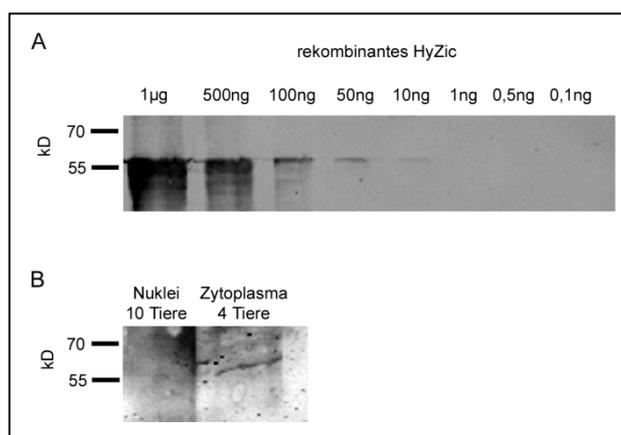


**Abb. 2-27:** *In situ*-Hybridisierungen an ganzen Tieren für *HyZic*; (A-B): Kontrolltier; (C-D): DAPT-behandeltes Tier; NBT/BCIP wurde für die Färbereaktion verwendet (blaue Signale); Maßstab: (A, C) 200µm, (B, D) 40µm.

### ***Expression und Lokalisation des HyZic-Proteins***

Denkbar wäre eine Veränderung der HyZic-Expression oder –Lokalisation allerdings auf Proteinebene. Um dies zu untersuchen, wurde ein monoklonaler Antikörper gegen rekombinantes HyZic hergestellt. Dazu wurde ein Fusionsprotein aus Vollängen-HyZic mit N-terminalen 6 Histidinen kon-

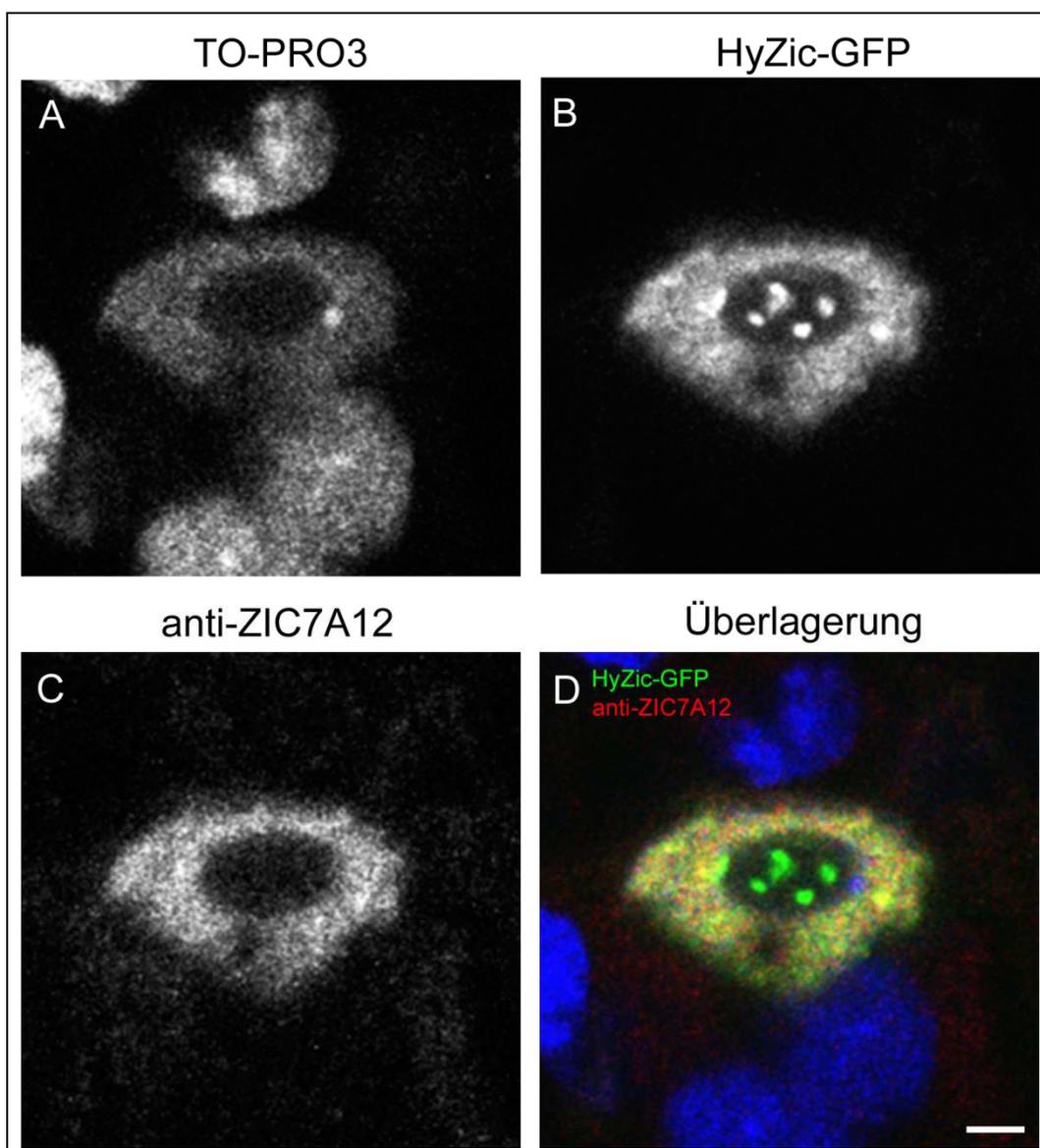
struiert, in *E.coli* überexprimiert, daraus extrahiert und über Nickelsepharose aufgereinigt. Von diesem rekombinanten HyZic wurde 1mg zur Immunsierung von Ratten verwendet. Der schließlich aus dem Hybridomaüberstand gewonnene anti-ZIC7A12-Antikörper wurde bezüglich seiner Detektionseigenschaften analysiert. Aus der Abb. 2-28 A wird ersichtlich, dass eine effiziente Erkennung durch den anti-ZIC7A12-Antikörper mindestens 10ng rekombinantes HyZic (~50kD) erfordert. Um endogenes HyZic (~46kD) nachzuweisen, wurden Hydren homogenisiert, Hydrazellen anschließend durch differentielle Zentrifugation fraktioniert und mittels Western Blot analysiert, wobei die Kernfraktion von 10 Tieren sowie die Zytoplasmafraktion von 4 Tieren untersucht wurden. Endogenes HyZic konnte so in der Zytoplasmafraktion gezeigt werden, während in der Kernfraktion kein HyZic detektiert wurde (siehe Abb. 2-28 B).



**Abb. 2-28:** Eigenschaften von anti-ZIC7A12-Antikörper; (A) Erkennung von rekombinanten HyZic durch anti-ZIC7A12-Antikörper; (B) Nachweis von endogenem HyZic in der Kern- und Zytoplasmafraktion von 10 bzw. 4 Tieren; Endogenes HyZic: ~46kD, rekombinantes HyZic: ~50kD.

Der Einfluss der Notch-Signaltransduktion auf HyZic sollte weiterhin auch auf Proteinebene untersucht werden. Dazu wurde der anti-ZIC7A12-

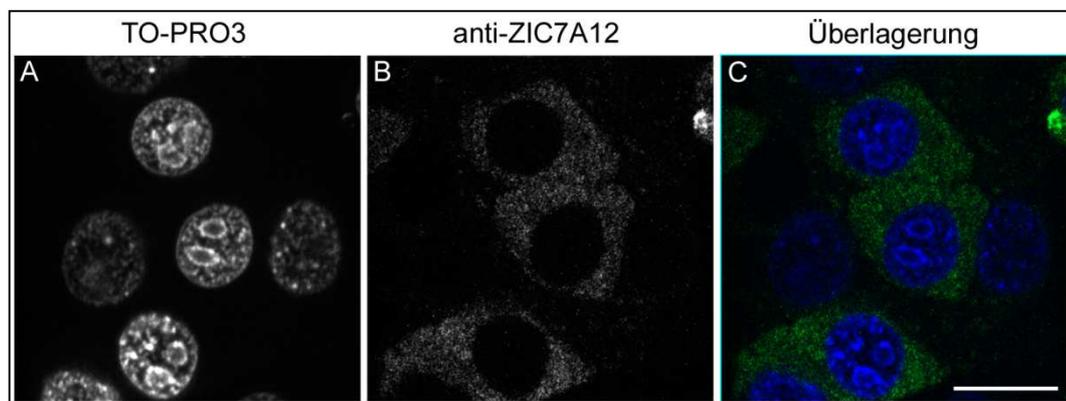
Antikörper bei Immunfluoreszenzexperimenten eingesetzt. Zunächst wurde *HyZic* in den hoT G-Vektor kloniert und *Hydra* mit diesem Fusionskonstrukt, bei dem *HyZic* unter Kontrolle des *Hydra* Aktin-Promoters als GFP-Fusionsprodukt exprimiert wird, biolistisch transformiert.



**Abb. 2-29:** Nachweis von HyZic-GFP mit anti-ZIC7A12-Antikörper; (A) DNA-Färbung mit TO-PRO3; (B) HyZic-GFP; (C) Färbung mit anti-ZIC7A12-Antikörper; (D) Überlagerung aller Kanäle in Falschfarben: DNA (blau), HyZic-GFP (grün), anti-ZIC7A12-Färbung (rot); Konfokale Schnitte; Maßstab: 2µm.

Als Beweis für die Erkennung des überexprimierten HyZic-Proteins durch den anti-ZIC7A12-Antikörper wurden Immunfluoreszenzfärbungen an solchen transformierten Hydren durchgeführt. In Abb. 2-29 D wird die Überlagerung des ektopischen HyZic-GFPs mit der anti-ZIC7A12-Färbung im Zellkern der transformierten Zelle deutlich gezeigt. Dieser monoklonale Antikörper erkennt also spezifisch überexprimiertes HyZic und kann deshalb für weitere Immunfluoreszenzfärbungen eingesetzt werden. Besonders auffällig ist zudem die Lokalisation von ektopischem HyZic-GFP in globulären Strukturen im Nukleolus transformierter Zellen, die allerdings nicht durch den anti-ZIC7A12-Antikörper detektiert werden.

Aus Abb. 2-30 wird deutlich, dass der anti-ZIC7A12-Antikörper auch endogenes HyZic in ganzen Hydren erkennt. Dabei konnte HyZic im Zytoplasma von einzelnen und doppelten interstitiellen Zellen (siehe Abb. 2-30 A-C) sowie in Nematoblasten-Nestern (siehe Abb. 2-31 A-D) nachgewiesen werden.

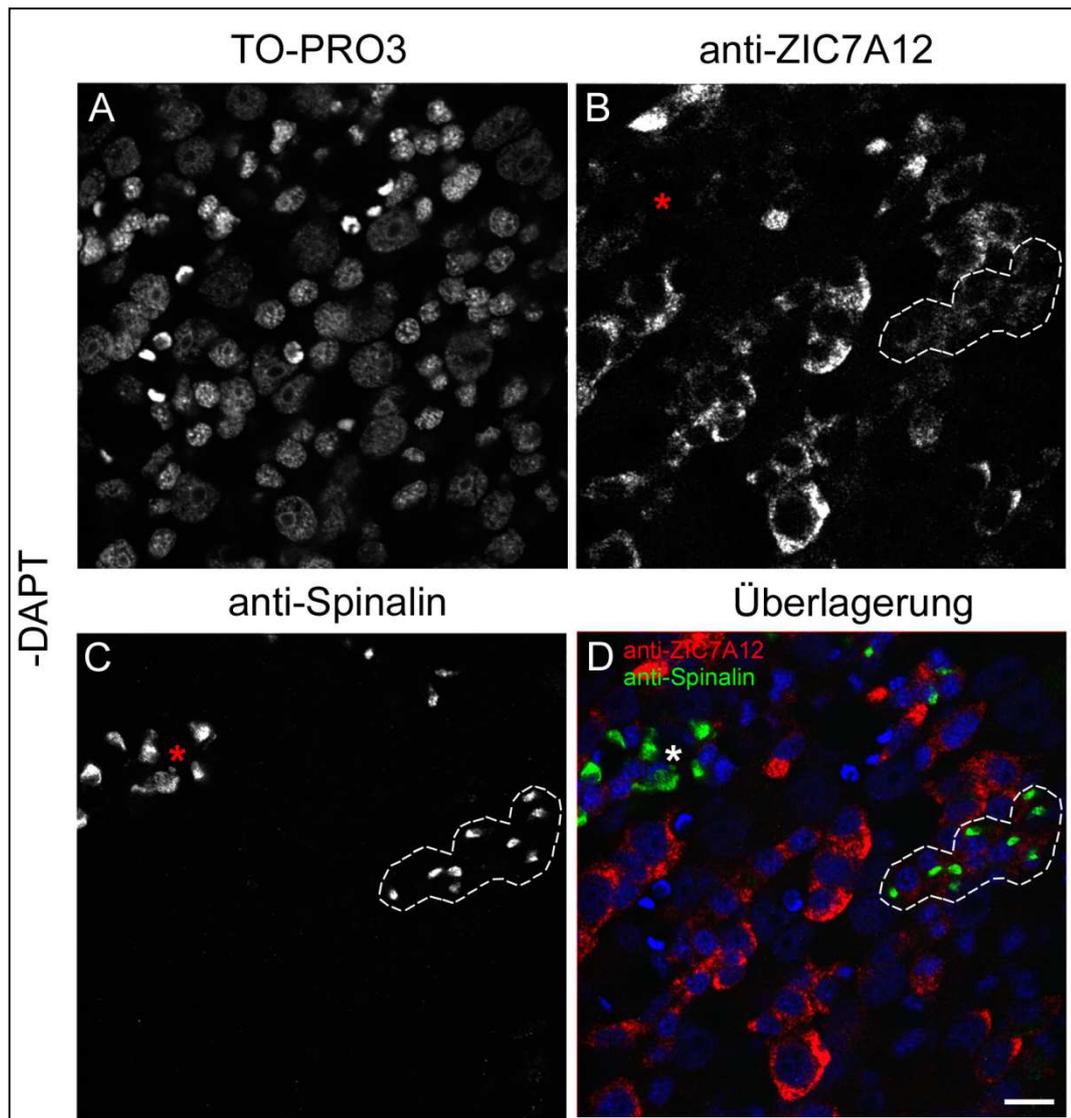


**Abb. 2-30:** Immunfluoreszenzfärbungen an ganzen Tieren mit dem anti-ZIC7A12-Antikörper; (A) DNA-Färbung mit TO-PRO3; (B) anti-ZIC7A12-Färbung; (C) Überlagerung aller Kanäle in Falschfarben: DNA (blau), anti-ZIC7A12-Färbung (grün); Konfokale Schnitte; Maßstab: 10µm.

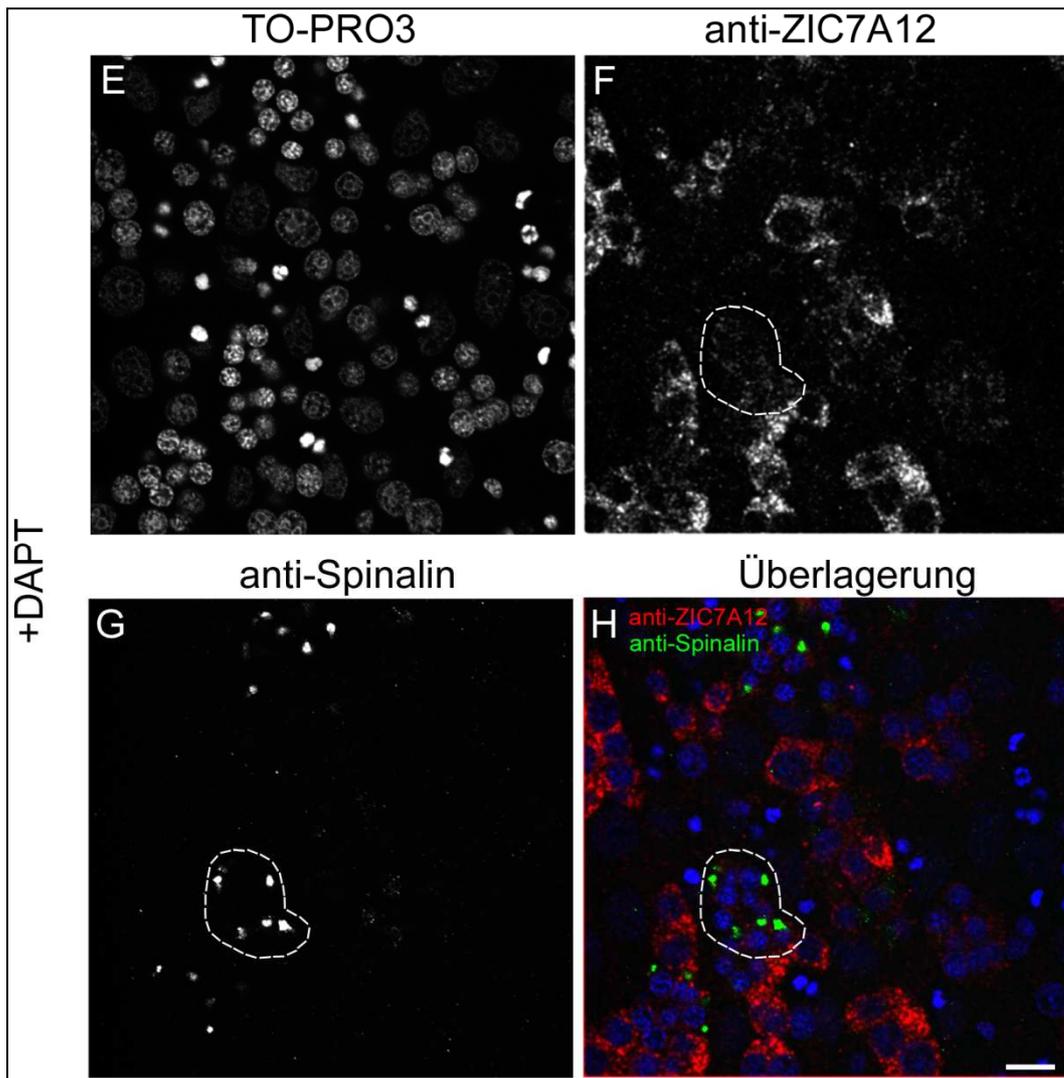
Des Weiteren wurden Co-Immunfluoreszenzfärbungen mit dem anti-Spinalin-Antikörper durchgeführt. Dieser Antikörper erkennt spezifisch Spinalin, das Dornen und Stylette von Nematozysten ausbildet. Eine anti-Spinalin-Färbung kommt allerdings lediglich in frühen differenzierenden, nicht aber in reifen Nematocyten zustande, da durch Aushärtung die Kapselwand für Antikörper undurchlässig wird (Koch *et al.*, 1998). Mit Hilfe dieses Antikörpers konnte gezeigt werden, dass das HyZic-Protein in Nematoblasten mit sehr kleiner Vakuole zwar noch vorhanden ist, die anti-ZIC7A12-Färbung fällt jedoch deutlich schwächer als bei den anderen Zelltypen aus (siehe Abb. 2-31 A-D - Umrandung). In Spinalin-positiven frühen Nematocyten mit bereits etwas größerer Vakuole (siehe Abb. 2-31 A-D - markiert mit \*) ist allerdings kein HyZic mehr nachweisbar.

Durch DAPT-Behandlung und anschließende Immunfluoreszenzfärbungen wurden die Auswirkungen der Notch-Signaltransduktion auf die HyZic-Proteinexpression betrachtet. Aus Abb. 2-31 E-H wird deutlich, dass die anti-ZIC7A12-Färbung nach DAPT-Behandlung noch vorhanden ist. Diese ist weiterhin in einzelnen und doppelten interstitiellen Zellen, Nematoblasten ohne Vakuole und sehr schwach in Nematoblasten mit sehr kleiner Vakuole (siehe Abb. 2-31 E-H - Umrandung) jeweils im Zytoplasma aufzufinden.

Zusammengenommen zeigen die Untersuchungen an HyZic, dass weder die Expression noch die Lokalisation des *HyZic*-Gens und des HyZic-Proteins durch die Notch-Signaltransduktion beeinflusst werden. Während ektopisches HyZic im Zellkern transformierter Zellen zu finden ist, befindet sich endogenes HyZic stets im Zytoplasma von einzelnen und doppelten interstitiellen Zellen und abgeschwächt in Nematoblasten mit sehr kleinen Vakuolen.



**Abb. 2-31:** Immunfluoreszenzfärbungen an ganzen Tieren mit dem anti-ZIC7A12-Antikörper; (A-D) Färbung mit anti-ZIC7A12- und anti-Spinalin-Antikörpern an Kontrolltier; (E-H) Färbung mit anti-ZIC7A12- und anti-Spinalin-Antikörpern an DAPT-behandelter *Hydra*; (A, E) DNA-Färbung mit TO-PRO3; (B, F) anti-ZIC7A12-Färbung; (C, G) anti-Spinalin-Färbung; (D, H) Überlagerung aller Kanäle in Falschfarben: DNA (blau), anti-ZIC7A12-Färbung (grün), anti-Spinalin-Färbung (rot); Umrandung: Nematoblasten mit sehr kleiner Vakuole; (\*) Nematocyten mit deutlicher Vakuole; Konfokale Schnitte; Maßstab: 10µm – Fortsetzung auf nächster Seite.

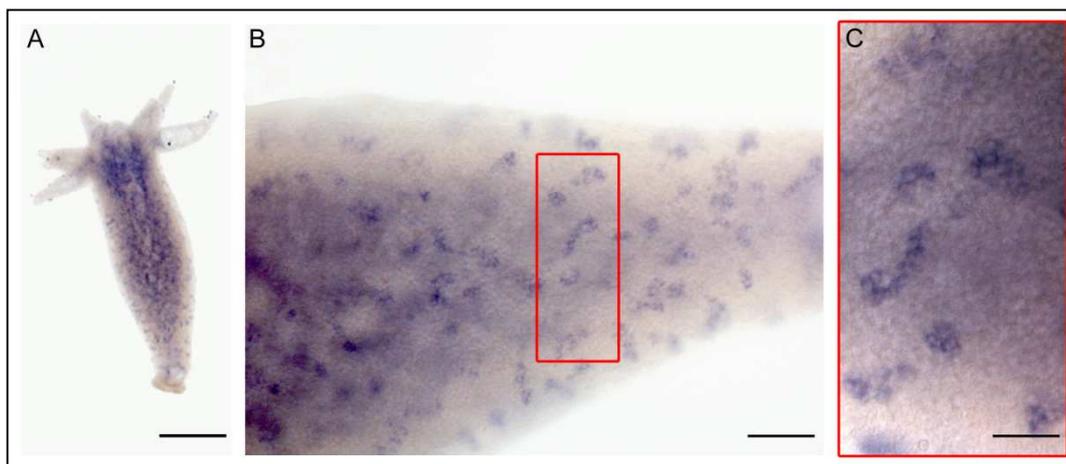


**Abb. 2-31 – Fortsetzung:** Immunfluoreszenzfärbungen an ganzen Tieren mit dem anti-ZIC7A12-Antikörper; (A-D) Färbung mit anti-ZIC7A12- und anti-Spinalin-Antikörpern an Kontrolltier; (E-H) Färbung mit anti-ZIC7A12- und anti-Spinalin-Antikörpern an DAPT-behandelter *Hydra*; (A, E) DNA-Färbung mit TO-PRO3; (B, F) anti-ZIC7A12-Färbung; (C, G) anti-Spinalin-Färbung; (D, H) Überlagerung aller Kanäle in Falschfarben: DNA (blau), anti-ZIC7A12-Färbung (grün), anti-Spinalin-Färbung (rot); Umrandung: Nematoblasten mit sehr kleiner Vakuole; (\*) Nematocyten mit deutlicher Vakuole; Konfokale Schnitte; Maßstab: 10µm.

### 2.3.2 CnASH

#### ***Die Cnash-Expression in Hydra***

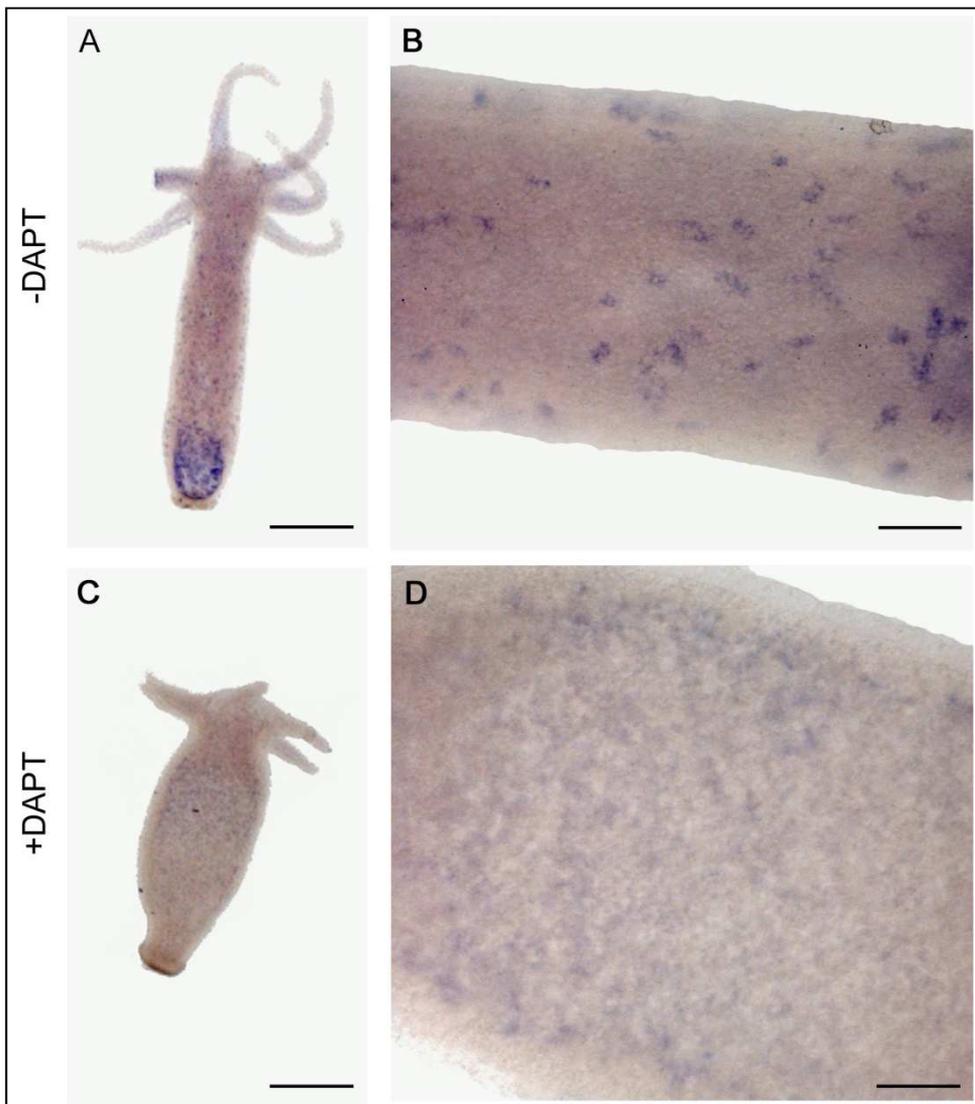
Der bHLH-Transkriptionsfaktor CnASH wurde bereits 1995 durch Grens *et al.* als Homolog zu den Achaete-Scute-Proteinen identifiziert. Durch *in situ*-Hybridisierungsexperimente an ganzen Hydren wurde seine Expression in Nematoblasten-Nestern sowie in Nervenzellen der Tentakel nachgewiesen (Hayakawa *et al.*, 2004; Lindgens *et al.*, 2004). Während die Nervenzellfärbung schwierig zu erzielen ist, konnten die Befunde zu den Nematoblasten in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden (siehe Abb. 2-32).



**Abb. 2-32:** *In situ*-Hybridisierungen an ganzen Tieren für *Cnash*; NBT/BCIP wurde für die Färbereaktion verwendet (blaue Signale); Maßstab: (A) 200µm, (B) 40µm, (C) 20µm.

Da Proteine der Achaete-Scute-Familie häufig in Zusammenhang mit der Notch-Signaltransduktion gebracht werden, wurden *in situ*-Hybridisierungen an DAPT-behandelten und Kontrolltieren durchgeführt. Die DMSO-behandelten Kontrolltiere (siehe Abb. 2-33 A, B) wiesen die bekannte Nematoblastenfärbung auf, die DAPT-behandelten Tiere zeigten

dagegen keinerlei Färbung (siehe Abb. 2-33 C, D). Dies deutet nach Käsbauer *et al.* (2007) daraufhin, dass es sich bei den *Cnash*-positiven Nematoblasten um post-mitotische Nematoblasten mit deutlicher Vakuole handelt.

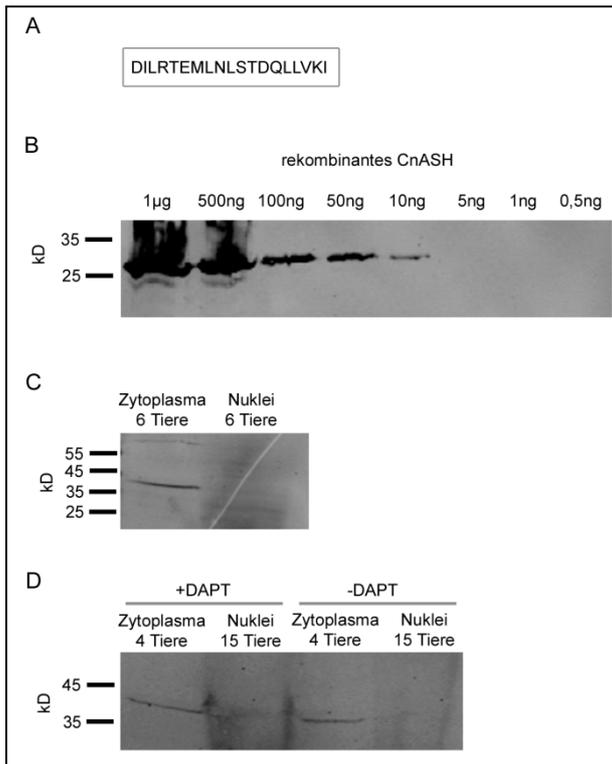


**Abb. 2-33:** *In situ*-Hybridisierungen an ganzen Tieren für *Cnash*; (A-B): Kontrolltier; (C-D): DAPT-behandeltes Tier; NBT/BCIP wurde für die Färbereaktion verwendet (blaue Signale); Maßstab: (A, C) 200 $\mu$ m, (B, D) 40 $\mu$ m.

### **Expression und Lokalisation des CnASH-Proteins**

Widersprüchlich Ergebnisse bezüglich der *Cnash*-Expression lieferten allerdings *in situ*-Hybridisierungen an Mazeraten (Grens *et al.*, 1995). Hier wurden neben den bereits identifizierten post-mitotischen Nematoblasten auch interstitielle Zellen und Nematoblasten ohne Vakuole gefärbt. Eine Färbung von Nervenzellen konnte dagegen nicht detektiert werden. Dies konnte in eigenen Experimenten bestätigt werden (C. Braun, Diplomarbeit; Daten nicht gezeigt). Um diese Widersprüche aufzuklären und die tatsächliche CnASH-Expression nachzuweisen, wurde CnASH auf Proteinebene betrachtet. Dazu wurde ein Antikörper gegen ein synthetisches CnASH-spezifisches Peptid in Kaninchen hergestellt (siehe Abb. 2-34 A und Abschnitt 5.1.6). Der resultierende anti-CnASH-Peptidantikörper benötigt mindestens 10ng rekombinantes CnASH-Protein (~25kD), um eine spezifische Erkennung zu erlauben (siehe Abb. 2-34 B). Dieser Antikörper sollte zudem auch endogenes Protein erkennen. Dazu wurden Hydren homogenisiert und durch differentielle Zentrifugation Zytoplasma- und Kernfraktionen hergestellt. Endogenes CnASH konnte dabei mittels Western Blot im Zytoplasma nachgewiesen werden. Allerdings betrug die erkannte Bande nicht die erwarteten 20kD, sondern ca. 40kD (siehe Abb. 2-34 C).

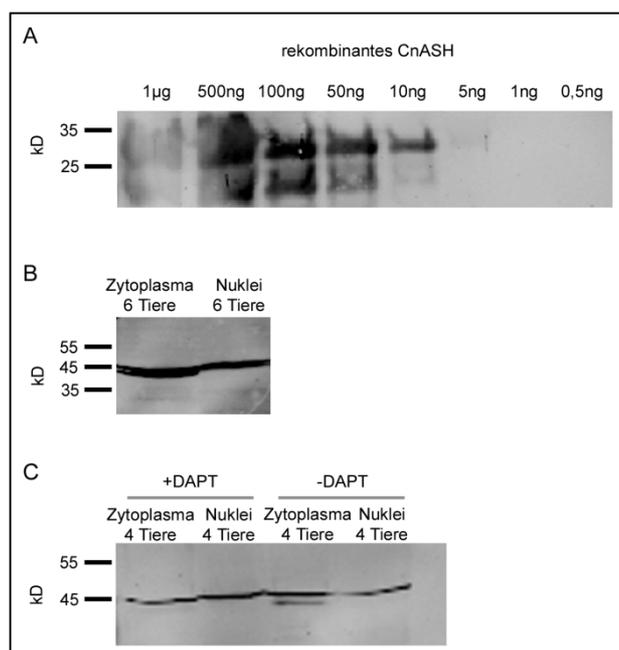
Außerdem wurden Zytoplasma- und Kernfraktionen von DAPT-behandelten und Kontrolltieren hergestellt und zum Nachweis endogenen CnASH-Proteins verwendet. Auch hier wurde CnASH in der Zytoplasmafraktion als Bande mit ca. 40kD nachgewiesen (siehe Abb. 2-34 D). Der Notch-Signaltransduktionsweg scheint demnach keine Auswirkung auf die CnASH-Lokalisation und -Expression auf Proteinebene zu haben.



**Abb. 2-34:** Eigenschaften von anti-CnASH-Peptidantikörper; (A) Synthetisches, CnASH-spezifisches Peptid zur Immunisierung von Kaninchen; (B) Erkennung von rekombinantem CnASH durch anti-CnASH-Peptidantikörper; (C) Nachweis von endogenem CnASH in der Zytoplasma- und Kernfraktion von je 6 Tieren; (D) Nachweis von endogenem CnASH in den Zytoplasma- und Kernfraktionen von 4 bzw. 15 DAPT-behandelten und Kontrolltieren; endogenes CnASH: ~20kD, rekombinantes CnASH: ~24kD.

Ein zweiter Antikörper gegen CnASH wurde zur Bestätigung dieser Ergebnisse hergestellt, wobei ein monoklonaler Antikörper gewählt wurde. Rekombinantes CnASH wurde als Fusionsprotein von CnASH mit N-terminalen 6 Histidinen in *E.coli* hergestellt, überexprimiert, daraus extrahiert und mit Hilfe von Nickelsepharose aufgereinigt. Von diesem gereinigten Protein wurde 1mg zur Immunisierung von Ratten verwendet und der anti-CNA7B10-Antikörper aus dem resultierenden Hybridomaüberstand gewonnen.

Es konnte gezeigt werden, dass eine erfolgreiche Erkennung durch den anti-CNA7B10-Antikörper mindestens 5ng rekombinantes CnASH erfordert (siehe Abb. 2-35 A). Dieser monoklonale Antikörper ist demnach etwas empfindlicher als der polyklonale Peptidantikörper.



**Abb. 2-35:** Eigenschaften von anti-CNA7B10-Antikörper; (A) Erkennung von rekombinantes CnASH durch anti-CNA7B10-Antikörper; (B) Nachweis von endogenem CnASH in der Zytoplasma- und Kernfraktion von je 6 Tieren; (C) Nachweis von endogenem CnASH in den Zytoplasma- und Kernfraktionen von je 4 DAPT-behandelten und Kontrolltieren; endogenes CnASH: ~20kD, rekombinantes CnASH: ~24kD.

Durch differentielle Zentrifugation wurden Zytoplasma- und Kernfraktionen gewonnen und endogenes CnASH durch Western Blot mit dem anti-CNA7B10-Antikörper nachgewiesen. Hierbei wurde CnASH im Gegensatz zu Ergebnissen mit dem anti-CnASH-Peptidantikörper in beiden Fraktionen detektiert (siehe Abb. 2-35 B). Dies kann auf die größere Empfindlichkeit des Antikörpers zurückgeführt werden. Des Weiteren wurde auch mit

diesem Antikörper eine Bande mit ca. 40kD erkannt, so dass man hier trotz der unerwarteten Größe davon ausgehen kann, dass es sich dabei tatsächlich um endogenes CnASH handelt.

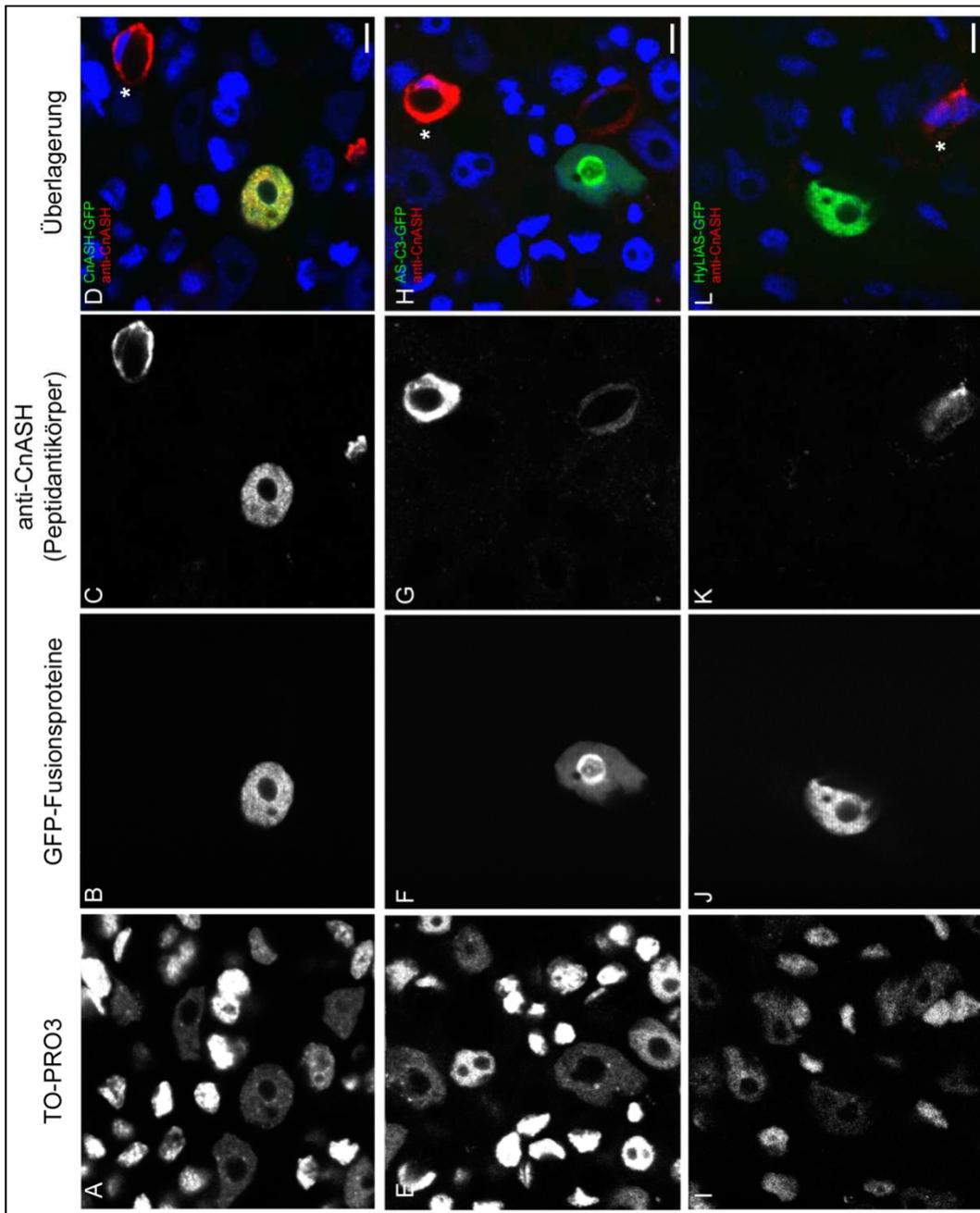
Auch von DAPT-behandelten und Kontrolltieren wurden Zytoplasma- und Kernfraktionen hergestellt und endogenes CnASH mit dem anti-CNA7B10-Antikörper nachgewiesen (siehe Abb. 2-35 C). Sowohl in DAPT-behandelten Hydren als auch in Kontrolltieren konnte CnASH detektiert werden. Zudem war kein Unterschied in der Signalstärke erkennbar. Das CnASH-Protein ist also trotz Inhibierung der Notch-Signaltransduktion weiterhin in großen Mengen vorhanden. Dies steht im Widerspruch zu den Ergebnissen der *in situ*-Hybridisierungen, bei denen die *Cnash*-Expression an DAPT-behandelten Tieren nicht detektiert werden konnte (siehe Abb. 2-33).

Während *in situ*-Hybridisierungen an ganzen Tieren *Cnash*-Expression in Nematoblasten mit Vakuole und in Nervenzellen zeigte (Hayakawa *et al.*, 2004; Lindgens *et al.*, 2004), wurde *Cnash* bei *in situ*-Hybridisierungen an Mazeraten in interstitiellen Zellen sowie in Nematoblasten mit und ohne Vakuole detektiert (Grens *et al.*, 1995). Nervenzellen zeigten dagegen keine Färbung. Um diese widersprüchlichen Ergebnisse aufzulösen, sollten die CnASH-Expression nun auf Proteinebene analysiert werden. Dazu wurden mit Hilfe des anti-CnASH-Peptidantikörpers Immunfluoreszenzen durchgeführt werden, um die tatsächliche Lokalisation des Transkriptionsfaktors aufzuzeigen.

Zunächst wurde *Cnash* in den hoT G-Vektor eingebracht, so dass bei biolistischer Transformation von *Hydra* mit diesem Konstrukt, ein CnASH-GFP-Fusionsprotein überexprimiert wird. Hydren, die ein solches Kon-

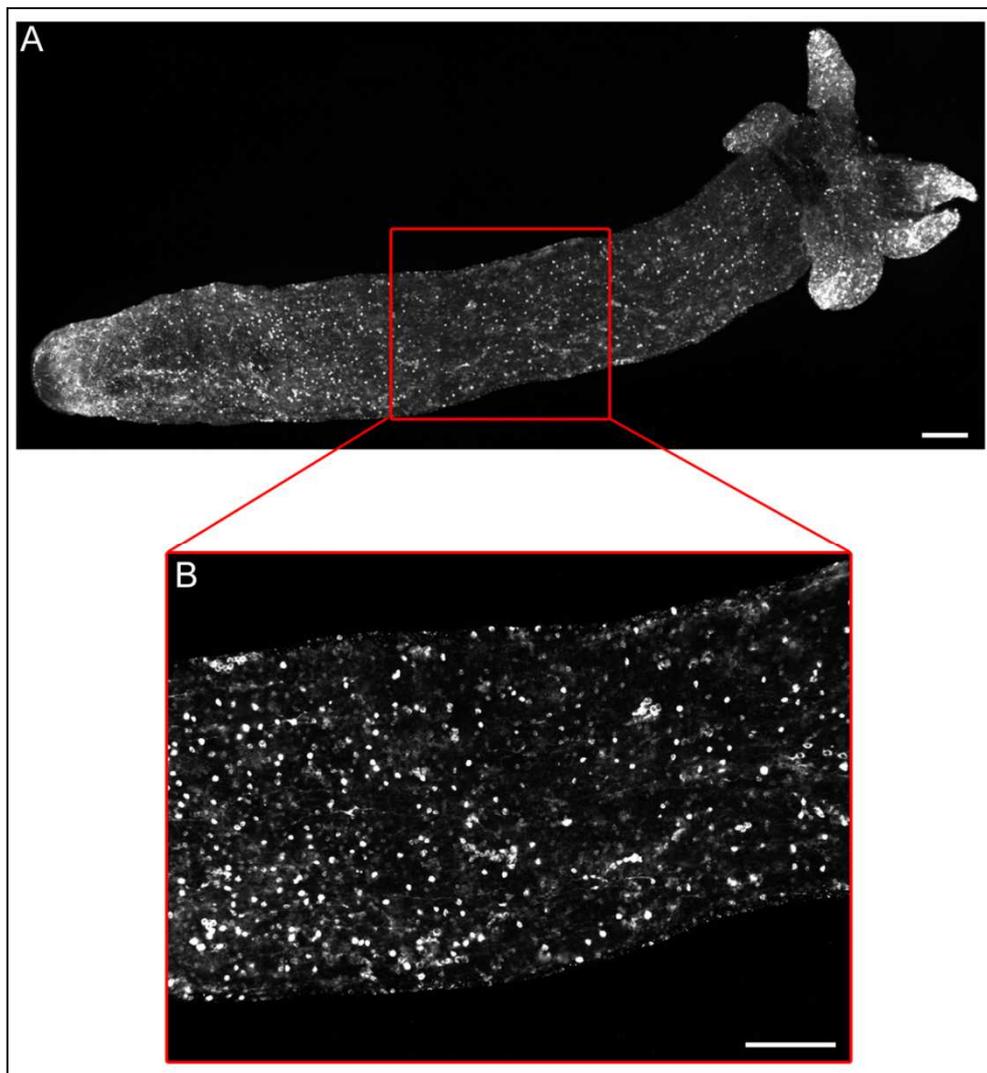
strukt aufwiesen, wurden anschließend mit dem anti-CnASH-Antikörper gefärbt. In der Überlagerung von CnASH-GFP mit der anti-CnASH-Färbung in Abb. 2-36 D wird ersichtlich, dass ektopisches CnASH, das sich im Zellkern transformierter Zellen aufhält, durch den Peptidantikörper spezifisch erkannt wird.

Zwei weitere bHLH-Transkriptionsfaktoren wurden durch B.Bertulat in ihrer Doktorarbeit als Achaete-Scute-Homologe identifiziert. Es handelt sich dabei einerseits um HyLiAS (*Hydra Like Achaete/Scute*) sowie um das dritte Achaete/Scute-Homolog AS-C3. Diese beiden Proteine wurden in der vorliegenden Arbeit ebenfalls als GFP-Fusionsproteine nach biolistischer Transformation der entsprechenden DNA-Konstrukte in *Hydra* überexprimiert und eine Immunfluoreszenzfärbung mit dem anti-CnASH-Peptidantikörper durchgeführt. Aus den Abb. 2-36 E-L wird ersichtlich, dass während dieser Antikörper endogenes CnASH sehr wohl nachweisen kann (markiert durch „\*“) weder HyLiAS noch AS-C3 detektiert wurden.



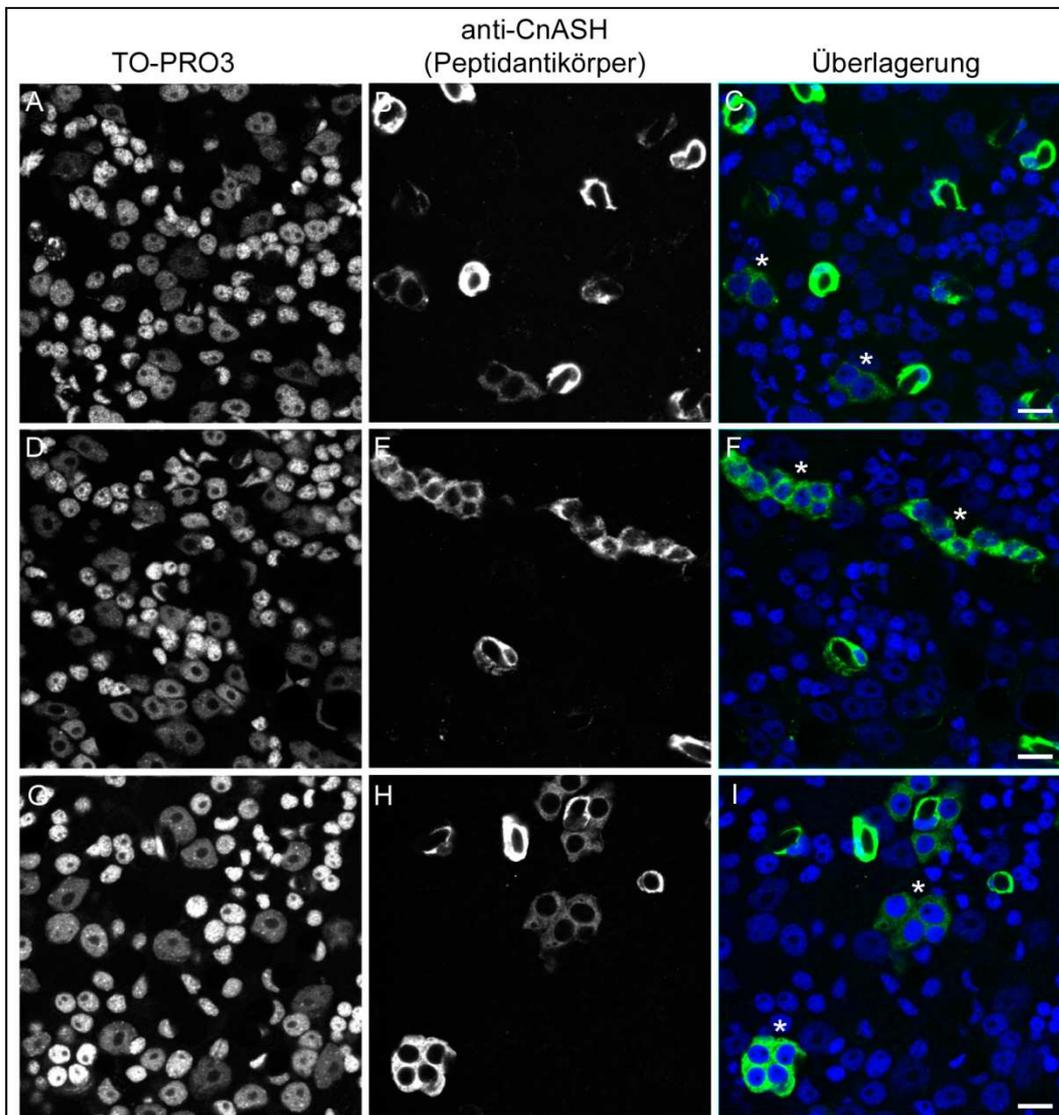
**Abb. 2-36:** Nachweis von CnASH-GFP, AS-C3-GFP bzw. HyLIAS-GFP mit anti-CnASH-Peptidantikörper; (A, E, I) DNA-Färbung mit TO-PRO3; (B) CnASH-GFP; (F) AS-C3-GFP; (J) HyLIAS-GFP; (C, G, K) Färbung mit anti-CnASH-Peptidantikörper; (D, H, L) Überlagerung aller Kanäle in Falschfarben: DNA (blau), CnASH-GFP, AS-C3-GFP bzw. HyLIAS-GFP (grün), anti-CnASH-Färbung (rot); (\*) endogenes CnASH; Konfokale Schnitte; Maßstab: 5µm.

Da der anti-CnASH-Peptidantikörper demnach spezifisch das CnASH-Protein erkennt, wurde er für den Nachweis endogenen CnASHs in der Immunfluoreszenz eingesetzt. Aus Abb. 2-37 wird sichtbar, dass es zu Färbungen am gesamten Tier kommt. Der Ausschnitt des Rumpfes (Abb. 2-37 B) zeigt weiterhin, dass es sich bei den gefärbten Strukturen unter anderem um Nematoblasten-Nester, Nematocyten und Nervenzellen handelt.

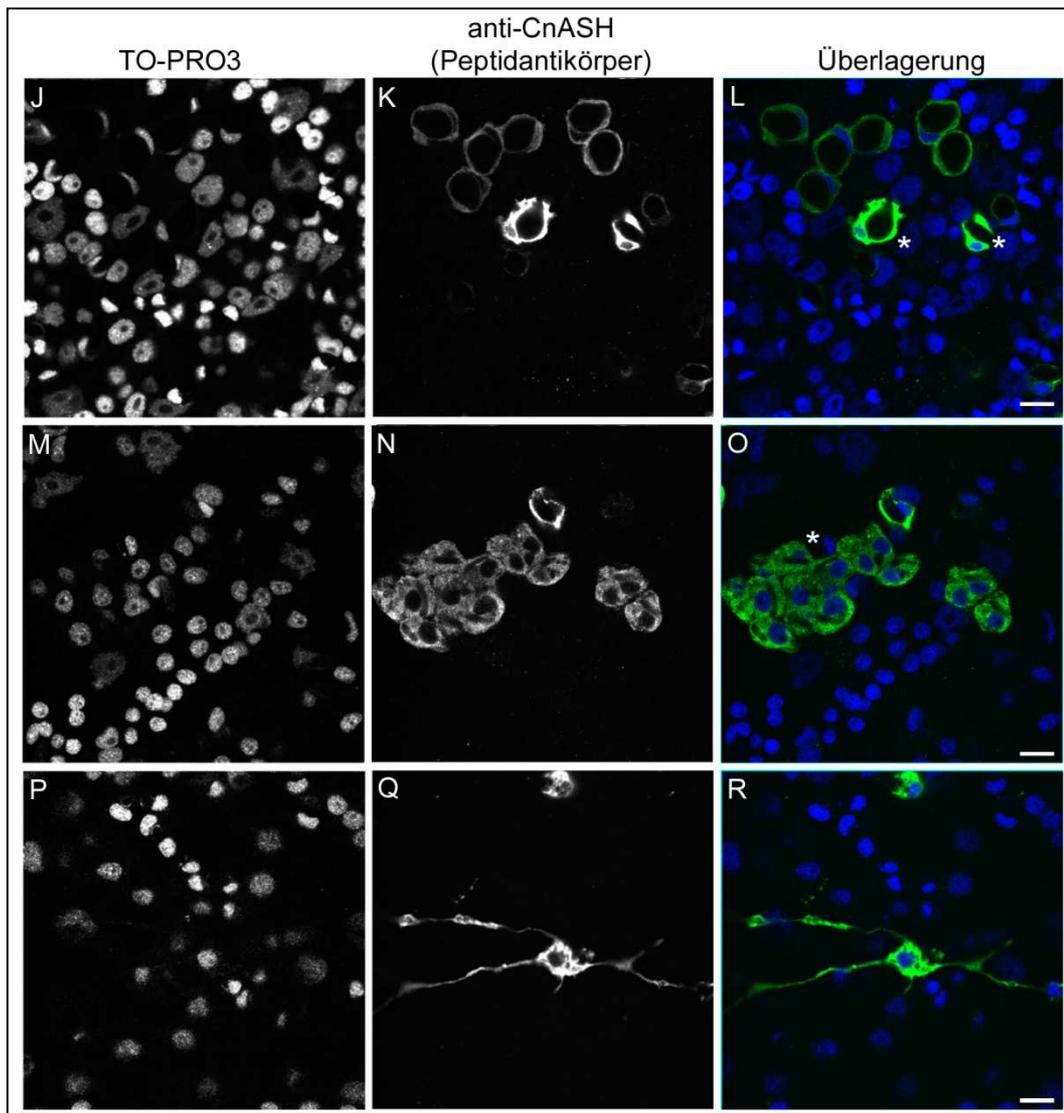


**Abb. 2-37:** Immunfluoreszenzfärbung an ganzer *Hydra* mit dem anti-CnASH-Peptidantikörper; Maßstab: 100µm.

Zur weiteren Untersuchung dieser Färbung wurden größere Vergrößerungen gewählt (siehe Abb. 2-38).



**Abb. 2-38:** Immunfluoreszenzfärbungen an ganzen Tieren mit dem anti-CnASH-Peptidantikörper; (A, D, G, J, M, P) DNA-Färbung mit TO-PRO3; (B, E, H, K, N, Q) anti-CnASH-Färbung; (C, F, I, L, O, R) Überlagerung aller Kanäle in Falschfarben: DNA (blau), anti-CnASH-Färbung (grün); Konfokale Schnitte; Maßstab: 10µm – Fortsetzung auf nächster Seite.

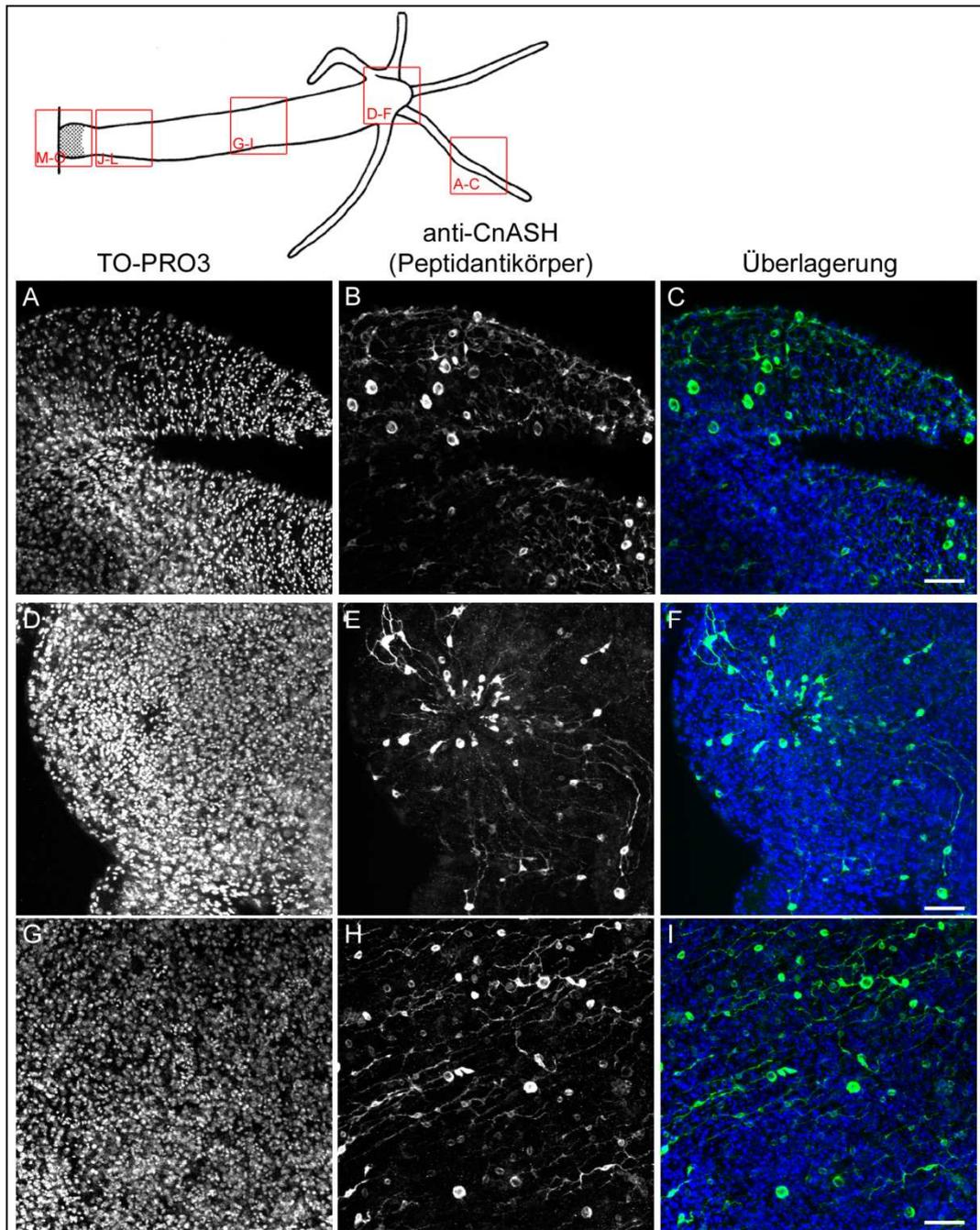


**Abb. 2-38 – Fortsetzung:** Immunfluoreszenzfärbungen an ganzen Tieren mit dem anti-CnASH-Peptidantikörper; (A, D, G, J, M, P) DNA-Färbung mit TO-PRO3; (B, E, H, K, N, Q) anti-CnASH-Färbung; (C, F, I, L, O, R) Überlagerung aller Kanäle in Falschfarben: DNA (blau), anti-CnASH-Färbung (grün); Konfokale Schnitte; Maßstab: 10µm.

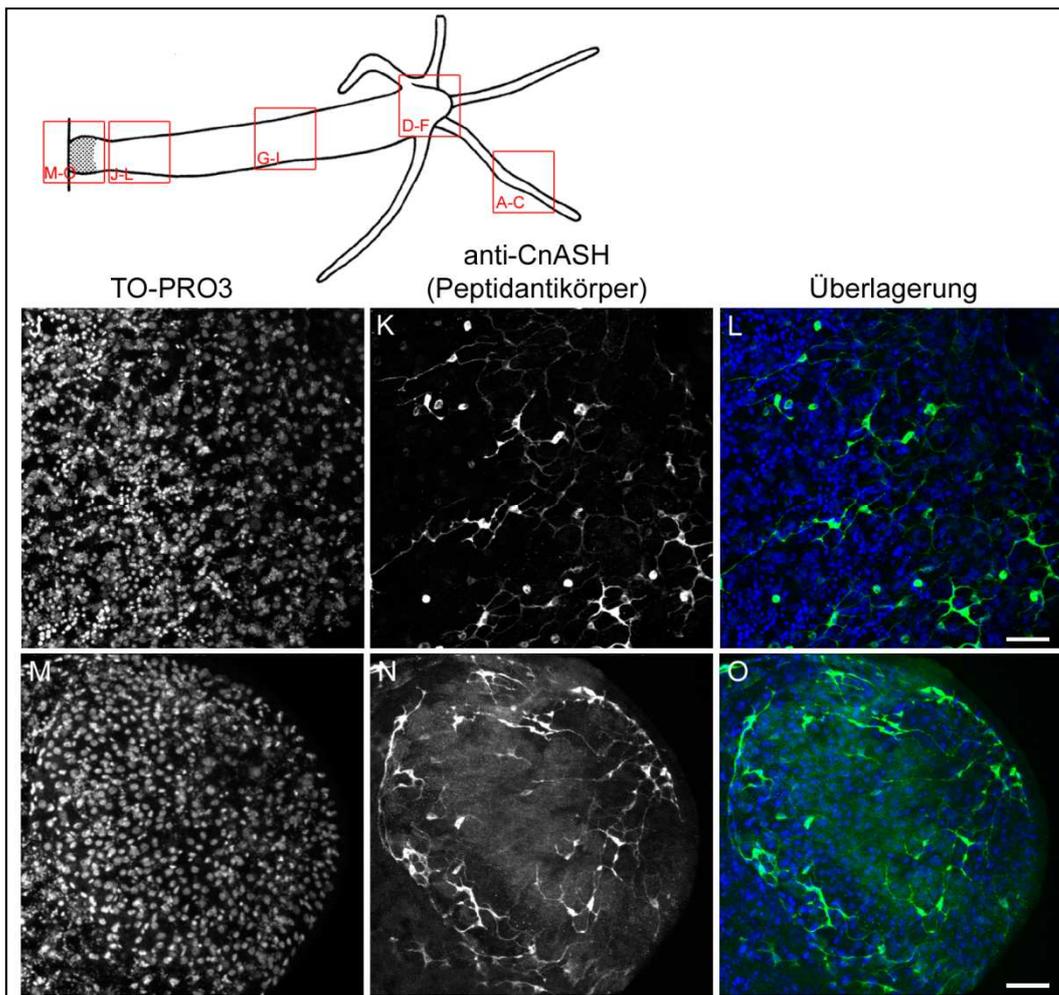
So wird deutlich, dass es sich dabei um einzelne und doppelte interstitielle Zellen (siehe Abb. 2-38 A-C), Nematoblasten-Nester ohne (siehe Abb. 2-38 D-F) und mit Vakuole (siehe Abb. 2-38 G-I), Nematoblasten-Nester mit

reifender Kapsel (siehe Abb. 2-38 M-O) sowie um reife Nematocyten (siehe Abb. 2-38 J-L) handelt. Das CnASH-Protein ist demnach in allen Stadien des Nematocyten differenzierungswegs vorhanden. Zusätzlich dazu wurden Nervenzellen (siehe Abb. 2-38 P-R) gefärbt. In all diesen Zelltypen befindet sich CnASH zudem eindeutig im Zytoplasma, was übereinstimmt mit Ergebnissen, die durch Western Blot Analysen erzielt wurden (siehe Abb. 2-34 und Abb. 2-35).

CnASH-positive Nervenzellen wurden zudem in allen Körperregionen identifiziert. Sowohl in Tentakeln (siehe Abb. 2-39 A-C), am Hypostom (siehe Abb. 2-39 D-F), im Rumpf (siehe Abb. 2-39 G-I), am Stiel (siehe Abb. 2-39J-L) als auch an der Fußscheibe (siehe Abb. 2-39 M-O) erschienen CnASH-positive Nervenzellen.



**Abb. 2-39:** Immunfluoreszenzfärbungen an ganzen Tieren mit dem anti-CnASH-Peptidantikörper; (A, D, G, J, M) DNA-Färbung mit TO-PRO3; (B, E, H, K, N) anti-CnASH-Färbung; (C, F, I, L, O) Überlagerung aller Kanäle in Falschfarben: DNA (blau), anti-CnASH-Färbung (grün); Konfokale Projektionen; Maßstab: 50µm – Fortsetzung auf nächster Seite.



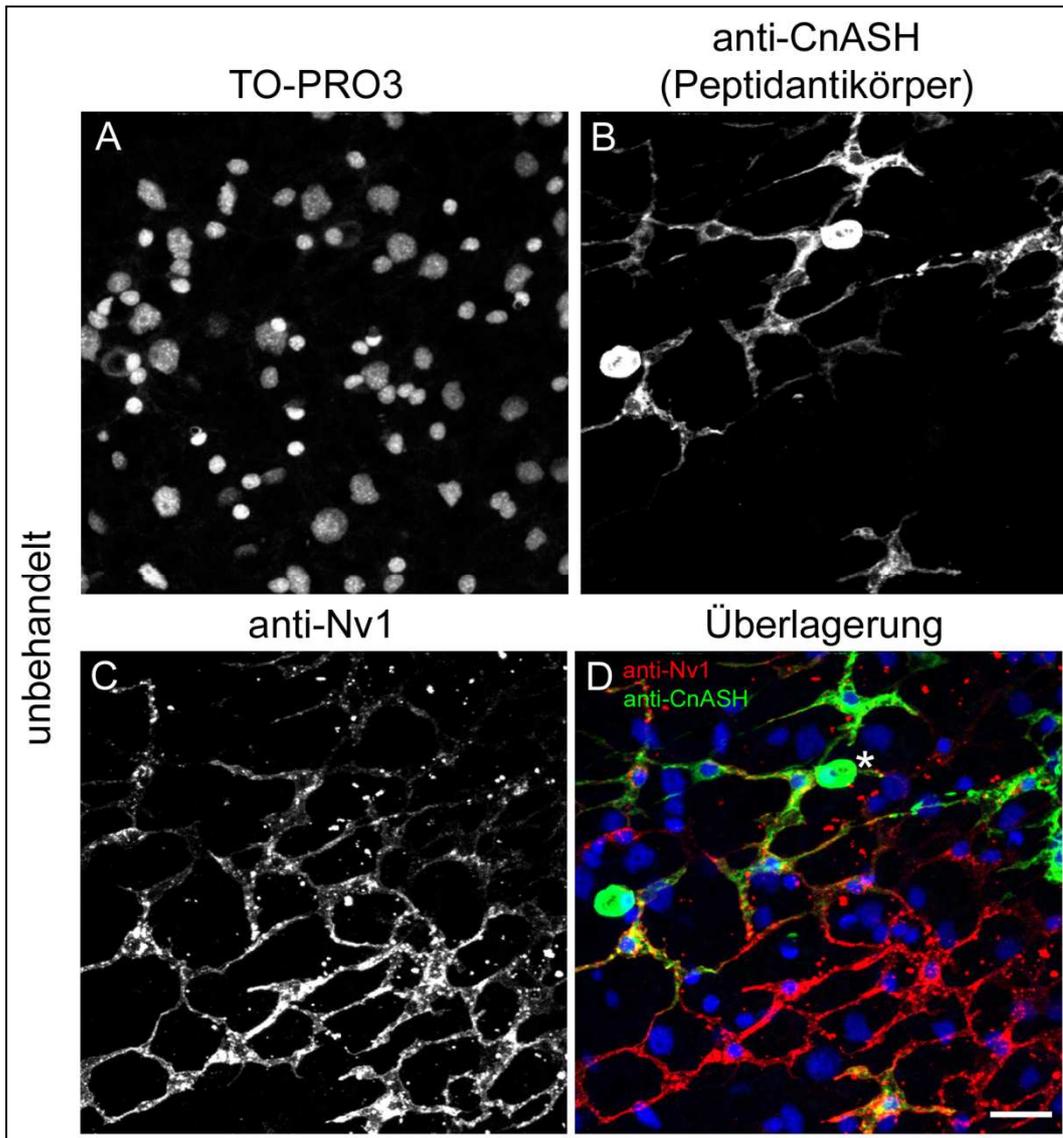
**Abb. 2-39 – Fortsetzung:** Immunfluoreszenzfärbungen an ganzen Tieren mit dem anti-CnASH-Peptidantikörper; (A, D, G, J, M) DNA-Färbung mit TO-PRO3; (B, E, H, K, N) anti-CnASH-Färbung; (C, F, I, L, O) Überlagerung aller Kanäle in Falschfarben: DNA (blau), anti-CnASH-Färbung (grün); Konfokale Projektionen; Maßstab: 50µm.

Hayakawa *et al.* (2004) hatten bereits zuvor die Expression des *Cnash*-Gens in Nervenzellen der Tentakel nachgewiesen. Durch Immunfluoreszenzfärbungen mit dem anti-Nv1-Antikörper, der spezifisch sensorische Nervenzellen in Tentakeln und Ganglionzellen im Stiel färbt (Hobmayer *et al.*, 1990), im Anschluß an *in situ*-Hybridisierungen konnten sie zeigen,

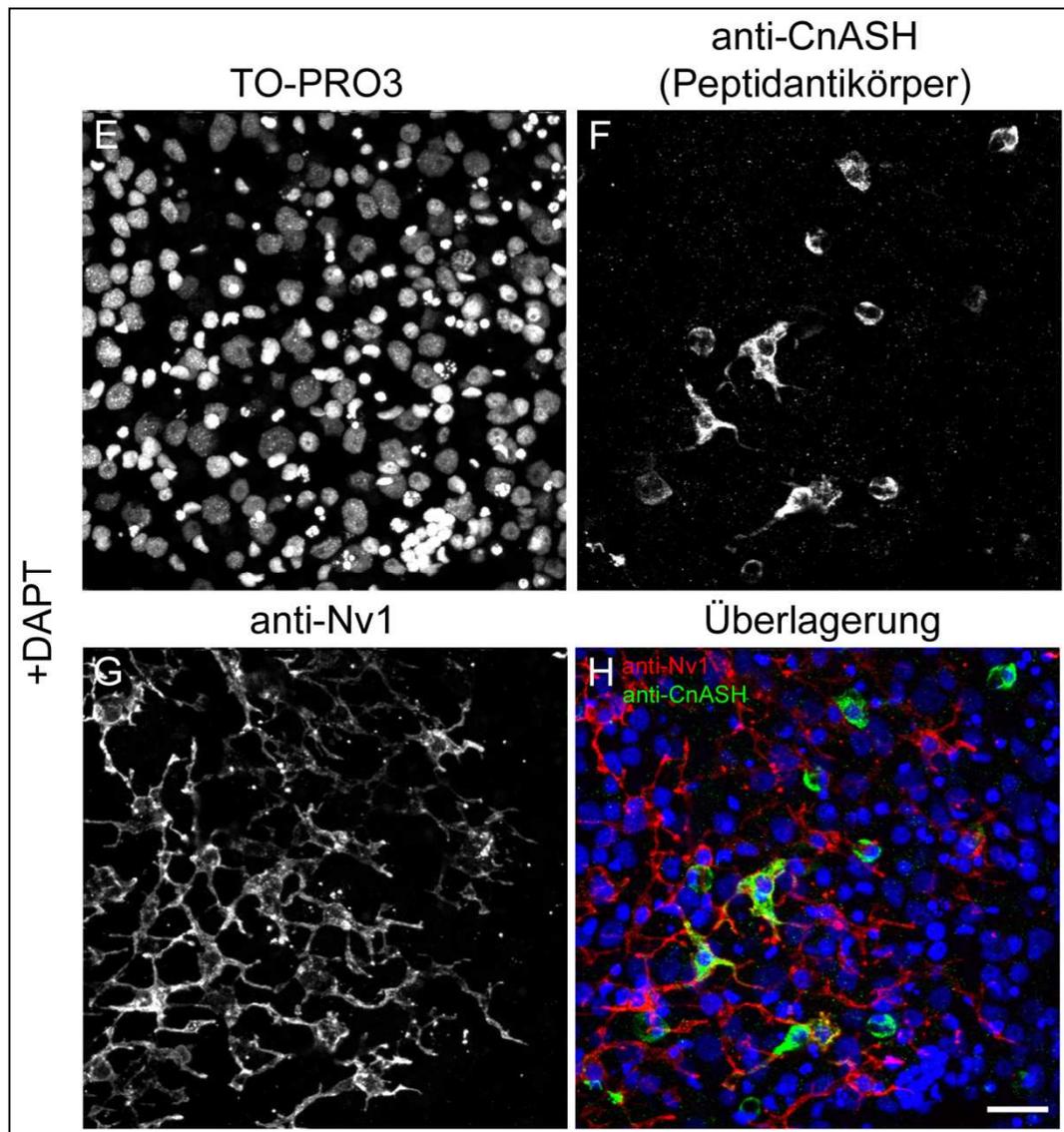
dass es sich dabei um zwei Populationen von CnASH-positiven Nervenzellen handelt: eine Subpopulation von CnASH-positiven Zellen konnte gleichzeitig mit dem anti-Nv1-Antikörper gefärbt werden, die zweite Subpopulation zeigte dagegen keine anti-Nv1-Färbung.

In der vorliegenden Arbeit wurden deshalb Co-Immunfluoreszenzfärbungen des anti-CnASH-Peptidantikörpers mit dem anti-Nv1-Antikörper durchgeführt. In Abb. 2-40 wird jeweils der Stiel der gefärbten *Hydra* betrachtet. Es wird deutlich, dass nicht alle Nv1-positiven Nervenzellen gleichzeitig auch das CnASH-Protein exprimieren. Im Gegensatz dazu sind alle hier gezeigten CnASH-positiven Neurone im Stiel auch Nv1-positiv. Im restlichen Tier gibt es jedoch zusätzliche CnASH-positive Nervenzellen, die keine Nv1-Färbung zeigen. Über das gesamte Tier verteilt gibt es demnach drei Subpopulationen von Nervenzellen: CnASH- und Nv1-positive Nervenzellen, CnASH-negative und Nv1-positive Zellen sowie CnASH-positive und Nv1-negative Neurone. So stimmen auch die Ergebnisse von Hayakawa *et al.* (2004) mit den hier erzielten überein. Die CnASH-Expression erweist sich demnach als differenziert innerhalb der gesamten Nervenzellpopulation.

Der Einfluss der Notch-Signaltransduktion auf die Proteinexpression von CnASH sollte nun auch durch Immunfluoreszenzen beobachtet werden. Dazu wurden Doppelfärbungen mit den anti-CnASH- und anti-Nv1-Antikörpern an DAPT-behandelten Tieren durchgeführt (siehe Abb. 2-40 E-H). Deutlich wird, dass sowohl Nv1- als auch CnASH-positive Nervenzellen trotz Notch-Inhibierung weiterhin vorhanden sind. Dies entspricht den Erwartungen gemäß Käsbauer *et al.* (2007), die zeigten, dass der Notch-Signalweg keinen Einfluss auf Nervenzellen hat.

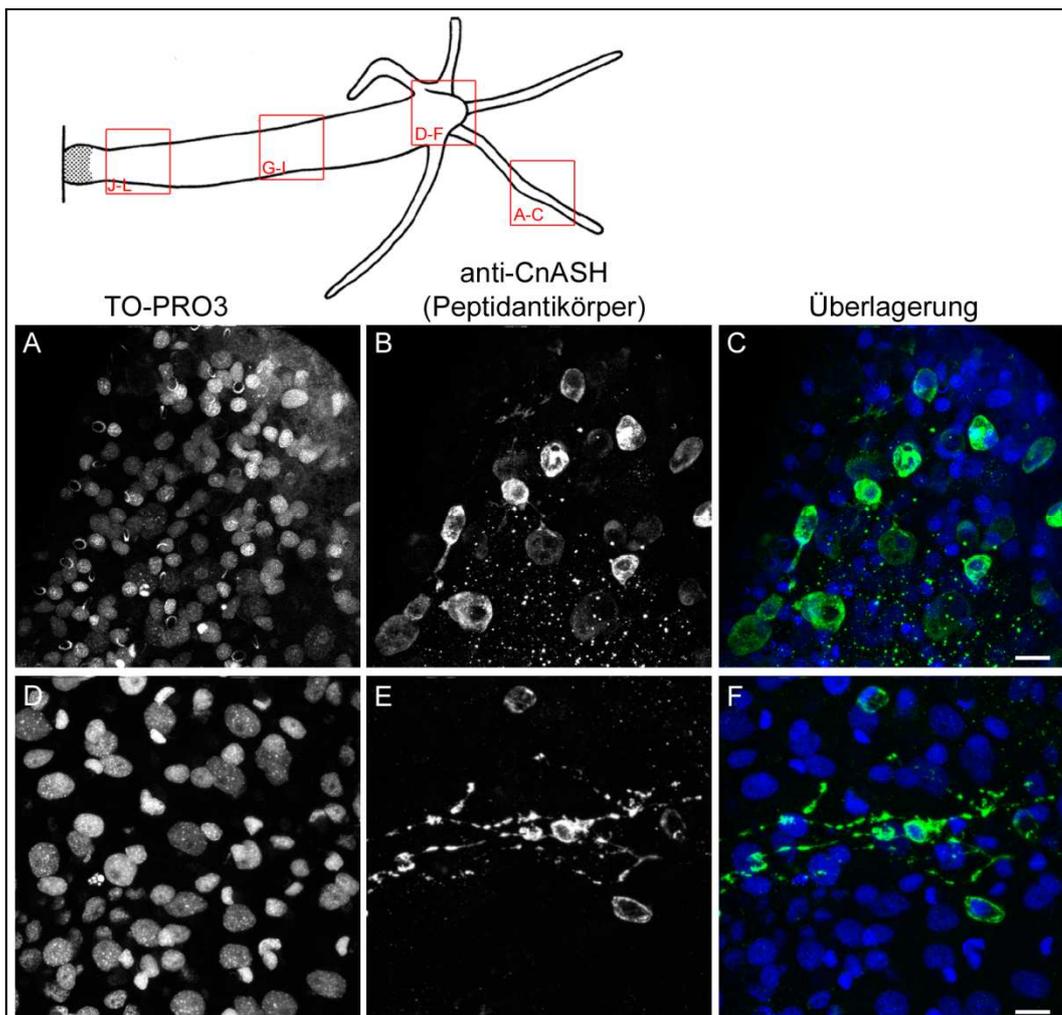


**Abb. 2-40:** Co-Immunfluoreszenzfärbungen an ganzen Hydren mit dem anti-CnASH-Peptidantikörper und anti-Nv1-Antikörper, Stiel; (A-D) Färbung mit anti-CnASH- und anti-Nv1-Antikörpern an unbehandelter *Hydra*; (E-H) Färbung mit anti-CnASH- und anti-Nv1-Antikörpern an DAPT-behandelter *Hydra*; (A, E) DNA-Färbung mit TO-PRO3; (B, F) anti-CnASH-Färbung; (C, G) anti-Nv1-Färbung; (D, H) Überlagerung aller Kanäle in Falschfarben: DNA (blau), anti-CnASH-Färbung (grün), anti-Nv1-Färbung (rot); (\*) CnASH-positive Nematocyte; Konfokale Projektionen; Maßstab: 20µm – Fortsetzung auf nächster Seite.

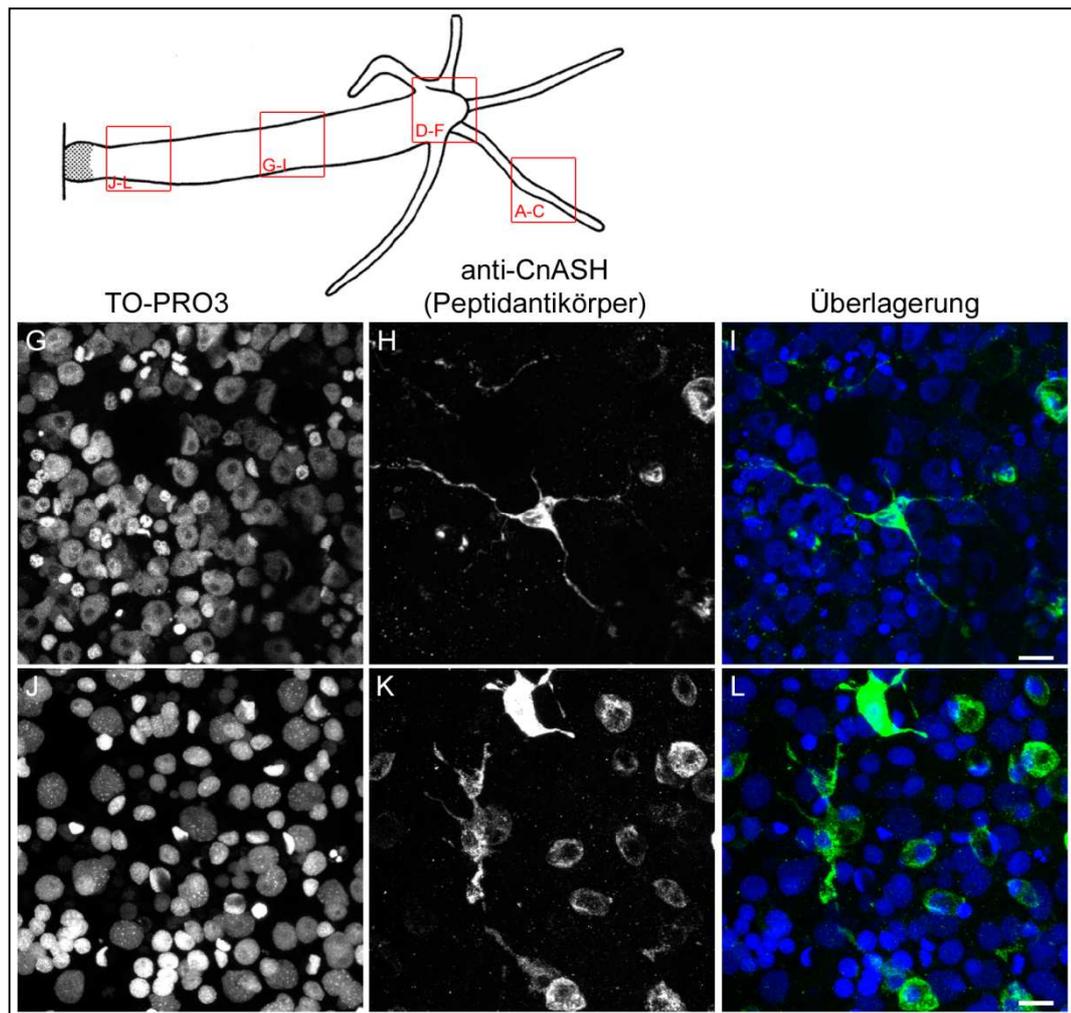


**Abb. 2 -40: Fortsetzung:** Co-Immunfluoreszenzfärbungen an ganzen Hydren mit dem anti-CnASH-Peptidantikörper und anti-Nv1-Antikörper, Stiel; (A-D) Färbung mit anti-CnASH- und anti-Nv1-Antikörpern an unbehandelter *Hydra*; (E-H) Färbung mit anti-CnASH- und anti-Nv1-Antikörpern an DAPT-behandelter *Hydra*; (A, E) DNA-Färbung mit TO-PRO3; (B, F) anti-CnASH-Färbung; (C, G) anti-Nv1-Färbung; (D, H) Überlagerung aller Kanäle in Falschfarben: DNA (blau), anti-CnASH-Färbung (grün), anti-Nv1-Färbung (rot); (\*) CnASH-positive Nematocyte; Konfokale Projektionen; Maßstab: 20µm.

Neben diesen Nervenzellen am Stiel wurden diejenigen anderer Körperregionen nach DAPT-Behandlung betrachtet. Wie bereits zuvor gezeigt, sind trotz inhibierter Notch-Signaltransduktion Neurone am Stiel weiterhin vorhanden (Abb. 2-41 J-L). Zudem wurden nach wie vor Nervenzellen an Tentakeln (Abb. 2-41 A-C), Hypostom (Abb. 2-41 D-F) und Rumpf (Abb. 2-41 G-I) mit dem anti-CnASH-Peptidantikörper gefärbt.



**Abb. 2-41:** Immunfluoreszenzfärbungen an ganzen Hydren mit dem anti-CnASH-Peptidantikörper nach DAPT-Behandlung; (A, D, G, J) DNA-Färbung mit TO-PRO3; (B, E, H, K) anti-CnASH-Färbung; (C, F, I, L) Überlagerung aller Kanäle in Falschfarben: DNA (blau), anti-CnASH-Färbung (grün); (A-C) Tentakel; (D-F) Hypostom; (G-I) Rumpf; (J-L) Stiel; Konfokale Projektionen; Maßstab: 10µm – Fortsetzung auf nächster Seite.



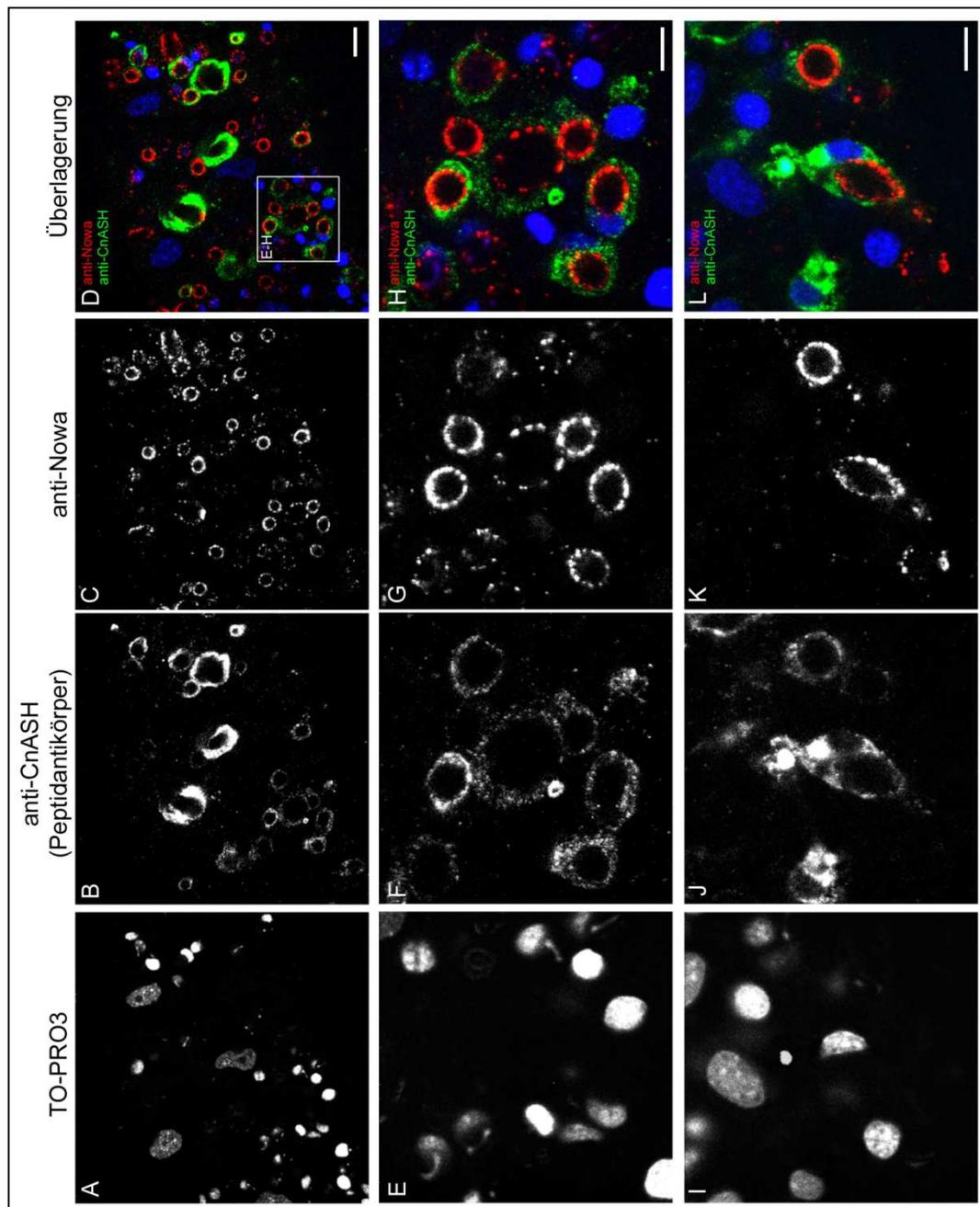
**Abb. 2-41 – Fortsetzung:** Immunfluoreszenzfärbungen an ganzen Hydren mit dem anti-CnASH-Peptidantikörper nach DAPT-Behandlung; (A, D, G, J) DNA-Färbung mit TO-PRO3; (B, E, H, K) anti-CnASH-Färbung; (C, F, I, L) Überlagerung aller Kanäle in Falschfarben: DNA (blau), anti-CnASH-Färbung (grün); (A-C) Tentakel; (D-F) Hypostom; (G-I) Rumpf; (J-L) Stiel; Konfokale Projektionen; Maßstab: 10µm.

Durch den anti-CnASH-Peptidantikörper wurden neben den Nervenzellen auch interstitielle Zellen, Nematoblasten und Nematocyten gefärbt (siehe Abb. 2-38). Zur genaueren Klassifizierung dieser Zelltypen wurden Co-

Immunfluoreszenzfärbungen mit den anti-Nowa- und anti-ZIC7A12-Antikörpern durchgeführt.

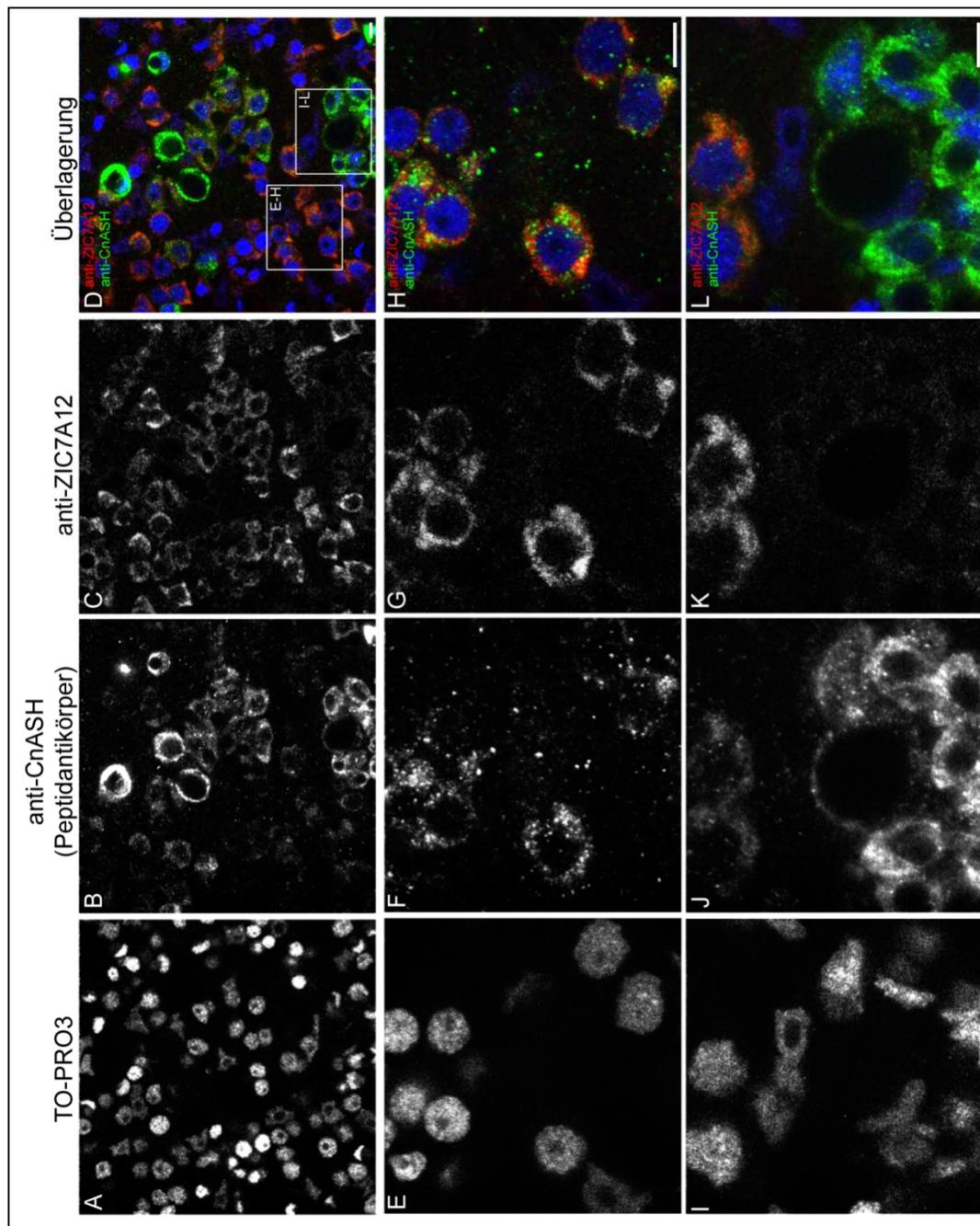
Der anti-Nowa-Antikörper färbt die äußere Kapselwand während der gesamten Entwicklung bis hin zur reifen Nematozyste (Engel *et al.*, 2001). Aus Abb. 2-42 wird deutlich, dass CnASH im Zytoplasma von Nematocyten im Tentakel vorhanden ist. Es umgibt reife Kapseln, deren äußere Wand durch den anti-Nowa-Antikörper gefärbt wurde.

Durch diese Co-Immunfluoreszenz wird zudem erkennbar, dass alle Nematocytentypen durch den anti-CnASH-Peptidantikörper gefärbt wurden. Während in Abb. 2-42 E-H eine Stenothele von mehreren Desmonemen umgeben wird, wird in Abb. 2-42 I-L eine Isorhize gezeigt.



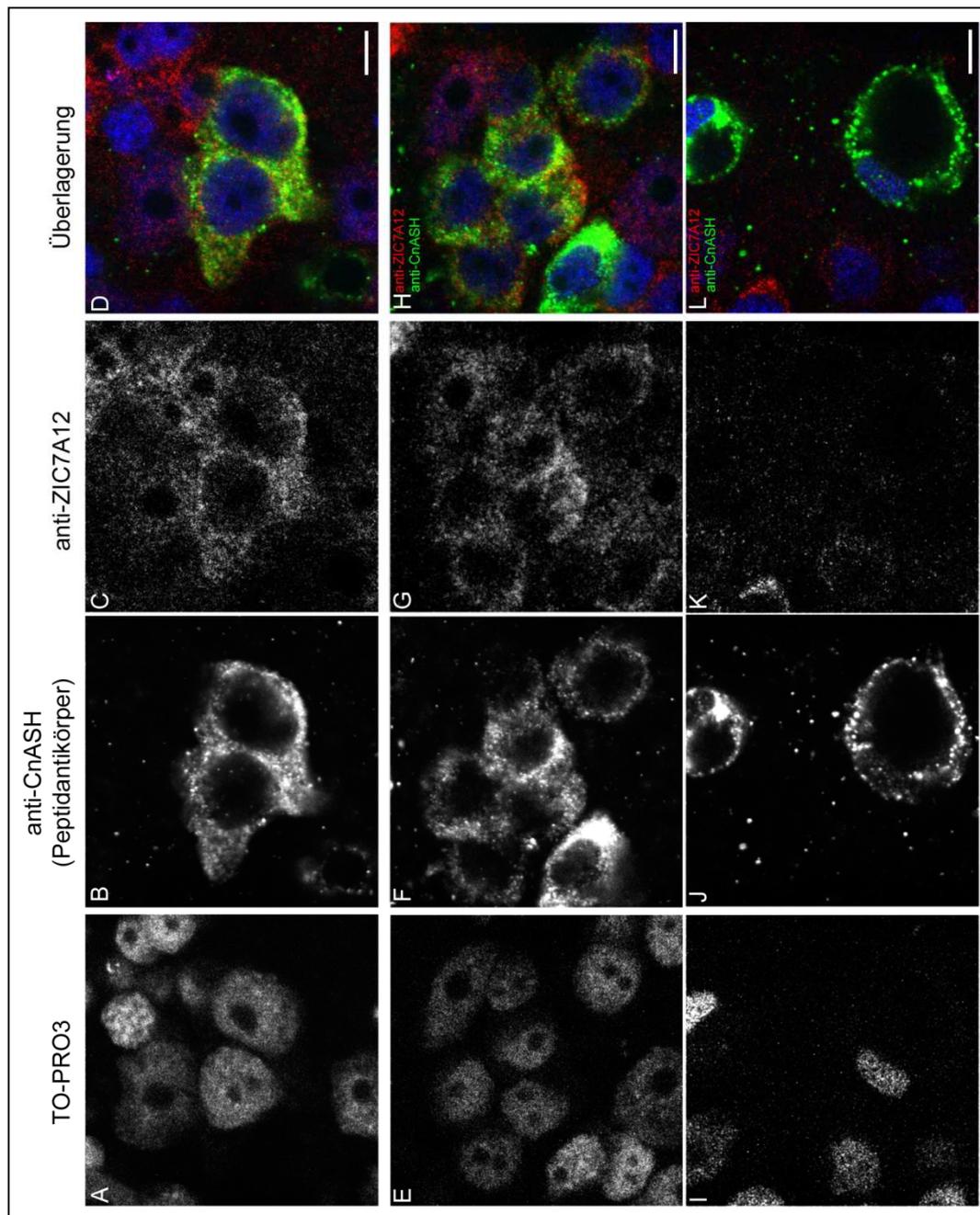
**Abb. 2-42:** Co-Immunfluoreszenzfärbungen an ganzen Hydren mit dem anti-CnASH-Peptidantikörper und anti-Nowa-Antikörper, Tentakel; (A, E, I) DNA-Färbung mit TO-PRO3; (B, F, J) anti-CnASH-Färbung; (C, G, K) anti-Nowa-Färbung; (D, H, L) Überlagerung aller Kanäle in Falschfarben: DNA (blau), anti-CnASH-Färbung (grün), anti-Nowa-Färbung (rot); Konfokale Schnitte; Maßstab: (A-D) 10µm, (E-L) 5µm.

Auch mit dem anti-ZIC7A12-Antikörper wurden Co-Immunfluoreszenzfärbungen durchgeführt. Dieser Antikörper färbt einzelne und doppelte interstitielle Zellen, sowie Nematoblasten (siehe 2.3.1). Durch diese Doppelfärbung wird verdeutlicht, dass durch den anti-CnASH-Peptidantikörper interstitielle Zellen detektiert werden, wobei alle ZIC7A12-positiven interstitiellen Zellen auch CnASH-positiv sind. Auch Nematoblasten ohne Vakuole wurden durch beide Antikörper gefärbt (siehe Abb. 2-43 E-H). Nematoblasten mit deutlicher Vakuole und Nematocyten wurden durch den anti-CnASH-, nicht aber durch den anti-ZIC7A12-Antikörper nachgewiesen (siehe Abb. 2-43 I-L). Zudem wird durch diese Co-Immunfluoreszenzfärbung erkennbar, dass die CnASH- und HyZic-Proteine umgekehrt reziproke Mengen aufweisen. Während HyZic in interstitiellen Zellen stark exprimiert wird, wird dessen Färbung in Nematoblasten ohne Vakuole schwächer, bis sie in solchen mit deutlicher Vakuole und Nematocyten nicht mehr detektierbar ist. CnASH ist dagegen in interstitiellen Zellen und Nematoblasten ohne Vakuole deutlich schwächer als in Nematoblasten mit deutlicher Vakuole und reifen Nematocyten (siehe Abb. 2-43 I-L).



**Abb. 2-43:** Co-Immunfluoreszenzfärbungen an ganzen Hydren mit dem anti-CnASH-Peptidantikörper und anti-ZIC7A12-Antikörper, Rumpf; (A, E, I) DNA-Färbung mit TO-PRO3; (B, F, J) anti-CnASH-Färbung; (C, G, K) anti-ZIC7A12-Färbung; (D, H, L) Überlagerung aller Kanäle in Falschfarben: DNA (blau), anti-CnASH-Färbung (grün), anti-ZIC7A12-Färbung (rot); Konfokale Schnitte; Maßstab: 5µm.

Interessant wird nun der Einfluss der Notch-Inhibierung auf die Expression von CnASH, als homologes Protein zu den proneuralen Achaete-Scute-Proteinen. Betrachtet wurden erneut Co-Immunfluoreszenzfärbungen der anti-CnASH- und anti-ZIC7A12-Antikörper an DAPT-behandelten Hydren. Sowohl anti-CnASH- und anti-ZIC7A12-positive interstitielle Zellen (siehe Abb. 2-44 A-D), als auch Nematoblasten ohne Vakuole (siehe Abb. 2-44 E-H) waren weiterhin detektierbar. Außerdem konnten reife Nematocyten nach wie vor nachgewiesen werden (siehe Abb. 2-44 I-L). Lediglich CnASH-positive Nematoblasten mit deutlicher Vakuole konnten nicht mehr gezeigt werden.



**Abb. 2-44:** Co-Immunfluoreszenzfärbungen an ganzen Hydren mit dem anti-CnASH-Peptidantikörper und anti-ZIC7A12-Antikörper nach DAPT-Behandlung, Rumpf; (A, E, I) DNA-Färbung mit TO-PRO3; (B, F, J) anti-CnASH-Färbung; (C, G, K) anti-ZIC7A12-Färbung; (D, H, L) Überlagerung aller Kanäle in Falschfarben: DNA (blau), anti-CnASH-Färbung (grün), anti-ZIC7A12-Färbung (rot); Konfokale Schnitte; Maßstab: 5µm.

Die erzielten Ergebnisse mit Hilfe des anti-CnASH-Peptidantikörpers zeigen, dass das CnASH-Protein bereits in interstitiellen Zellen exprimiert wird. Weiterhin liegt es in Nematoblasten mit und ohne Vakuole, sowie in reifen Nematocyten und Nervenzellen vor. Durch DAPT-Behandlung verändert sich dieses Expressionsmuster und auch die Lokalisation im Zytoplasma nicht. CnASH ist weiterhin in all diesen Zelltypen vorhanden. Allerdings sind Nematoblasten mit deutlicher Vakuole nicht mehr aufzufinden, wie bereits bei Käsbauer *et al.* (2007) beschrieben. Es ist also kein direkter Einfluss von Notch auf die Expression von CnASH feststellbar.

### 2.3.3 HyPOU4

Käsbauer *et al.* konnten 2007 zeigen, dass der Notch-Signaltransduktionsweg in *Hydra* eine wichtige Rolle bei der Differenzierung von Nematocytenvorläufern spielt. POU-Domänen-Transkriptionsfaktoren haben sich in diversen Organismen als wichtige Proteine für terminale Differenzierungsereignisse während der embryonalen Entwicklung herausgestellt (Ryan & Rosenfeld, 1997). Zudem wurden Interaktionen mit anderen Transkriptionsfaktoren wie Mash1 sowie Zusammenhänge mit der Notch-Signaltransduktion bereits beschrieben (Castro *et al.*, 2006). Aus diesem Grund sollten Homologe in *Hydra* gesucht und im Hinblick auf den Notch-Signalweg betrachtet werden.

Mit diversen *Pou*-Genen aus der Maus wurde durch Blast gegen das *Hydra*-Genom nach Homologen in *Hydra* gesucht. Entsprechende Genvorhersagen wurden bezüglich ihrer Domänenstrukturen untersucht, so dass letztendlich zwei Kandidaten identifiziert werden konnten, die sowohl die POU-Homeodomäne als auch die POU-spezifische Domäne tragen.

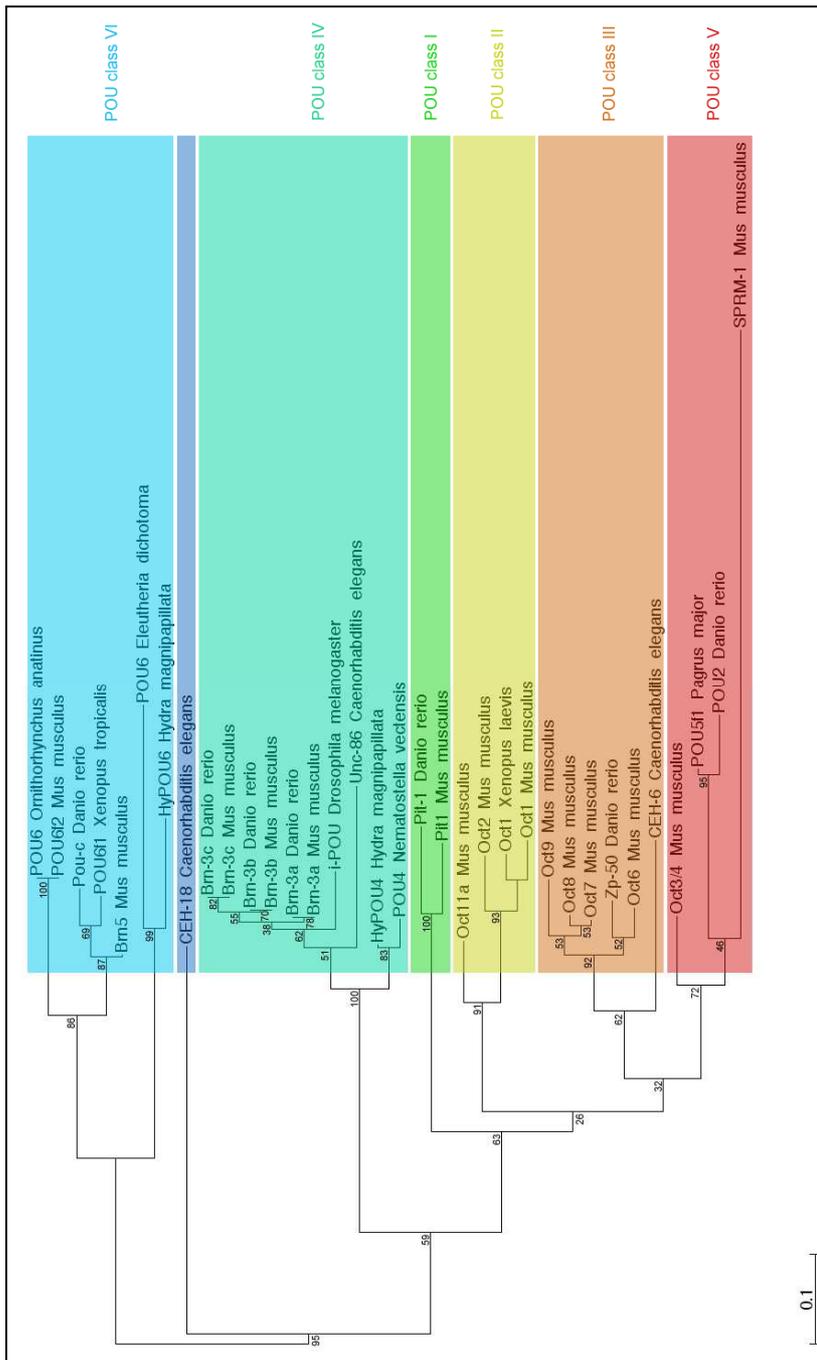
Diese wurden entsprechend ihrer Gruppierung in die spezifischen Klassen *HyPou4* beziehungsweise *HyPou6* benannt (siehe Tabelle 1).

**Tabelle 1:** Kandidatengene aus *Hydra* als Homologe zu *Pou*-Genen

<b>Genvorhersage</b>	<b>Klasse</b>	<b>Name</b>
Hma2.234364	IV	<i>HyPou4</i>
Hma2.205811	VI	<i>HyPou6</i>

Aufgrund eines „Alignments“ der POU-spezifischen Domäne (POU<sub>S</sub>), der POU-Homeodomäne (POU<sub>HD</sub>) sowie der Linkerregion wurde ein phylogenetischer Stammbaum der potentiellen Proteinsequenzen von HyPOU4 und HyPOU6 sowie diverser homologer Proteine erstellt.

Mit Hilfe dieses Stammbaums wird die Zugehörigkeit der beiden *Hydra*-Proteine zu den Klassen IV und VI deutlich.



**Abb. 2-45:** POU-Stammbaum; *Neighbour joining tree* auf Basis eines *ClustalX-Alignments* der POU<sub>S</sub>-, POU<sub>HD</sub>-Domänen und der Linkerregion diverser POU-Domänen-Proteine; Gruppierung in 6 Klassen: Klasse I (grün), Klasse II (gelb), Klasse III (orange), Klasse IV (türkis), Klasse V (rot), Klasse VI (blau); Zahlen geben prozentuelle Werte der 10.000 *bootstraps* an (Masterarbeit Maria Theresa Grundhuber).

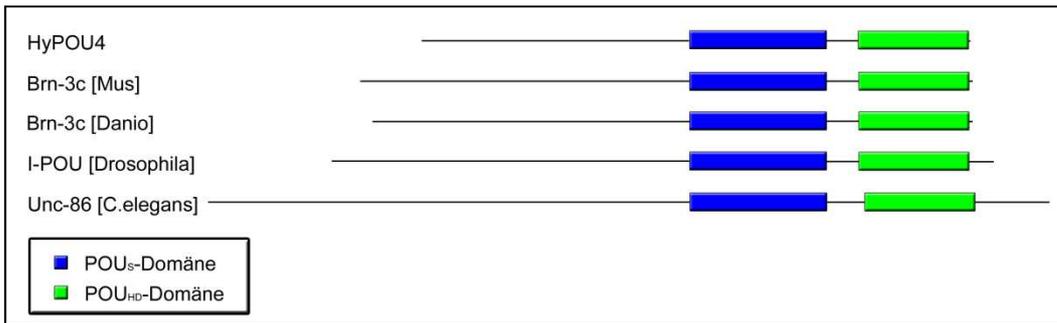
Da die Mitglieder der Klasse IV im Allgemeinen an neuronaler Entwicklung beteiligt sind, sind sie für die vorliegende Arbeit besonders interessant. *HyPou4* wurde deshalb zunächst aus cDNA von *Hydra vulgaris* gewonnen und sequenziert. Damit konnte die tatsächliche Existenz dieses Gens nachgewiesen werden.

Anhand der Gegenüberstellung der HyPOU4-Proteinsequenz mit der eines Vertreters der Klasse IV aus Maus, BRN-3c, wird einerseits die Zugehörigkeit zur Klasse IV erneut verdeutlicht. Andererseits wird die starke Konservierung der POU<sub>S</sub>- und POU<sub>HD</sub>-Domänen sichtbar (siehe Abb. 2-46).

mBRN-3c	MMAMNAKHRFGMHPVLQEPKFSSLLHSGSEAMRRVCLPAPQLQGNIFGSFDESLARAEALAAVDIVSHGKNHPFKPDATYHT
HyPOU4	-MFSHVKG-YGVSNMFDNMDDSHLLGSQIDSMSKYLKPKQSGGSKLPSAFLHSLHANQDP-----TQYDPHDILDQ
mBRN-3c	MSSVPCTSTSPVPI SHPAALTSHPHHAHVHQLEGDLLEHISPTLSVSGLGAP EHSVMPAQIHPHHLGAMGHLHQAMGMSHP
HyPOU4	ISASLQPNANENSYEHHSTAISSN-----TNNYSTSHLLSPSSSTSFSTSFNNPNFSSFNNNSFAAA----A
mBRN-3c	HAVAPHSAMPACLSDVESDPRELEAFAERFKQRRIKLGVTDQADVGAALANLKI PGVGSLSQSTICRFESLTLSHNNMIALKE
HyPOU4	AAAAAAAAAAQVGGQEV ECTPRELEWFAERFKQRRIKLGVTDQADVGTALAHKLKLPVGSLSQSTICRFESLTLSHNNMMALKE
mBRN-3c	VLQAWLEEAFAAYREKNSKPELFGNSEKRRKRTSIAAPEKRSLEAYFAIQPRPSSDKIAAIAEKLDLKKNVVRFVFCNQRQK
HyPOU4	VLSAWLDEAFRANRMKSKDSAFLPNADKRRKRTSICAAEKRSLEAYFAMQPRPSSDKIAAIAEKLDLKKNVVRFVFCNQRQK
mBRN-3c	QKRMKYSAVD
HyPOU4	KKRMKFSVH-

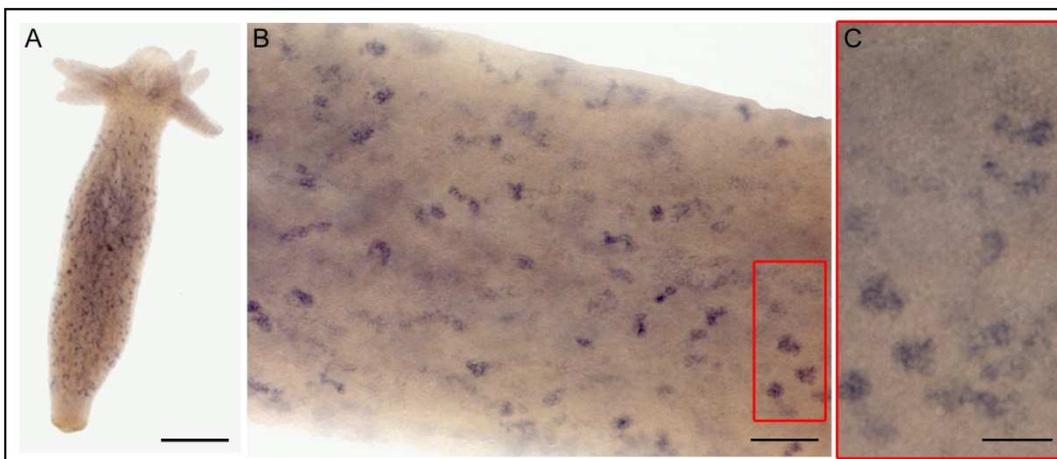
**Abb. 2-46:** Gegenüberstellung von mBRN-3c und HyPOU4; POU<sub>S</sub>-Domäne (blau), POU<sub>HD</sub>-Domäne (grün); Identische Aminosäuren sind grau hinterlegt.

Der modulare Aufbau wird außerdem an der schematische Darstellung des HyPOU4 im Vergleich zu anderen Klasse IV-Proteinen deutlich.



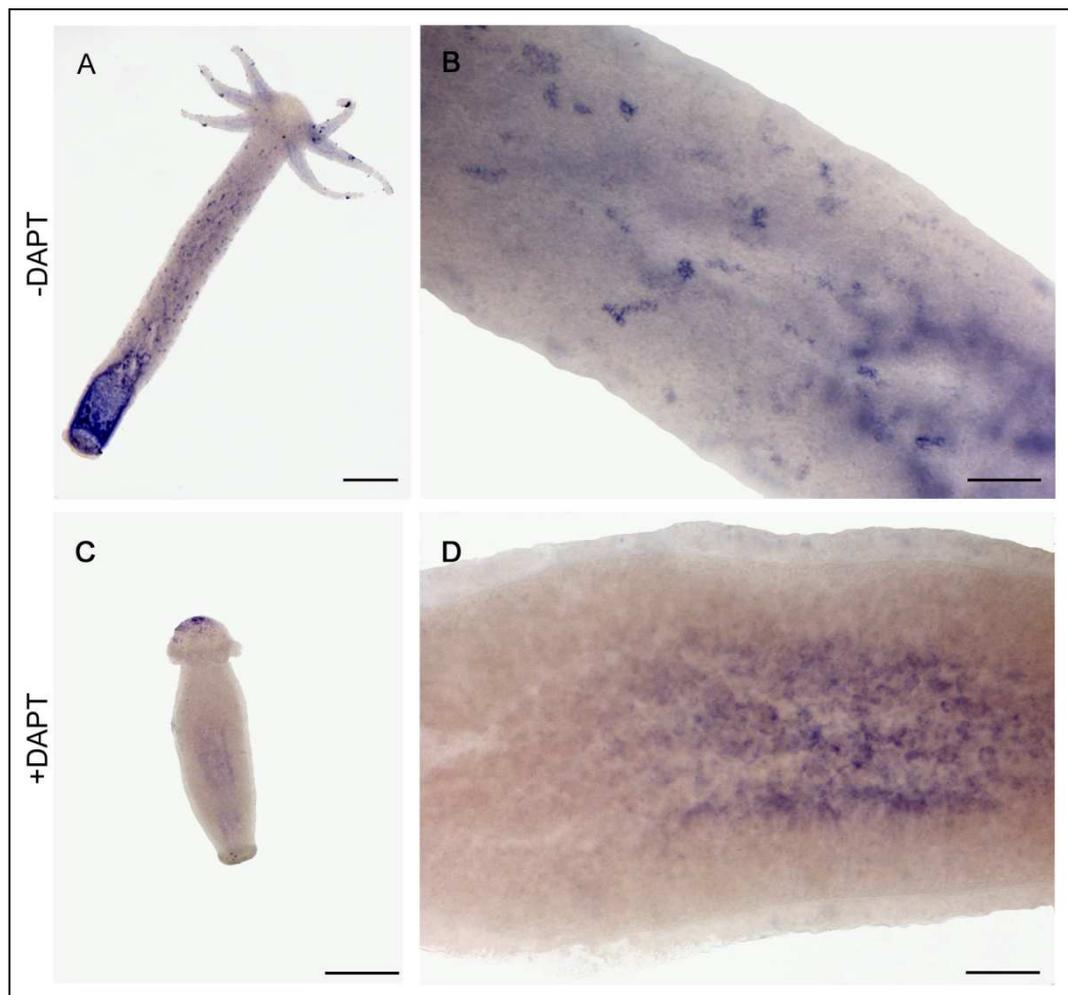
**Abb. 2-47:** HyPOU4-Domänenstruktur im Vergleich zu Klasse IV-POU-Domänen-Proteinen aus Maus, Zebrafisch, *Drosophila* und *C.elegans*; POU<sub>S</sub>-Domäne (blau); POU<sub>HD</sub>-Domäne (grün).

Schließlich sollte die Expression des *HyPou4*-Gens durch *in situ*-Hybridisierungsexperimente beobachtet werden. Es wurden dabei eindeutig Nematoblasten markiert, wobei es sich um Nester aus 4 bis 16 Zellen handelt (siehe Abb. 2-48).



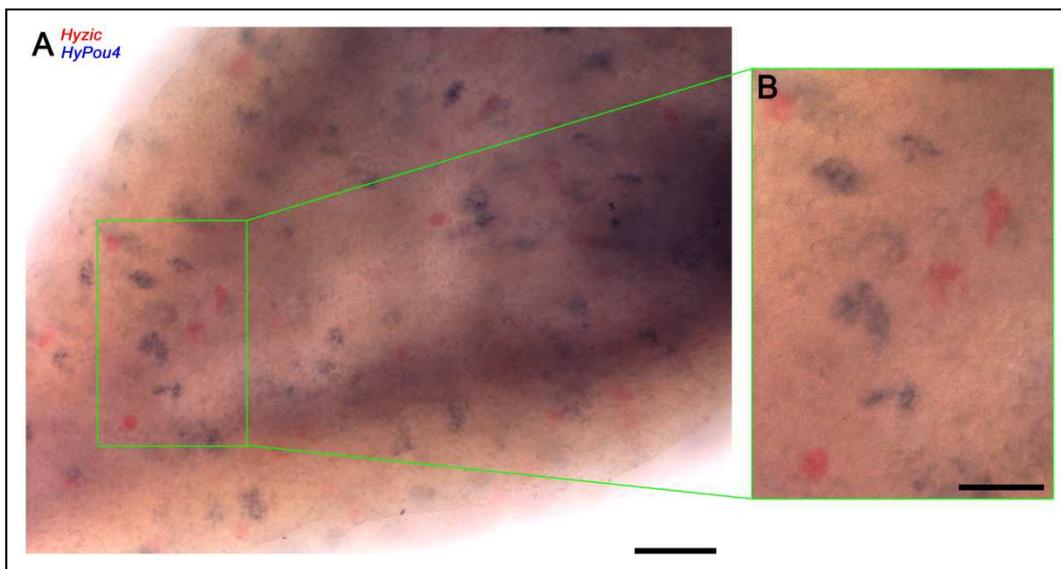
**Abb. 2-48:** *In situ*-Hybridisierungen an ganzen Tieren für *HyPou4*; NBT/BCIP wurde für die Färbereaktion verwendet (blaue Signale); Maßstab: (A) 200µm, (B) 40µm, (C) 20µm.

Ob es sich dabei um prä- oder post-mitotische Nematoblasten handelt, war dadurch aber noch unklar. Deshalb wurden Tiere 48 Stunden mit DAPT behandelt und die *HyPou4*-Expression anschließend betrachtet. Während bei Kontrolltieren weiterhin eine Färbung in Nestern sichtbar ist (siehe Abb. 2-49 A, B), verschwindet diese nach DAPT-Behandlung vollkommen (siehe Abb. 2-49 C, D).



**Abb. 2-49:** *In situ*-Hybridisierungen an ganzen Tieren für *HyPou4*; (A-B): Kontrolltier; (C-D): DAPT-behandeltes Tier; NBT/BCIP wurde für die Färbereaktion verwendet (blaue Signale); Maßstab: (A, C) 200µm, (B, D) 40µm.

Es besteht einerseits die Möglichkeit, dass die Expression des *HyPou4* durch Blockieren des Notch-Signalwegs inhibiert wird. Andererseits kann es sich bei den *HyPou4*-positiven Nematoblasten um post-mitotische Zellen handeln, deren Entstehung nach Inhibierung des Notch-Signalwegs gehemmt ist (Käsbauer *et al.*, 2007). Um dies zu klären, wurden Doppel-*in situ*-Hybridisierungsexperimente mit *Hyzic* und *HyPou4* durchgeführt, um eine genauere Spezifikation der *HyPou4*-positiven Nematoblasten zu erlauben (siehe Abb. 2-50).



**Abb. 2-50:** *In situ*-Hybridisierungen an ganzen Tieren für *HyPou4* und *Hyzic*; NBT/BCIP wurde für die Färbereaktion von *HyPou4* verwendet (blaue Signale), FastRed wurde für die Färbereaktion von *Hyzic* verwendet (rote Signale); Maßstab: (A) 200 $\mu$ m, (B) 20 $\mu$ m.

Durch dieses Experiment wird deutlich, dass es sich bei den *HyPou4*- und *Hyzic*-positiven Nematoblasten um unterschiedliche Nester handelt. Da *Hyzic* in prä-mitotischen Nematoblasten exprimiert wird, kann man davon ausgehen, dass es sich deshalb bei den *HyPou4*-positiven Nematoblasten um post-mitotische Zellen handelt, so dass auch die fehlende Expression

nach DAPT-Behandlung durch das Verschwinden dieses Zelltyps erklärt werden kann (Käsbauer *et al.*, 2007).

### 3 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit konnten weitere wichtige Mitglieder der Notch-Signaltransduktion in *Hydra* identifiziert werden. Vor allem der DSL-Ligand in *Hydra*, HyJagged, wurde genauer analysiert. Außerdem wurde der Einfluss der Notch-Signaltransduktion sowohl auf die Knospung als auch auf die Nematocytyendifferenzierung im Detail betrachtet. Dabei wurden die Expressionen von HyJagged, HyZic, CnASH und HyPOU4 auf Gen- und Proteinebene beobachtet.

#### 3.1 Der Notch-Ligand in *Hydra*

##### ***Identifikation von DSL-Domänen in Hydra***

Die DSL-Domäne ist eine für Notch-Liganden charakteristische Domäne. In *Hydra* konnten auf Grund dieser Sequenz zwei potentielle Liganden identifiziert werden. Während es sich bei HyDSL um einen nicht kanonischen, löslichen Liganden handelt, ist HyJagged ein perfekter, kanonischer Notch-Ligand.

Derzeit sind lediglich in *C.elegans* lösliche Notch-Liganden (DSL1-7, ARG-1) bekannt, wobei bisher nur die Aktivität von DSL1 bewiesen wurde (Chen & Greenwald, 2004). HyDSL wurde auf Grund seiner Homologie zu den sezernierten Liganden in *C.elegans* HyDSL benannt (siehe Abb. 2-1). Im Rahmen einer Arbeit zur Identifikation Zelltyp-spezifischer Gene wurde dieser Ligand zudem zeitgleich entdeckt und dessen Expression in Drüsenzellen nachgewiesen (siehe Abb. 2-3, Hwang *et al.*, 2007).

Bei dem Wnt Antagonisten *hydkk1/2/4* handelt es sich ebenfalls um ein in Drüsenzellen spezifisch exprimiertes Gen. Dabei erscheint *hydkk1/2/4* im

gesamten Rumpf, nicht aber im Hypostom. Besonders auffällig ist zudem die vermehrte Expression während der frühen Kopfregeneration an der Verletzungsstelle (Guder *et al.*, 2005). Da auch die Notch-Signaltransduktion bei der Musterbildung am Kopf eine entscheidende Rolle spielt (Doktorarbeit T. Käsbauer), stellt sich die Frage, ob auch *Hydsl* als potentieller Notch-Ligand, der ebenfalls in Drüsenzellen exprimiert wird, bei der Regeneration hochreguliert wird.

Außerdem bleibt derzeit ungeklärt, ob HyDSL in der Lage ist, HvNotch zu binden und effizient zu aktivieren. Die Kenntnisse darüber, dass die Aktivierung des Notch-Signalwegs die Epsin-abhängige Endozytose des DSL-Liganden erfordert (Wang & Struhl, 2004), erschweren die Vorstellung, dass lösliche DSL-Liganden zur Notch-Aktivierung führen können. Es wurde bereits vermehrt beobachtet, dass sezernierte DSL-Proteine dafür in Clustern vorliegen oder immobilisiert werden müssen (Wang *et al.*, 1998; Varnum-Finney *et al.*, 2000). Denkbar ist, dass ein Adaptormolekül existiert, das die sezernierten Proteine an die Plasmamembran bindet und damit eine aktivierende Endozytose erlaubt wird (Gordon *et al.*, 2007). Ob es auch in *Hydra* ein solches Adaptormolekül gibt, das den Liganden an die Membran bindet und so die Epsin-abhängige Endozytose erlaubt, bleibt derzeit noch ungeklärt.

Neben HyDSL wurde im Rahmen dieser Arbeit ein kanonischer Notch-Ligand, HyJagged, identifiziert und analysiert. Er weist mit dem Signalpeptid, den EGF-Wiederholungen, der DSL-Domäne und der Transmembrandomäne alle für einen DSL-Liganden erforderlichen Sequenzen auf. Zusätzlich dazu besitzt das homologe Protein in *Hydra* unmittelbar vor der Transmembrandomäne einen für Jagged und Serrate typischen Cysteinreichen Bereich, auch von Willebrand Typ C (VWC)-Domäne genannt (siehe Abb. 2-6). Der DSL-Ligand aus *Hydra* wurde deshalb HyJagged benannt. Ein phylogenetischer Stammbaum aller, kanonischer Notch-

Liganden aus *C.elegans*, *Drosophila*, Zebrafisch, *Xenopus*, Huhn, Maus, Mensch und *Hydra* zeigt die Einordnung der DSL-Proteine in die beiden großen Gruppen der Delta- und Jagged-Proteine. Die Homologen aus *C.elegans*, *Drosophila* und *Hydra* befinden sich außerhalb dieser Gruppen, so dass die evolutionär frühe Entstehung dieser Proteine deutlich wird (siehe Abb. 2-7).

Der Vergleich der Exon-Intron-Strukturen von *mJagged1* und *Hyjagged* verdeutlicht weiterhin den modularen Aufbau der resultierenden Proteine (siehe Abb. 2-8). EGF-Wiederholungen werden überwiegend durch ein einziges Exon kodiert, so dass die größeren Zahlen dieser Domänen in höheren Organismen durch Exon-Duplikationen erklärt werden können. Die DSL-Domäne, die bei *Hyjagged* auf drei Exone aufgeteilt wurde, liegt bei *mJagged1* auf einem einzigen vor, so dass es hier scheinbar zur Fusion von Exonen gekommen ist. Die VWC-Domäne wurde dagegen im Verlauf der Evolution durch ein Intron getrennt. Sowohl in *Hydra* als auch in Maus liegen die Signalpeptide getrennt auf zwei Exonen vor, während die Transmembrandomänen jeweils durch ein einziges Exon kodiert werden. Im Verlauf der Evolution kam es demnach zur Modulation der homologen Gene, wobei zahlreiche Exon-Intron-Grenzen als konservierte Sequenzen erhalten wurden.

### **Zelluläre Lokalisation von HyJagged**

Ektopisches HyJagged-GFP konnte in ringförmigen und globulären Strukturen im Zytoplasma detektiert werden. Auf Grund der Ähnlichkeit zu überexprimiertem HvNotch-GFP (Käsbauer *et al.*, 2007) wurden HyJagged-GFP und HvNotch-RFP zeitgleich exprimiert und damit die Lokalisation in denselben Strukturen an fixierten Tieren nachgewiesen (siehe

Abb. 2-10). Weder der Notch-Ligand noch der –Rezeptor befand sich allerdings an der Membran, wie es für ein Transmembranprotein erwartet wird. Käsbauer *et al.* (2007) konnten bereits zuvor zeigen, dass die Membranlokalisation von HvNotch durch Fixierung verloren geht, diese aber am lebendigen Tier sehr wohl nachweisbar ist. Aus diesem Grund wurde auch HyJagged an lebenden Hydren beobachtet. Die Tiere wurden zugleich mit dem Membran- und Endosomenmarker FM4-64 gefärbt (siehe Abb. 2-11). Eine eindeutige Membranlokalisation von ektoischem HyJagged, wie dies für HvNotch der Fall ist, wurde dabei allerdings nicht gezeigt. Viel deutlicher erschienen erneut die globulären und ringförmigen Strukturen im Zytoplasma. Bei längerer Inkubation der Hydren in FM4-64 wird dieser Farbstoff, der zuvor in die Plasmamembran inseriert wurde, durch Einschnürung der markierten Membran in endozytische Vesikel aufgenommen. So wird anhand der Überlagerung von HyJagged mit FM4-64 erkennbar, dass es sich bei den globulären Strukturen um frühe, bei den ringförmigen Strukturen um spätere Endosomen handelt. Die Lokalisation von HyJagged in endozytotischen Vesikeln, die durch Einschnürung der Plasmamembran entstehen, geht allerdings mit einem vorherigen Aufenthalt an der Zelloberfläche einher, der aber scheinbar nur kurz anhält. Auch von *Drosophila* Serrate und Delta ist bekannt, dass sie sich überwiegend in intrazellulären Vesikeln aufhalten, während sie an der Zelloberfläche nicht in detektierbaren Mengen erscheinen (Kooch *et al.*, 1993; Parks *et al.*, 2000; Wang & Struhl, 2005).

Da HvNotch ebenfalls in endozytotischen Vesikeln detektiert wurde, stellte sich die Frage, ob sich HvNotch und HyJagged auch am lebendigen Tier in derselben Endosomenpopulation aufhalten (siehe Abb. 2-12). HvNotch liegt dabei lediglich in globulären Strukturen unterschiedlicher Größen vor, wobei die kleineren mit den HyJagged-positiven Endosomen überlappen, während die größeren die ringförmigen HyJagged-Strukturen ausfüllen.

HyJagged liegt demnach scheinbar stets in der Endosomenmembran vor, während sich HvNotch zusätzlich auch im Endosomenlumen aufhält. Es ist möglich, dass überexprimiertes HvNotch-RFP während der Endozytose derart prozessiert wird, dass zumindest das C-terminale RFP in das Endosomenlumen entlassen wird. Denkbar ist allerdings auch, dass HvNotch-RFP auf diesem Weg degradiert wird und sich deshalb im Lumen aufhält, während HyJagged-GFP weiterhin bis zum Recycling an die Zelloberfläche in der Endosomenmembran verweilt.

Es ist durchaus denkbar, dass sich ektoisches HyJagged anders verhält, als der endogene Notch-Ligand. Aus diesem Grund wurde HyJagged auf Proteinebene mit Hilfe eines neu produzierten polyklonalen Antikörpers aus Kaninchen gegen ein Peptid der intrazellulären Domäne von HyJagged analysiert. So konnte durch spezielle Fixierung mit Ethanol und anschließender Färbung mit diesem anti-JAG-IC-Peptidantikörper eine Membranlokalisierung, wie sie für ein Transmembranprotein erwartet wird, gezeigt werden (siehe Abb. 2-15 und Abb. 2-16). Besonders deutlich erschien diese in ektodermalen Epithelzellen im Stiel in einer Ebene, in der sich die Kerne der betreffenden Zellen befinden. In höheren Ebenen, in denen sich die interstitiellen Stammzellen und deren Differenzierungsprodukte aufhalten, wird wiederum die Lokalisation von HyJagged vor allem in Endosomen deutlich. Eine eindeutige Membranfärbung ist deshalb nicht erkennbar, obwohl denkbar ist, dass der DSL-Ligand auch in diesen Zellen an der Oberfläche vorliegt.

Zur genaueren Einordnung der HyJagged-exprimierenden Zellen wurden diverse Co-Immunfluoreszenzfärbungen durchgeführt.

Bei Betrachtung von transgenen Hydren, die GFP in ektodermalen bzw. endodermalen Epithelzellen unter Kontrolle des Aktin-Promotors exprimieren (Wittlieb *et al.*, 2006), und anschließender Färbung mit dem

anti-JAG-IC-Antikörper wird deutlich, dass diese endozytotischen Vesikel sowohl in ektodermalen als auch in endodermalen Epithelzellen vorliegen (siehe Abb. 2-17). Co-Immunfluoreszenzfärbungen des anti-JAG-IC-Antikörpers mit den anti-ZIC7A12- und anti-Nv1-Antikörpern konnte außerdem zeigen, dass die HyJagged-positiven Endosomen in einzelnen und doppelten interstitiellen Zellen, Nematoblasten mit und ohne Vakuole, Nematocyten und Nervenzellen detektiert werden können (siehe Abb. 2-18 und Abb. 2-20).

Diese Immunfluoreszenzfärbungen wurden jeweils nach Fixierung mit 4%PFA durchgeführt. Durch diese Behandlung wird die Plasmamembran zerstört, so dass eine Lokalisation des HyJagged an der Zelloberfläche nicht nachgewiesen werden kann. Auf diese Weise wird allerdings die starke Färbung des DSL-Liganden in Nervenzellen am ganzen Tier erkennbar, vor allem aber in Neuronen der Fußscheibe (siehe Abb. 2-19).

Diese Ergebnisse zeigen, dass HyJagged demnach in alle Zelltypen in endozytotischen Vesikeln vorliegt. Lediglich in Nervenzellen erscheint HyJagged besonders intensiv gefärbt. Auch HvNotch wurde durch Käsbauer *et al.* (2007) in allen Zellen detektiert.

Bei Anwesenheit von DSL-Liganden und Notch-Rezeptoren in denselben Zellen kann es zur *cis*-Interaktion kommen, die eine gegenseitige Inaktivierung zur Folge hat. Dieses Phänomen wurde bereits in *Drosophila*, Zebrafisch und *C.elegans* beschrieben (Jacobsen *et al.*, 1998; Matsuda & Chitnis, 2009; Shaye & Greenwald, 2005). Sind hohe Mengen sowohl des Rezeptors als auch des Liganden an der Zelloberfläche vorhanden, reichen kleine Unterschiede von DSL-Ligand und Notch eventuell nicht für zielführende laterale Inhibition aus. Stattdessen käme es unter Umständen zu beiderseitiger Inhibition eines spezifischen Zellschicksals. *Cis*-Interaktionen von Rezeptor und Ligand führen dagegen zur Ausbildung

eines Komplexes, der anschließend internalisiert wird, so dass beide Moleküle nicht mehr für Signaltransduktion zur Verfügung stehen. Geringe Überschüsse an Notch oder DSL-Ligand, die sich dann an der Plasmamembran aufhalten, erlauben so ein effizientes laterales „*Signalling*“, unabhängig von transkriptioneller Regulation und „*feedback*“-Mechanismen (Matsuda & Chitnis, 2009; Sprinzak *et al.*, 2010).

Die Interaktion von Rezeptor und Ligand in *trans* führt zur Endozytose des Liganden und in Folge dessen zur Notch-Aktivierung, wobei diese Internalisierung von den E3-Ubiquitinligasen Neuralized und Mindbomb abhängig ist, die den Liganden zuvor monoubiquitinylieren. Bei *cis*-Interaktionen kommt es ebenfalls zur Endozytose beider Transmembranmoleküle. Ob allerdings Neuralized und/oder Mindbomb für diesen Vorgang ebenfalls erforderlich sind, bleibt derzeit unklar (Matsuda & Chitnis, 2009). Bekannt ist außerdem, dass DSL-Liganden durch vielfache endozytotische Wege internalisiert werden, allerdings führt lediglich die Epsin-abhängige Endozytose zur Notch-Aktivierung. Das Adaptorprotein Epsin erkennt monoubiquitinylierte Zelloberflächenproteine und führt mit Hilfe der assoziierten Endozytosemaschinerie zur Internalisierung dieser Proteine (Wang & Struhl, 2004). Diese Kenntnisse legen die Vermutung nahe, dass es nur in Folge der *trans*-Interaktion von Rezeptor und Ligand zur Monoubiquitinylierung des DSL-Liganden und zur anschließenden Epsin-abhängigen Endozytose und Notch-Aktivierung kommt. Bei *cis*-Interaktionen wird dagegen eventuell ein alternativer Internalisierungsweg eingeschlagen.

In *Hydra* halten sich der ektopische DSL-Ligand HyJagged und überexprimiertes HvNotch überwiegend in denselben Endosomen auf. Dies kann demnach durch *cis*-Interaktionen an der Plasmamembran mit anschließender Endozytose erklärt werden. Obwohl sowohl Rezeptor als auch Ligand in allen Zelltypen vorhanden sind, ist auf diese Weise auch in

*Hydra* eine Feinabstimmung der Notch-Signaltransduktion möglich. Große Mengen dieser Transmembranproteine werden durch Internalisierung inaktiviert, so dass verbleibende kleine Überschüsse zur effizienten Notch-Aktivierung führen können. Ob es durch vermehrte Expression von *Hyjagged* in bestimmten Situationen zu einem solchen Überschuss des Liganden kommt, sollte durch *in situ*-Hybridisierungen geklärt werden.

Münder *et al.* (2010) konnten kürzlich die Expression des Notch-Zielgens *HyHes* und damit die Notch-Aktivierung an der Basis später Knospentadien (Stadium 8) nachweisen. Diese Kenntnis führte zu der Annahme, dass auch der Notch-Ligand in *Hydra*, *Hyjagged*, während der Knospung vermehrt exprimiert wird. *In situ*-Hybridisierungsexperimente mit einer *Hyjagged*-spezifischen Sonde zeigten die Expression des Liganden während sehr später Knospentadien (Stadium 9-10) im Ektoderm des Muttertieres (siehe Abb. 2-21).

Münder *et al.* (2010) zeigten zudem, dass *HyHes* und der *Hydra* FGF-Rezeptor *kringelchen* in benachbarten Zellen exprimiert werden. Es wird demnach erwartet, dass der Notch-Ligand *Hyjagged* ebenfalls in den *HyHes*-Nachbarzellen, also den *kringelchen*-positiven Zellen vorliegt. In der Tat sind die *Hyjagged*- und *kringelchen*-Signale sehr ähnlich und lassen vermuten, dass beide Gene in denselben Zellen exprimiert werden. Doppel-*in situ*-Hybridisierungen könnten zur Klärung der genauen Lokalisation beitragen.

Während die zelluläre Lokalisation der *Hyjagged*-Expression den Erwartungen entspricht, ist die zeitliche Abfolge der *kringelchen*-, *Hyjagged*- und *HyHes*-Expressionen unerwartet. Die *kringelchen*-Expression beginnt bereits im Stadium 5 und hält bis zur Ablösung der Knospe vom Muttertier an, das Notch-Zielgen *HyHes* wird ausschließlich in Stadium 8 exprimiert. Obwohl der DSL-Ligand *HyJagged* zur Notch-Aktivierung und anschlie-

ßender *HyHes*-Expression benötigt wird, setzt dessen Expression scheinbar erst in Stadium 9 ein.

Immunfluoreszenzen mit dem anti-JAG-IC-Antikörper konnten bereits zeigen, dass das HyJagged-Protein in allen Zellen am gesamten Tier vorhanden ist. Es muss demnach zur fortwährenden Expression von *Hyjagged* kommen. Diese kann allerdings nicht durch *in situ*-Hybridisierungen detektiert werden. Erst bei vermehrter Expression, wie dies scheinbar ab Knospentadium 9 der Fall ist, ist *Hyjagged* nachweisbar. Ein ähnliches Detektionsproblem konnte auch bei *Cnash* gezeigt werden, das bei *in situ*-Hybridisierungen an ganzen Tieren lediglich in stark exprimierenden Nematoblasten mit Vakuole detektiert wurde (siehe Abschnitt 3.3.2).

Dennoch bleibt dadurch ungeklärt, weshalb diese vermehrte *Hyjagged*-Expression erst nach der eigentlichen Notch-Aktivierung, die durch *HyHes*-Expression sichtbar wird, einsetzt. Eine Erklärung liefert eventuell die zuvor erwähnte *cis*-Interaktion von DSL-Liganden mit Notch, die eine Feinabstimmung der Notch-Signaltransduktion erlaubt. Geringe Überschüsse einer der beiden Transmembranproteine führen zur Signalübertragung zwischen zwei Zellen.

So besteht die Möglichkeit, dass in Folge der FGF-Signaltransduktion in den Stadien 5-7 die *Hyjagged*-Expression angeschaltet wird, wobei es lediglich zu einer leichten, durch *in situ*-Hybridisierungen nicht detektierbaren Expression kommt. Ein solcher Zusammenhang von FGF-Signaltransduktion mit der Liganden-Transkription wurde bereits zuvor bei der Ausbildung von Abzweigungen der Tracheen in *Drosophila* beschrieben (Ikeya & Hayashi, 1999).

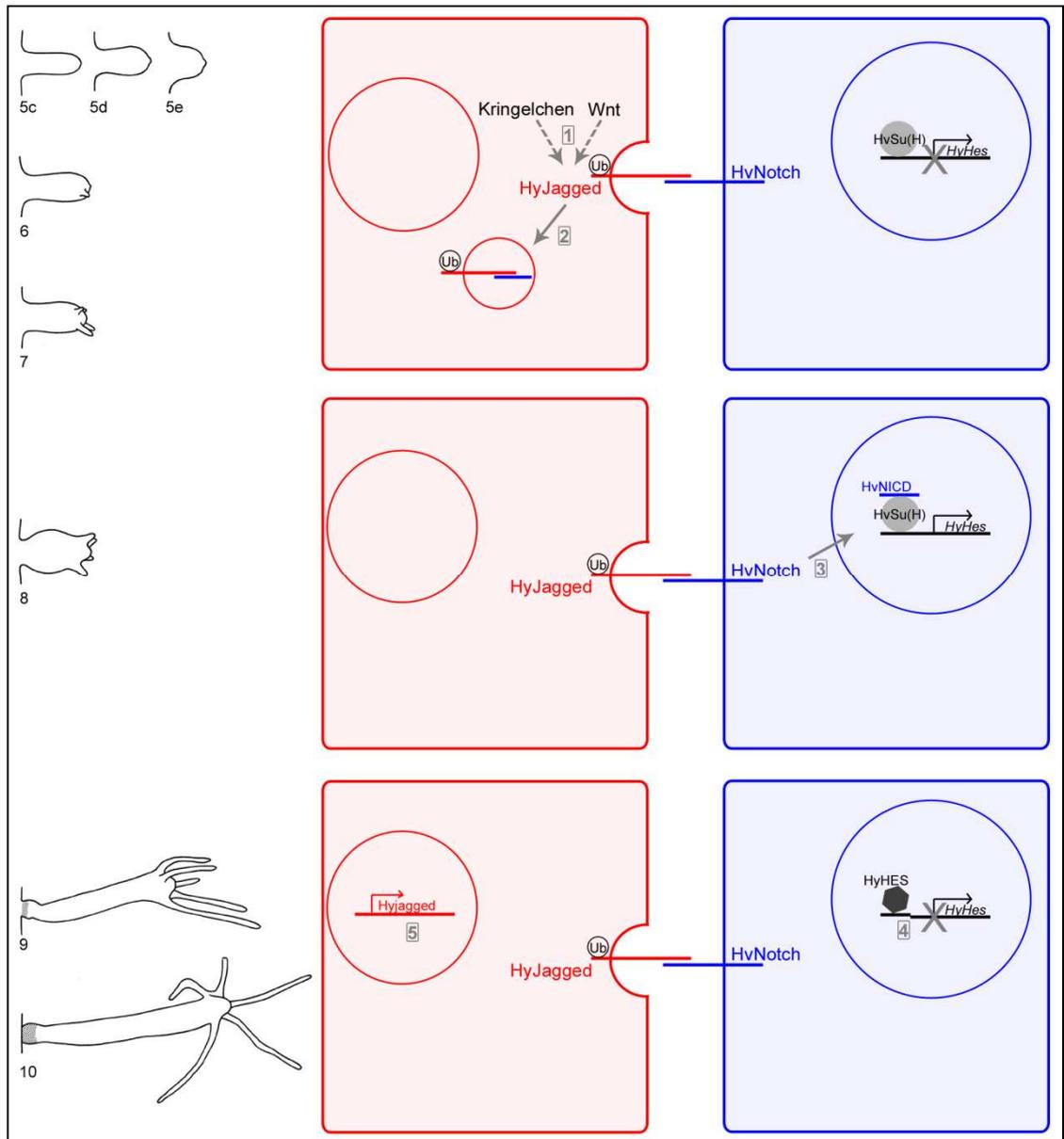
Möglich ist allerdings auch, dass in Folge der FGF-Signaltransduktion nicht die Expression des *Hyjagged*-Gens modifiziert wird, sondern es

vielmehr zur Aktivierung der Signaltransduktion durch das HyJagged-Protein kommt. So ist denkbar, dass die in der vorliegenden Arbeit identifizierte *Hydra* E3-Ubiquitinligase Mindbomb (siehe Abschnitt 2.2.2 und 3.2) exprimiert wird, so dass die aktivierende, Epsin-abhängige Endozytose des HyJagged nach Bindung des HvNotch ablaufen kann. In der Literatur sind keine Hinweise für einen Zusammenhang von FGF-Signaltransduktion mit der *Mindbomb*- oder *Neuralized*-Expression zu finden. Allerdings gibt es Beweise für eine positive Regulation der *Neuralized*-Expression durch den Frizzled/PCP-Signalweg bei der Augenentwicklung in *Drosophila* (del Alamo & Mlodzik, 2006). Dieser nicht kanonische Wnt-Signalweg spielt auch bei der Knospung in *Hydra* eine wichtige Rolle (Philipp *et al.*, 2009), wobei beteiligte Gene unter anderem bereits früh an der Knospbasis exprimiert werden. Hier kann also ein eventueller Zusammenhang zwischen der Aktivierung des DSL-Liganden HyJagged durch *Hydra* Mindbomb und der nicht kanonischen Wnt-Signaltransduktion gesehen werden.

Weiterhin ist eine Regulation durch die  $\beta$ -1,3-N-Acetylglucosaminyltransferase Fringe möglich (siehe Abschnitt 2.2.1 und 3.2). *Hydra* Fringe könnte Glykosylreste an zuvor fukosylierte EGF-Wiederholungen des HvNotch anhängen, so dass es zur Modifikation der Bindung des HvNotch an HyJagged kommt und so die Aktivierung der Notch-Signaltransduktion lokal verändert wird.

Mit Hilfe dieser Kenntnisse kann ein Modell zur Bildung einer Grenze zwischen Muttertier und Knospe erstellt werden (siehe Abb. 3-1). Sowohl durch eine leichte Expression des *Hyjagged*-Gens durch FGF-Signaltransduktion als auch durch die Mindbomb-abhängige Monoubiquitinylierung der intrazellulären Domäne von HyJagged kommt es zu einem leichten Überschuss an HyJagged an der Membran (1). Aktives HyJagged wird anschließend endozytiert (2) und führt in Folge dessen

zur Notch-Signaltransduktion, die wiederum zur Expression des *HyHes*-Gens in benachbarten Zellen führt (3). „*Feedback*“-Mechanismen führen dazu, dass die *Hyjagged*-Expression in der sendenden Zelle sowie die *Hvnotch*-Expression in der empfangenden Zelle gefördert werden (5). *HyHes* kodiert für ein basisches *Helix-loop-Helix*-Protein, das inhibitorische Wirkungen hat. Es agiert auch als Repressor der eigenen Expression, so dass eine vermehrte, fortwährende *HyHes*-Expression trotz verstärkter Präsenz von Notch-Ligand und -Rezeptor nicht geschieht (4).



**Abb. 3-1:** Modell der lateralen Signaltransduktion an der Knospensbasis. (1) HyJagged wird an der intrazellulären Domäne durch Mindbomb monoubiquitinyliert. (2) Es erfolgt anschließend Epsin-abhängige Endozytose und Aktivierung der Notch-Signaltransduktion. (3) Aktiviertes HvNICD gelangt in den Zellkern und führt zur Transkription des *HyHes*. (4) HyHES-Protein reprimiert die weitere Expression des *HyHes*-Gens. (5) Positive „*feedback*“-Mechanismen fördern die Expression des *Hyjagged*-Gens. Die linke Spalte zeigt die entsprechenden Knospensstadien an (nach Otto & Campbell, 1977).

Durch dieses Modell kann damit der späte Auftritt der sichtbaren *Hyjagged*-Expression erklärt werden. Natürlich basiert dieses Modell auf Spekulationen bezüglich der ursprünglichen Aktivierung von HyJagged. Durch die Analyse des *Hyjagged*-Promotors, sowie der *Mindbomb*- und *Fringe*-Expression können diese Unklarheiten in der Zukunft eventuell aus dem Weg geräumt werden.

### 3.2 Modulatoren der Notch-Signaltransduktion in *Hydra*

Da sowohl der Notch-Rezeptor (Käsbauer *et al.*, 2007) als auch der Notch-Ligand in *Hydra* in alle Zellen am gesamten Tier exprimiert werden, erfordert eine effiziente Notch-Signaltransduktion weitere post-translationale Modifikationen. Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit nach Modulatoren in *Hydra* gesucht.

Es konnte ein Kandidat für die  $\beta$ -1,3-Glykosyltransferase Fringe in *Hydra* identifiziert werden. Dieser weist neben der hydrophoben N-terminalen Sequenz auch eine spezifische Fringe-Domäne mit dem konservierten DxD-Motif im katalytischen Zentrum auf (siehe Abb. 2-22). Da es sich dabei lediglich um eine Genvorhersage handelt, muss das *Hydra* Fringe für weitere Analysen zunächst noch aus cDNA isoliert werden. Die Existenz einer solchen Vorhersage lässt allerdings die Vermutung zu, dass auch der Notch-Rezeptor in *Hydra* an seinen EGF-Wiederholungen modifiziert werden und so eine Regulation der Signaltransduktion stattfinden kann.

Im Gegensatz zu Fringe konnte das *Mindbomb*-Gen in *Hydra* bereits kloniert werden und somit seine tatsächliche Existenz nachgewiesen werden. Das resultierende HyMib1-Protein zeigt mit den HERC2/MIB-, ZZ Zinkfinger-, MIB-, Ankyrin- und Ringfinger-Domänen alle erforderlichen Strukturen (siehe Abb. 2-24). Der Stammbaum verdeutlicht zudem die Einord-

nung des HyMib1 in die Gruppe der Mindbomb1-Proteine sowie die evolutionär frühe Entstehung dieses Proteins (siehe Abb. 2-25).

Die E3-Ubiquitinligase Mindbomb wird für die Ubiquitylierung von Notch-Liganden und die anschließende Epsin-abhängige Endozytose benötigt (Wendland, 2002). Diese Endozytose ist wiederum erforderlich für die Liganden abhängige Aktivierung von Notch (Chitnis, 2006). Es scheint also möglich, dass es auch in *Hydra* eine Form der aktivierenden Endozytose mit Hilfe von Mindbomb geben könnte. Auch die überwiegende Lokalisation von HyJagged in endozytotischen Vesikeln unterschiedlicher Größen sprechen dafür (siehe Abb. 2-11). Die Aktivität von HyMib1 muss allerdings noch bestätigt werden.

Ein Homolog zu Neuralized konnte in *Hydra* nicht identifiziert werden. Da Mindbomb und Neuralized trotz ihres unterschiedlichen Aufbaus allerdings die gleiche Funktion ausführen (Le Borgne *et al.*, 2005) und *Hydra* ein Homolog zu Mindbomb besitzt, könnte Mindbomb möglicherweise die Funktion von Neuralized kompensieren.

### **3.3 Auswirkungen des Notch-Signalwegs auf die Nematocytyendifferenzierung**

Käsbauer *et al.* (2007) konnten bereits zeigen, dass sich die Notch-Signaltransduktion in *Hydra* auf die frühe Nematocytyendifferenzierung auswirkt.

Die Expressionen der Transkriptionsfaktoren *Hyzic* und *Cnash* wurden durch Lindgens *et al.* (2004) und Grens *et al.* (1994) während unterschiedlicher Zeitpunkte der Nematocytyendifferenzierung nachgewiesen. Da homologe Proteine der Zic- bzw. Achaete-Scute-Familien außerdem in

Zusammenhang mit frühen Differenzierungsprozessen innerhalb undifferenzierter Gewebe sowie mit Notch-Signaltransduktion im Allgemeinen gebracht wurden (Ebert *et al.*, 2001; Kooh *et al.*, 1993; Kunisch *et al.*, 1994; Schweisguth & Posakony, 1994), waren diese beiden Transkriptionsfaktoren von besonderem Interesse für die vorliegende Arbeit.

Zusätzlich dazu wurden POU-Domänen-Transkriptionsfaktoren in *Hydra* betrachtet. Diese Proteine sind ebenfalls während terminaler Differenzierungsereignisse von großer Bedeutung (Ryan & Rosenfeld, 1997). Außerdem spielen auch diese Transkriptionsfaktoren durch Interaktionen mit anderen Proteinen wie Mash1 eine wichtige Rolle bei der Regulation der Notch-Signaltransduktion (Castro *et al.*, 2006).

Die vorliegende Arbeit befasste sich deshalb mit den Gen- und Proteinexpressionen von *HyZic*, *Cnash* und *Pou* im Hinblick auf die Notch-Signaltransduktion und Nematocytyendifferenzierung in *Hydra*.

### 3.3.1 HyZic

Das *HyZic*-Gen kodiert für einen konservierten Zinkfinger-Transkriptionsfaktor, der in interstitiellen Zellen und Nematoblasten exprimiert wird (Lindgens *et al.*, 2004). Mit Hilfe eines neuen Antikörpers gegen HyZic, dem anti-ZIC7A12-Antikörper, konnte diese Lokalisation bestätigt werden. Außerdem wurde durch Co-Immunfluoreszenzexperimente mit dem anti-Spinalin-Antikörper gezeigt, dass HyZic auch noch in Nematoblasten mit sehr kleiner Vakuole vorhanden ist. Diese Immunfluoreszenzen verdeutlichen zudem, dass die Proteinmengen in den unterschiedlichen Zelltypen differieren. Während in interstitiellen Zellen eine starke anti-ZIC7A12-Färbung erscheint, nimmt diese Intensität in

Nematoblasten ab, bis sie in solchen mit sehr kleiner Vakuole kaum mehr vorhanden ist (siehe Abb. 2-31).

Käsbauer *et al.* zeigten 2007, dass interstitielle Zellen und Nematoblasten ohne Vakuole bzw. mit sehr kleiner Vakuole auch nach Inhibierung des Notch-Signalwegs durch DAPT unbeeinflusst sind. Diesen Kenntnissen entsprechend ist es nicht verwunderlich, dass sowohl das HyZic-Protein bei Immunfluoreszenzen (siehe Abb. 2-31) als auch die Expression des *HyZic*-Gens bei *in situ*-Hybridisierungen (siehe Abb. 2-27) auch nach DAPT-Behandlung noch unverändert detektiert werden konnte. Die Expression von HyZic sowohl auf Gen- als auch auf Proteinebene ist demnach unabhängig von der Notch-Signaltransduktion.

Unerwartet war die Lokalisation des endogenen HyZic-Transkriptionsfaktors im Zytoplasma. Dies wurde sowohl durch Immunfluoreszenzexperimente an ganzen Tieren (siehe Abb. 2-30) als auch durch Nachweis endogenen HyZics in der Zytoplasmafraktion mittels Western Blot gezeigt (siehe Abb. 2-28).

Zic-Transkriptionsfaktoren binden Sequenz-spezifisch DNA, wobei die Zinkfinger-Domänen für diese Interaktionen verantwortlich sind. Diese Proteine sind demnach normalerweise im Kern lokalisiert. Das Protein I-mfa (*Inhibitor of MyoD family*), das zunächst als Inhibitor von bHLH-Transkriptionsfaktoren identifiziert wurde, kann auch an manche Zic-Transkriptionsfaktoren binden. Durch die Interaktion von I-mfa mit Zic-Proteinen wird die Fähigkeit zur Transkriptionsaktivierung der gebundenen Zic-Proteine reprimiert. Es wird sogar der Kerntransport blockiert, wobei dies nicht durch Maskierung der Kernlokalisierungssignale herbeigeführt wird, sondern durch Zurückhalten der Zic-Proteine im Zytoplasma. Vermutlich bietet das überwiegend zytoplasmatisch lokalisierte I-mfa einen starken Zytoplasmaanker, so dass Zic-Proteine bereits bei Anwesenheit gerin-

ger Mengen des Inhibitors vom Zellkern fern gehalten werden (Mizugishi *et al.*, 2004).

Das *Hydra* Zic-Homolog, HyZic, besitzt auch ein Kernlokalisierungssignal, so dass es im Zellkern erwartet wird. Die Tatsache, dass endogenes HyZic mit Hilfe des anti-ZIC7A12-Antikörpers allerdings nur im Zytoplasma nachgewiesen wurde, kann demnach ebenfalls durch die Anwesenheit eines Inhibitors mit starkem Zytoplasmaanker erklärt werden. Um welchen Interaktionsfaktor es sich dabei tatsächlich handeln könnte, ist allerdings völlig unklar. Bei Überexpression des Zinkfinger-Transkriptionsfaktors erscheint es allerdings im Zellkern der transformierten Zelle. Dies müsste dann auf einen Überschuss von ektopischem HyZic gegenüber dem potentiellen Inhibitor zurückgeführt werden.

### 3.3.2 CnASH

Ebenfalls während der Nematocytyendifferenzierung wird der bHLH-Transkriptionsfaktor CnASH exprimiert. Bei *in situ*-Hybridisierungen am ganzen Tier wird *Cnash* in Nervenzellen im Tentakel sowie in Nematoblasten mit Vakuole nachgewiesen (Hayakawa *et al.*, 2004; Lindgens *et al.*, 2004). An Mazeraten kann die Expression dieses Gens zusätzlich in interstitiellen Zellen und Nematoblasten ohne Vakuole detektiert werden, nicht aber in Nervenzellen (Grens *et al.*, 1995).

Um diese widersprüchlichen Ergebnisse aufzuklären, sollte die Expression des CnASH nun auf Proteinebene betrachtet werden. Dazu wurde ein Antikörper gegen ein CnASH-spezifisches Peptid in Kaninchen produziert. Dieser konnte bereits durch Western Blot eine Bande in der Zytoplasmafraktion erkennen, die allerdings nicht den erwarteten 20kD, sondern mit ca. 40kD der doppelten Größe entsprach (siehe Abb. 2-34).

Ein zweiter Antikörper gegen CnASH aus Ratte, der anti-CNA7B10-Antikörper, konnte diese Bande ebenfalls nachweisen (siehe Abb. 2-35), so dass davon ausgegangen werden kann, dass es sich dabei tatsächlich um endogenes CnASH handelt. Eventuell bildet CnASH demnach ein kovalentes Dimer, das durch Aufkochen in SDS-Ladepuffer nicht in die Monomere aufgetrennt wird und deshalb im Western Blot als Bande mit 40kD erscheint. Es ist außerdem denkbar, dass CnASH post-translational modifiziert wird, beispielsweise durch Phosphorylierung oder Glykosylierung, so dass ein größeres Molekulargewicht zustande kommt.

Auch in Fraktionen DAPT-behandelter Hydren konnte eine solche Bande in gleichbleibender Intensität detektiert werden (siehe Abb. 2-34 und Abb. 2-35). Die Expression des CnASH-Proteins ist demnach auch bei Inhibierung der Notch-Signaltransduktion unverändert. Diese Ergebnisse stehen allerdings im Widerspruch zu denen, die durch *in situ*-Hybridisierungen an ganzen Tieren erzielt wurden. Dabei wurde die *Cnash*-Expression nach DAPT-Behandlung nicht mehr nachgewiesen (siehe Abb. 2-33). Diese Befunde sollten deshalb durch Immunfluoreszenzfärbungen mit dem anti-CnASH-Peptidantikörper aufgeklärt werden.

Mit Hilfe dieses Antikörpers konnte endogenes CnASH in interstitiellen Zellen, Nematoblasten mit und ohne Vakuole, Nematocyten und Nervenzellen detektiert werden. Am schwächsten gefärbt wurden dabei interstitielle Zellen, Nematoblasten erschienen etwas intensiver, die stärkste Färbung wiesen Nematocyten und Nervenzellen auf. Sowohl reife Nematocyten als auch Nervenzellen konnten dabei in allen Körperregionen gezeigt werden (siehe Abb. 2-38).

Durch Doppelfärbungen mit dem anti-Nv1-Antikörper, der sensorische Nervenzellen in Tentakeln und Ganglionzellen im Stiel färbt, erweist sich die CnASH-Expression als differenziert in Nervenzellen (siehe Abb. 2-40).

Co-Immunfluoreszenzfärbungen mit dem anti-Nowa-Antikörper konnte außerdem zeigen, dass es sich bei den durch den anti-CnASH-Antikörper gefärbten Nematocyten um sowohl Stenothelen, als auch um Desmomen und Isorhizen handelt (siehe Abb. 2-42). Auch Nematoblasten mit und ohne Vakuole und interstitielle Zellen exprimieren endogenes CnASH (siehe Abb. 2-38). Durch Doppelfärbungen mit dem anti-ZIC7A12-Antikörper konnte gezeigt werden, dass alle HyZic-positiven interstitiellen Zellen auch CnASH exprimieren (siehe Abb. 2-43). Da CnASH allerdings auch in Nervenzellen detektiert wurde, werden auch CnASH-positive und HyZic-negative interstitielle Zellen erwartet, aus denen diese Nervenzellen hervorgehen. Solche Zellen konnten hier nicht entdeckt werden, wobei dies möglicherweise auf die schwache Intensität der CnASH-Färbung in interstitiellen Zellen zurückzuführen ist.

Grens *et al.* konnten 1995 durch *in situ*-Hybridisierungen an Mazeraten die Anteile der *Cnash*-exprimierenden Zellen quantifizieren. So waren 10-15% der einzelnen, 25-30% der doppelten interstitiellen Zellen sowie 85-95% der Nematoblasten *Cnash*-positiv. Die hier vorgestellten Ergebnisse zeigen zudem Proteinexpression, zusätzlich zu den genannten Zelltypen, in reifen Nematocyten. Man kann also davon ausgehen, dass das CnASH-Protein relativ stabil und auch nach beendeter Genexpression noch vorhanden ist.

Die genannten Zahlen *Cnash*-positiver Zellen sind konform mit den hier erzielten Ergebnissen am CnASH-Protein. Nachdem alle Nematocytentypen CnASH aufweisen, kann man davon ausgehen, dass auch alle Nematoblasten-Nester diesen Transkriptionsfaktor exprimieren. Dies entspricht den 85-95% gefärbten Nematoblasten in Mazerat-*in situ*-Hybridisierungen.

Ausgehend von nahezu 100% *Cnash*-positiven Nematoblasten und einem hohen Prozentsatz an CnASH-positiven Nervenzellen müsste auch in allen interstitiellen Zellen, die zur Nematocyten- sowie zur Nervenzelldifferenzierung bestimmt sind, *Cnash* nachweisbar sein. Nachdem etwa 30% der interstitiellen Zellen zu Nematocyten und etwa 10% zu Nervenzellen differenzieren (Tardent, 1987), stimmen auch diese Zahlen mit den Mazerat-*in situ*-Hybridisierungen mit 35-45% *Cnash*-positiver einzelner und doppelter interstitieller Zellen überein.

Die hier gezeigten Ergebnisse am CnASH-Protein verdeutlichen, dass *in situ*-Hybridisierungen an ganzen Tieren lediglich einen Bruchteil der tatsächlichen Genexpression aufzeigen. Vielmehr wird *Cnash* in interstitiellen Zellen exprimiert, die den Differenzierungsweg zu einem neuronalen Zelltyp, also zu Nervenzellen und Nematocyten, einschlagen. Diese Genexpression wird in Nematoblasten fortgeführt, die erst mit Aushärtung der Nematocyte endet. In reifen Nematocyten wird nur noch das stabile CnASH-Protein detektiert. Entsprechend wird in differenzierten Nervenzellen ebenfalls nur noch das CnASH-Protein nachgewiesen.

Wie auch HyZic wurde endogenes CnASH mit Hilfe des anti-CnASH-Antikörpers sowohl bei Immunfluoreszenzexperimenten als auch im Western Blot im Zytoplasma detektiert. Da es sich bei CnASH um einen basischen *Helix-loop-Helix*-Transkriptionsfaktor mit Kernlokalisierungssignal handelt, entspricht dies nicht der erwarteten Lokalisation.

Bereits 1996 wurde durch Chen *et al.* der *Inhibitor of MyoD family*, I-mfa, entdeckt. Dieser Inhibitor, der auch in Zusammenhang mit Zic-Transkriptionsfaktoren gebracht werden konnte (siehe 3.3.1), assoziiert außerdem mit Mitgliedern der myogenen bHLH-Superfamilie. Eine Interaktion mit dem Maus Achaete-Scute Homolog 2, Mash2, wurde ebenfalls bereits gezeigt (Kraut *et al.*, 1998). I-mfa maskiert dabei die Kernlokalisati-

onssignale der bHLH-Proteine, so dass ein Import in den Zellkern und nachfolgende Transkriptionsaktivierung nicht mehr möglich ist (Chen *et al.*, 1996).

Ein solcher Mechanismus ist auch bei dem Achaete-Scute Homolog in *Hydra*, CnASH, denkbar. Durch Maskierung des Kernlokalisations signals durch einen unbekannt Inhibitor könnte dieses Protein im Zytoplasma zurückgehalten und von der Aktivität der Transkriptionsaktivierung abgehalten werden.

Bei Überexpression wird CnASH dagegen im Zellkern der transformierten Zelle detektiert. Dies ist vermutlich auf einen Überschuss des ektopischen CnASH gegenüber dem potentiellen Inhibitor zurückzuführen.

Käsbauer *et al.* zeigten 2007, dass der Anteil der Nervenzellen an der Gesamtpopulation auch nach Inhibierung des Notch-Signalwegs unverändert ist. Immunfluoreszenzen mit dem anti-CnASH-Antikörper an DAPT-behandelten Hydren konnten dieses Ergebnis derart bestätigen, dass CnASH-positive Nervenzellen weiterhin in allen Körperregionen vorhanden sind (siehe Abb. 2-41). Differenzierende Nematoblasten mit deutlicher Vakuole verschwinden dagegen in Folge von DAPT-Behandlung (Käsbauer *et al.*, 2007). So konnten solche Zellen auch durch Immunfluoreszenzen mit dem anti-CnASH-Antikörper an DAPT-behandelten Hydren nicht entdeckt werden. Dagegen war die CnASH-Expression in interstitielle Zellen, Nematoblasten ohne Vakuole, Nematocyten und Nervenzellen unverändert (siehe Abb. 2-44). Western Blot Analysen mit dem anti-CnASH-Antikörper zeigten entsprechende Ergebnisse an Fraktionen DAPT-behandelter und Kontrolltiere (siehe Abb. 2-34 und Abb. 2-35). Zudem konnte das CnASH-Protein stets im Zytoplasma detektiert werden. Die

Notch-Signaltransduktion in *Hydra* hat also keinen Einfluss auf die CnASH-Expression und -Lokalisation.

### 3.4 HyPOU4

Bei der Suche nach Homologen von POU-Domänen-Proteinen in *Hydra* kamen zwei Kandidaten zum Vorschein, die den Klassen IV bzw. VI zugeordnet werden konnten. Die genauere Untersuchung des HyPOU4 im Vergleich zu anderen POU-Domänen-Proteinen zeigte die konservierten POU<sub>S</sub>- und POU<sub>HD</sub>-Domänen. Auch die Linkerregion entspricht bezüglich der Länge der anderer Klasse IV POU-Proteine (siehe Abb. 2-47).

*In situ*-Hybridisierungsexperimente an ganzen Hydren zeigten die *HyPou4*-Expression in Nematoblasten-Nestern unterschiedlicher Größen (siehe Abb. 2-48). Bei Inhibierung des Notch-Signalwegs durch DAPT konnte diese Expression allerdings nicht mehr detektiert werden (siehe Abb. 2-49). Dies legt die Vermutung nahe, dass es sich bei den gefärbten Nestern um post-mitotische Nematoblasten handelt, die nach DAPT-Behandlung verschwinden (Käsbauer *et al.*, 2007).

Um dieses Ergebnis zu bestätigen, wurden Doppel-*in situ*-Hybridisierungen mit *HyZic*, das in Nematoblasten ohne Vakuole exprimiert wird, durchgeführt (siehe Abb. 2-50). Dabei konnte gezeigt werden, dass es sich bei den *HyPou4*-positiven Nestern tatsächlich nicht um die *HyZic*-positiven Zellen handelt. *HyPou4* wird demnach vermutlich in Nematoblasten mit Vakuole exprimiert, deren Entstehung durch DAPT inhibiert wird. Zur Bestätigung dieser Aussage müssen einerseits weitere Doppel-*in situ*-Hybridisierungsexperimente mit *Cnash*- und *HyPou4*-spezifischen Sonden durchgeführt werden. Andererseits sollte die HyPOU4-Expression auf Proteinebene mit Hilfe eines HyPOU4-

spezifischen Antikörpers betrachtet werden. Dadurch könnte außerdem die komplette Expression erfasst und auch im Zusammenhang mit der Notch-Signaltransduktion analysiert werden. Schließlich könnten durch „*Yeast-two-Hybrid*“- oder „*pull-down*“-Experimente mögliche Interaktionspartner von HyPOU4 identifiziert und damit auf eine eventuelle Funktion dieses Transkriptionsfaktors während der Nematocytyendifferenzierung geschlossen werden.

Während die Aussagen bezüglich der Rolle des HyPOU4 während der Nematocytyendifferenzierung noch weitere Arbeit erfordern, zeigen die Ergebnisse bezüglich HyZic und CnASH, dass die Notch-Signaltransduktion keine Auswirkung auf die Expression und Lokalisation dieser Transkriptionsfaktoren hat. Vielmehr scheint mindestens ein weiterer Faktor während der Nematocytyendifferenzierung durch diesen Signalweg beeinflusst zu sein, so dass bei Inhibierung durch DAPT die Entstehung von Nematoblasten mit Vakuole gestört wird. Die Herausforderung kommender Versuche wird es sein, diesen Faktor zu identifizieren und dessen Rolle während der Nematocytyendifferenzierung zu charakterisieren.



## 4 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Rolle des Notch-Signalwegs in Bezug auf die Knospung sowie auf die Nematocytyendifferenzierung in *Hydra* untersucht.

Wichtige Voraussetzung dafür war die Identifikation des kanonischen Notch-Liganden, HyJagged. Dieses Transmembranprotein konnte an Membranen sowie vor allem in Endosomen aller Zelltypen im gesamten Tier detektiert werden. Da auch der Notch-Rezeptor in *Hydra* am gesamten Tier exprimiert wird (Käsbauer *et al.*, 2007) erfordert effiziente Notch-Signaltransduktion post-translationale Modifikationen. So konnten die E3-Ubiquitinligase Mindbomb und die  $\beta$ -1,3-N-Acetylglucosaminyltransferase Fringe in *Hydra* identifiziert werden, die beide eine solche Modulation der Signaltransduktion erlauben könnten. Die Notwendigkeit einer solchen Veränderung wurde bei der Analyse der *Hyjagged*-Expression während der Knospung sichtbar. Obwohl die Notch-Signaltransduktion eindeutig für die Einschnürung der Knospe erforderlich ist, und die Aktivierung dieses Signalwegs auch durch *HyHes*-Expression nachgewiesen werden kann (Münder *et al.*, 2010), kommt es zu diesem Zeitpunkt zu keiner erhöhten *Hyjagged*-Expression. So muss davon ausgegangen werden, dass die Initiation der Signaltransduktion durch Modulation von Rezeptor oder Ligand an dieser Stelle geschieht.

Neben der Knospung wird die Notch-Signaltransduktion in *Hydra* für die frühe Nematocytyendifferenzierung benötigt. Die vorliegende Arbeit konnte dabei nachweisen, dass weder die Gen- und Proteinexpressionen noch die Lokalisationen der beiden Transkriptionsfaktoren HyZic und CnASH durch den Notch-Signalweg beeinflusst werden. Es konnte allerdings gezeigt werden, dass *in situ*-Hybridisierungen an ganzen Tieren nur einen Bruchteil der tatsächlichen Genexpression detektieren. Dies wurde durch

Vergleich der nachgewiesenen Expression von *Cnash* an Mazeraten und ganzen Tieren sowie der Proteinexpression durch Immunfluoreszenzen erzielt. Schließlich wurde verdeutlicht, dass die Notch-Signaltransduktion scheinbar auch keinen Einfluss auf die Expression des *HyPou4* hat, das im Rahmen dieser Arbeit neu identifiziert und in Zusammenhang mit der Nematocytyendifferenzierung gebracht wurde.

## 5 Materialien und Methoden

### 5.1 Materialien

#### 5.1.1 Chemikalien

Acetanhydrid	Sigma
Acrylamid : Bisacrylamid (29:1)	BioRad
AG 501-X8 20-50m	Biorad
Agarose (PeqGold Universalagarose)	Peqlab
Ampicillin	Serva
Aprotinin	Sigma
APS	Sigma
<i>Artemia nauplii</i>	Sanders Brine Shrimp Company
Bacto Agar	BD
Bacto™ Pepton	Difco
BCIP	Roche
Blockreagenz	Roche
Bromphenolblau	Fluka
BSA	Roth
Calciumchlorid	Roth
CHAPS	Sigma
DAPI	Sigma
DAPT	Calbiochem
DEPC	Roth
DIG RNA Labeling Mix	Roche
DMEM	Biochrom

DMSO	Sigma
dNTP	Peqlab
DTT	Sigma
EDTA	Merck
EGTA	Sigma
Essigsäure p.a.	Roth
Ethanol p.a.	Roth
Ethidiumbromid	Sigma
Fast Red TR/Naphthol AS-MX Tablets	Sigma
FKS	Gibco
Ficoll Typ 400	Sigma
Fluorescein RNA Labeling Mix	Roche
FM4-64	Molecular Probes
Formaldehyd	Fluka
Formamid	Fluka
Gelatine	Sigma
Glucose	Merck
Glycerin	Roth
Glycin	Roth
Guanidinium-HCl	Sigma
Hefeextrakt	Oxoid
Heparin Sodium	Serva
Imidazol	Roth
IPTG	Roth
Isopropanol p.a.	Roth

Kaliumacetat	Roth
Kaliumchlorid	Fluka
di-Kaliumhydrogenphosphat-Trihydrat	Roth
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck
Kanamycin	Roth
Leupeptin	Sigma
Magermilchpulver	Roth
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	Merck
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	Fluka
Maleinsäure	Sigma
Manganchlorid	Sigma
2-Mercaptoethanol	Sigma
Methanol p.a.	Roth
MOPS	Roth
Natriumacetat	Roth
Natriumchlorid	Roth
tri-Natriumcitrat-Dihydrat	Roth
di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Merck
Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat	Roth
Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat	Merck
Natronlauge	Merck
NBT	Roche
Nickel Sepharose High Performance	Amersham Biosciences
Paraformaldehyd	Serva
Pefabloc SC	Roche

PEI pH 7,0	A.Gahl, München
Penicillin	Biochrom
Pepstatin A	Sigma
Polyvinylpyrrolidon	Sigma
Ponceau S	Sigma
RNase Inhibitor	Fermentas
Roti-Nanoquant-Lösung	Roth
Rubidiumchlorid	Sigma
Saccharose	Roth
Salzsäure	Merck
SDS	Roth
Spermidin	Fluka
Streptomycin	Biochrom
Tetracyclin	Sigma
TEMED	Merck
TO-PRO 3	Molecular Probes
Torula yeast RNA	Boehringer & Söhne GmbH
Triethanolamin	Sigma
Tris	Roth
Triton X-100	Roth
Trypton	Oxoid
Tween 20	Roth
Urethan	Fluka
Vectashield	Vector Laboratories

### 5.1.2 Bakterienstämme

XL1-Blue MRF'	$\Delta(mcrA)183 \Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)173$ endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac [F'proAB lacI <sup>q</sup> Z $\Delta$ M15 Tn10 (Tet <sup>r</sup> )]
BL21 (DE3)	F- ompT hsdSB(rB-mB-) gal dcm (DE3)

### 5.1.3 Enzyme

Restriktionsenzyme mit Reaktionspuffer	New England Biolabs
DNase I (Rnase-frei)	Roche
DNase I	Sigma
Shrimp Alkaline Phosphatase mit Reaktionspuffer	NEB
Proteinase K	Sigma
RNase A	Qiagen
Taq DNA-Polymerase mit Reaktionspuffer	Peqlab
Phusion™ Flash High-Fidelity PCR Master Mix	NEB
T4-Ligase mit Reaktionspuffer	NEB
SP6-RNA-Polymerase	Ambion
T3-RNA-Polymerase	Ambion
T7-RNA-Polymerase	Ambion

### 5.1.4 Plasmide

pCR-BluntII-TOPO	Invitrogen
pRSETA	Invitrogen
pEGFP-N1	Clontech

hoT G

AG Böttger (Böttger *et al.*, 2002)

hoT Red

Margherita Lasi, München

### 5.1.5 Primer

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Primer zur Klonierung von spezifischen Genen in gewünschte Zielvektoren können der nachfolgenden Tabelle 2 entnommen werden.

**Tabelle 2:** Verwendete Primer zur Klonierung in spezifische Vektoren

Gen	Zielvektor	Primer-Name	Sequenz
AS-C3	hoT G	AS-C3-Nhe_for	CTAGCTAGCA TGGTGGTTAT GACTCCAAAT ATGAC
		AS-C3-Sma_rev	TCCCCCGGGA AATTTACTCA CCATAGCTTC AGTG
<i>Cnash</i>	pRSET A	CnASH-Xho_for	CCGCTCGAGA TGCAACTTTT GTTTCCAAGG
		CnASH-EcoRI_rev	GGAATTCCTT ACTTCCTGCA TTTTGTGTT
<i>Cnash</i>	hoT G	CnASH-Nhe_for	CTAGCTAGCA TGCAACTTTT GTTTCCAAGG C
		CnASH-Sma_rev	TCCCCCGGGA GACATCGGAG TTTCGATTTT G
<i>HyDsl</i>	pBS SK+	Delta6-Eco_for	CGGAATTCG ATGATTTTTA TAGTTATTTT ATACC
		Delta6-Xba_rev	GCTCTAGAGC TTAGCTTCTC AATTTATTC TTTT

**Tabelle 2-Fortsetzung:** Verwendete Primer zur Klonierung in spezifische Vektoren

<b>Gen</b>	<b>Zielvektor</b>	<b>Primer-Name</b>	<b>Sequenz</b>
<i>Hyjagged</i>	hoT G	HyJagged-Sma_for	TCCCCCGGGA TGGCAAAAAT TGTATACCTT TGTTG
		HyJagged-Sma_rev	TCCCCCGGGC AGTAGTTCAG ATTTTCTAGA TATAG
<i>Hyjagged-5RACE</i>	pCR-BluntII-TOPO	HyJagged-5RACE_rev	CCCATTGTGTT GTGAGGCGTA AAGCTGATGT AAGTGC
		GeneRacer5'nested	GGACACTGAC ATGGACTGAA GGAGTA
<i>Hyjagged-3RACE</i>	pCR-BluntII-TOPO	HyJagged-3RACE_for	GGAGTTGCAA AATGTACAGA TGCATGGTGT GG
		GeneRacer3'	GCTGTCAACG ATACGCTACG TAACG
<i>Hyjagged</i>	pCR-BluntII-TOPO	HyJagged_for	ATGGCAAAA TGTATACCT TTGTTGGG
		HyJagged_rev	TTACAGTAGT TCAGATTTTC TAGATATAG
<i>Hyjagged</i>	pEGFP-N1	HyJagged-eGFP_for	CGGAATTCAT GGCAAAAATT GTATACCTTT GTTG
		HyJagged-eGFP_rev	TCCCCCGGGC AGTAGTTCAG ATTTTCTAGA TATAG
<i>Hyjagged-ICD</i>	pRSET A	HyJagged-ICD_for	CGGGATCCTA TAAGAAAATG ACAGTGAAAA AAG
		HyJagged-ICD_rev	CGGAATTCTT ACAGTAGTTC AGATTTTCTA G

**Tabelle 2-Fortsetzung:** Verwendete Primer zur Klonierung in spezifische Vektoren

Gen	Zielvektor	Primer-Name	Sequenz
<i>HyLiAS</i>	hoT G	HyLiAS-Nhe_for	CTAGCTAGCA TGACAAGCAC ATACACATAT ACC
		HyLiAS-Sma_rev	TCCCCCGGGA TTTTCTACGT CAATGTCATT TGTTTC
<i>HyMib1</i>	pCR-BluntII-TOPO	HyMib1-Xho_for	CCGCTCGAGA TGGCCACTGC ACATAACATA TCAATAG
		HyMib1-Eco_rev	CCGGAATTCT TAGCAAAATA GCAAAATTTT CTTCTCG
<i>HvNotch</i>	hoT Red	Notch-HotRed_for	CTAGCTAGCA TGGGTCAACC AAGATTTTAT ATAG
		Notch-HotRed_rev	TCCCCCGGGA GGAGAGGAAA AAGATGTCG
<i>HyPou4</i>	pBS KS+	HyPou4-Xho_for	CCGCTCGAGA TGTTTTCTC ATGTTAAAGG ATAC
		HyPou4-Eco_rev	CGGAATTCTT AATGAACAGA AAACTTCATT C
<i>HyZic</i>	hoT G	HyZic-Nhe_for	CTAGCTAGCA TGAGTGATAC CTACGACTAT AG
		HyZic-Sma_rev	TCCCCCGGGT ACAGATATTC TTACACTGTC CATTC
<i>HyZic</i>	pRSET A	HyZic_5_Bam	CGGGATCCAT GAGTGATACC TACGACTATA G
		HyZic_3_Eco	CGGAATTCCT ATACAGATAT TCTTACACTG TCC

Zusätzlich verwendete Primer können der nachfolgenden Tabelle entnommen werden.

**Tabelle 3:** Verwendete sonstige Primer

Primer-Name	Sequenz
T3_long	CAATTAACCC TCACTAAAGG GAACAAAAGC
T7_long	GTAATACGAC TCACTATAGG GCGAATTGGA GC

### 5.1.6 Peptidsequenzen

Zur Herstellung des anti-JAG-IC- bzw. anti-CnASH-Peptidantikörpers wurden synthetische Peptide (unterstrichene Sequenzen) zur Immunisierung von Kaninchen verwendet.

HyJagged-ICD:

MAKIVYLCWV VVALSQFQNT KSIGNIEIHI EYFKFQKDYL NCADTCLQYA SVCLSNINHN  
 TNCDIGYIEQ EYKQYNFNLS FINFTLPLVV PVKDLYMISF EVNQQTSNNN SALLKKYSTY  
 ISFTPHNKWV AVRQQFIGFY IRTTCDLPES ANATFWCDHP GHYYGYNANN VKLCNKGWEG  
 RNCDKNNTIC IPRDNYRCRN NQKICNPGWT GINCEVSTYK KLCKPRDDHT GHYGCSYEGN  
 KVCNVGWEGE NCLKNIDDCL SNPCLNNGSC IDLHANFECV CPGEYGGKQC EIDFRNEPCK  
 NKGIMLPDNT CKCRFGYKGN KCEICIPYHL CVDHGTCKNH DTCNGLCIPG GWVGQFCEIE  
 QDGCShNRGK KFCSSKGICV NDQKVSMSGQ AWKCLCYEGW VGKHCEIKIH ICNKRSPCQN  
 GGTCLKSGKH FNDDQIYNCR CPLGFSGKNC EIEINVCEKL SPCQNGGTCL NIGKHFNDNL  
 IYECQCPIGF SGKNCDIDMH VCNKQSPCQN GGTCLKSGKH FNDQVYDCRC PLGFSGKNCE  
 ITSIOYKQCM YREMWYIHND TWDDACNVCR CDDGVAKCTD VWCGLPNCYQ IEDPNCKCKF  
 VEGHCITPPC LPWGMCFNQT IPVLYMGCFT EFNTELAENC AKVIFFFNVR MLPKGILLEE  
 LCQQFHIIYKR VQSLFISNEV SLQCSHVRFN SSLDQLIINI YSKKKAIQLS LEIAKYKHTL  
 VEQFENFKWH APPTLVLFRR SVAYTTIEKP STMHSFLKEE GYFFPLVGCN VCVLVLFVVC  
 LYLWLYKKMT VKKVYLSDTT TIEHNKLKE NTLLVNKDNL KKGIFKTISR KSELL

CnASH:

MQLLFPRPLL NEHMVINNQL FTKYEQINGY TSTVICHPWS SENGGGKFRR RRSSHVVAN  
 MDPAAVARRN ERERNRVKQV NDGFDELRQR VPFLPKKKL SKVEILRCAA LYIRDLKDIL  
 EEYDCNNSK NKRSSSECNS SRDSNSGDED DILRTEMLNL STDQLLVKIE TPMS

### 5.1.7 Antikörper

Der folgenden Tabelle können die verwendeten Primärantikörper, deren Verdünnungen und Hersteller entnommen werden.

**Tabelle 4:** Quellen, Verdünnungen und Hersteller verwendeter Primärantikörper

Primärantikörper	Quelle	Verdünnung	Hersteller
Anti-CNA7B10	Ratte	Unverdünnt	E.Kremmer, Helmholtz Zentrum München
Anti-CnASH	Kaninchen	1:1000 (WB) 1:500 (IF)	Davids Biotechnologie GmbH
Anti-DIG-AP	Maus	1:2000	Roche
Anti-FITC-AP	Maus	1:1000	Roche
Anti-Nowa (= anti-H22)	Maus	unverdünnt	
Anti-JAG-IC	Kaninchen	1:500 (WB) 1:50 (IF)	Davids Biotechnologie GmbH
Anti-Nv1	Maus	1:2	
Anti-Spinalin	Kaninchen	1:500	
Anti-Xpress	Maus	1:2000	Invitrogen
Anti-ZIC7A12	Ratte	Unverdünnt	E.Kremmer, Helmholtz Zentrum München

In Tabelle 5 werden die verwendeten Sekundärantikörper, deren Verdünnungen und Herkunft gezeigt.

**Tabelle 5:** Quellen, Verdünnungen und Hersteller verwendeter Sekundärantikörper

<b>Sekundärantikörper</b>	<b>Quelle</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Hersteller</b>
Anti-Kaninchen-Alexa488	Ziege	1:200	Invitrogen
Anti-Kaninchen-Cy3	Ziege	1:500	GE Healthcare
Anti-Kaninchen-IRDye800	Ziege	1:10.000	Licor
Anti-Ratte-F(ab) <sub>2</sub> -FITC	Ziege	1:100	Dianova
Anti-Ratte-Cy3	Esel	1:300	Dianova
Anti-Ratte-IRDye800	Ziege	1:10.000	Licor
Anti-Maus-F(ab) <sub>2</sub> -Alexa488	Ziege	1:200	Invitrogen
Anti-Maus-Cy3	Schaf	1:500	Dianova
Anti-Maus-IRDye800	Ziege	1:10.000	Licor

### 5.1.8 Längen- und Größenstandards

Gene Ruler DNA ladder mix	MBI-Fermentas
PeqGOLD Protein-Marker IV (Prestained)	Peqlab

### 5.1.9 Kits

peqGOLD Gel Extraction Kit	Peqlab
Quick Prep Micro mRNA Purification Kit	GE Healthcare
First-Strand cDNA Synthesis Kit	GE Healthcare
RNeasy Mini Kit	Qiagen
NucleoBond PC500	Macherey-Nagel
GeneRacer Kit with SuperScript III RT and	
Zero Blunt TOPO PCR Cloning kit for Sequencing	Invitrogen

### 5.1.10 Sonstige Materialien

Biodyne B Transfer Membrane	Pall
Faltenfilter	Sartorius Stedim Biotech
Goldkugeln 1,0µm	Biorad
Hybond ECL Nitrocellulose Membran	Amersham Biosciences
<i>Macrocarrier</i>	BioRad
<i>Rupture disks</i>	BioRad
Whatmanpapier	Schleicher & Schuell

### 5.1.11 Geräte

Bandelin Sonopuls SD9	Bandelin
Branson Digital Sonifier Model 450-D	G.Heinemann Ultraschall- und Labortechnik
Cyclone Gradient	Peqlab
Gene Pulser	BioRad
Leica MZ16FA	Leica Microsystems
Leica TCS SP Confocal laser-scanning Mikroskop	Leica Microsytems
Nikon Eclipse 80i	Nikon GmbH
Odyssey Infrared Imager	Licor
PDS-1000/He Particle Delivery System	BioRad
UV/Vis Spectrophotometer DU730	Beckmann Coulter
Robocycler Gradient	Stratagene
UV-Stratalinker 1800	Stratagene
UV-Tisch	MWG Biotech

## 5.1.12 Software

Adobe Photoshop 10.0

ClustalX 2.0.9

*Hydra*-Genom <http://hydrazome.metazome.net/cgi-bin/gbrowse/hydra/>

ImageJ 1.37k

Leica Application Suite 3.4.1

Leica Confocal Imaging Software Version 2.5

Lucia Image G5 executable

Odyssey V3.0

NCBI <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

SignalP 3.0 <http://www.cbs.dtu.dk/services/SigmaP/>

SMART <http://smart.embl-heidelberg.de/>

TMHMM 2.0 <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM>

## 5.1.13 Puffer und Lösungen

### ***Agarosegelelektrophorese***

DNA-Auftragspuffer	30% (v/v)	Glycerin
	0,25mg/ml	Bromphenolblau
	0,25mg/ml	Xylenblau
Ethidiumbromidfärbelösung	3,3mg/ml	Ethidiumbromid
	0,7x	MOPS-Lösung
1x MOPS-Lösung	44mM	MOPS
	8,4mM	Natriumacetat
	1mM	EDTA

pH 7,0 einstellen, autoklavieren

1x TAE-Puffer            40mM     Tris

                                 1mM        EDTA

pH 8,3 einstellen mit Essigsäure

**Bakterienmedien**

10% Glycerin            10% (v/v)    Glycerin in H<sub>2</sub>O

sterilfiltrieren

LB-Agar                    20g/l        Bacto Agar in LB-Medium

autoklavieren

LB-Medium                1% (w/v)    Bacto™ Pepton

                                 0,5% (w/v)   Hefeextrakt

                                 1% (w/v)     NaCl

pH 7,0 einstellen

autoklavieren

LB-Ampicillin-Medium    100µg/ml    Ampicillin in LB-Medium

LB-Kanamycin-Medium    25µg/ml     Kanamycin in LB-Medium

LB-Tetracyclin-Medium    5µg/ml      Tetracyclin in LB-Medium

SOC-Medium              2% (w/v)    Trypton

                                 0,5% (w/v)   Hefeextrakt

                                 8,6mM       NaCl

                                 2,5mM       KCl

pH 7,0 einstellen

autoklavieren

	10mM	MgCl <sub>2</sub> x 6H <sub>2</sub> O
	20mM	Glucose (sterilfiltriert)
Ψb-Medium	600mM	MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O
	0,5% (w/v)	Hefeextrakt
	2% (w/v)	Bacto-Pepton
	pH 5,6 mit KOH einstellen	
	autoklavieren	
Tfbl-Lösung	30mM	KAc
	100mM	RbCl
	10mM	CaCl <sub>2</sub>
	15% (v/v)	Glycerin
	50mM	MnCl <sub>2</sub>
	pH 5,8 einstellen	
	sterilfiltrieren	
TfblI-Lösung	10mM	MOPS
	75mM	CaCl <sub>2</sub>
	10mM	RbCl
	15% (v/v)	Glycerin
	pH 6,5 einstellen, sterilfiltrieren	

### ***Bakterielle Expression von Proteinen***

100x Cocktail C10	1mg/ml	Pepstatin A
	1mg/ml	Aprotinin
	1mg/ml	Leupeptin

DBB/I	2,4mM	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	
	0,5M	NaCl	
	17,6mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	
	6M	Guanidin-HCl	
	25mM	Imidazol	
	pH 7,4 einstellen		
DEB-Elutionspuffer	2,4mM	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	
	0,5M	NaCl	
	17,6mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	
	6M	Guanidinium-HCl	
	500mM	Imidazol	
	pH 7,4 einstellen		
DNase I-Lösung	5mg/ml	DNase I in H <sub>2</sub> O	
MgCl <sub>2</sub> -Lösung	1M	MgCl <sub>2</sub> in H <sub>2</sub> O	
100x Pefabloc	50mg/ml	Pefabloc SC in H <sub>2</sub> O	
<i>Osmotic shock</i> -Puffer	20mM	Tris	
	2,5mM	EDTA	
	pH 8,0 einstellen		
	10mM	DTT	
	1x	Cocktail C10	
	1x	Pefabloc SC	
RNase A-Lösung	100mg/ml	RNase A in H <sub>2</sub> O	



	in PBS	
DAPI/TO-PRO-Färbelösung	1µg/ml	DAPI
	1µg/ml	TO-PRO 3
	in PBS	
PBS	120mM	NaCl
	40mM	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 3 H <sub>2</sub> O
	12mM	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O
	pH 7,2 – 7,4 einstellen	
Permeabilisierungslösung	0,5% (v/v)	Triton X-100 in PBS
2% PFA / 70% Ethanol	2% (w/v)	Paraformaldehyd
	70% (v/v)	Ethanol in PBS
4% PFA / Hydramedium	4% (w/v)	Paraformaldehyd in Hydramedium
2% Urethan	2% (w/v)	Urethan in Hydramedium

### ***in situ-Hybridisierung***

anti-DIG-Antikörperlösung	1:2000	anti-DIG-AP in Blocklösung
anti-FITC-Antikörperlösung	1:1000	anti-FITC-AP in Blocklösung
0,25% Acetanhydrid	0,25% (v/v)	Acetanhydrid in 0,1M Triethanolamin
0,5% Acetanhydrid	0,5% (v/v)	Acetanhydrid in 0,1M Triethanolamin
10x Blockreagenz	100mg/ml	Blockreagenz in MAB
	bei –20°C aufbewahren	
Blocklösung	1x	Blockreagenz in MAB-BSA
0,1% CHAPS/2x SSC	0,1% (w/v)	CHAPS in 2x SSC
50x Denhardt's	28mM	Polyvinylpyrrolidon

	25mM	Ficoll Typ 400
	1% (w/v)	BSA
	in DEPC-H <sub>2</sub> O	
	bei -20°C aufbewahren	
DEPC Behandlung	0,2% (v/v)	DEPC in gesuchter Lösung
	gut schütteln, über Nacht stehen lassen, autoklavieren	
DEPC-behandelte Schottflaschen	Schottflaschen mit DEPC behandeln	
	gut schütteln, über Nacht stehen lassen, autoklavieren	
DEPC-H <sub>2</sub> O	0,2% (v/v)	DEPC
	gut schütteln, über Nacht stehen lassen, autoklavieren	
DEPC-Hydramedium	0,2% (v/v)	DEPC in Hydramedium
	gut schütteln, über Nacht stehen lassen, autoklavieren	
Formamid, deionisiert	2,5g/ml	AG 501-X8 20-50m in Formamid
	1 h auf Falcondreher inkubieren	
	durch Faltenfilter filtrieren	
	bei -20°C aufbewahren	
Glycin-Arbeitslösung	1x	Glycin-Stocklösung in PBT
10x Glycin-Stocklösung	40mg/ml	Glycin in DEPC-H <sub>2</sub> O
	bei 4°C aufbewahren	
Glycin-HCl	100mM	Glycin
	0,1%	Tween 20
	pH 2,2 einstellen mit HCl	
100% Hybridisierungslösung (HybMix)		
	50% (v/v)	deionisiertes Formamid
	5x	SSC

	0,1% (v/v)	Tween 20
	0,1% (v/v)	CHAPS
	1x	Denhardt's
	100µg/ml	Heparin Sodium
	200µg/ml	tRNA
	in DEPC-H <sub>2</sub> O	
50% HybMix/PBT	50% (v/v)	HybMix in PBT
75% HybMix /2x SSC	75% (v/v)	HybMix in 2x SSC
50% HybMix /2x SSC	50% (v/v)	HybMix in 2x SSC
25% HybMix /2x SSC	25% (v/v)	HybMix in 2x SSC
MAB	100mM	Maleinsäure
	150mM	NaCl
	pH 7,5 einstellen	
	DEPC-Behandlung	
MABB	2% (w/v)	BSA in MAB
MAB-BSA	1% (w/v)	BSA in MAB
75% MeOH/PBT	75% (v/v)	Methanol in PBT
50% MeOH /PBT	50% (v/v)	Methanol in PBT
25% MeOH /PBT	25% (v/v)	Methanol in PBT
1M MgCl <sub>2</sub>	1M	MgCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O in H <sub>2</sub> O
	DEPC-Behandlung	
5M NaCl	5M	NaCl in H <sub>2</sub> O
	DEPC-Behandlung	
5M NaOH	5M	NaOH in DEPC-H <sub>2</sub> O
NBT-BCIP-Färbelösung	0,018% (v/v)	NBT

	0,032% (v/v) BCIP
	in NTMT
NTMT	0,1M NaCl
	0,1M Tris
	50mM MgCl <sub>2</sub>
	0,1% (v/v) Tween 20
	in DEPC-H <sub>2</sub> O
	pH 9,5 einstellen
4% PFA/ Hydramedium	4% (w/v) Paraformaldehyd in DEPC-Hydramedium
	bei -20°C aufbewahren
PBS (Hochsalz)	0,15M NaCl
	80mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O
	21mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O
	in H <sub>2</sub> O
	pH 7,3 einstellen
	DEPC-Behandlung
PBS-Glycerin	66,7% (v/v) Glycerin
	0,3x PBS
PBT	0,1% (v/v) Tween 20 in PBS (Hochsalz)
Proteinase K-Arbeitslösung	1x Proteinase K-Lösung in PBT
1000x Proteinase K-Lösung	10mg/ml Proteinase K in DEPC-H <sub>2</sub> O
	bei -80°C aufbewahren
20x SSC	3M NaCl
	0,3M Natriumcitrat x 2 H <sub>2</sub> O
	pH 7,0 einstellen, DEPC-Behandlung

1x TE-Puffer	10mM	Tris, pH 7,5
	1mM	EDTA, pH 8,0
		autoklavieren
tRNA	0,5% (w/v)	Torula yeast RNA
	1,13mM	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	0,13mM	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 3H <sub>2</sub> O
		in DEPC-H <sub>2</sub> O
		1 h bei 60°C lösen
		OD <sub>260</sub> messen gegen DEPC-H <sub>2</sub> O
0,1M Triethanolamin	0,1M	Triethanolamin in DEPC-H <sub>2</sub> O
		pH 8,0 mit NaOH-DEPC einstellen
2% Urethan	2% (w/v)	Urethan in DEPC-Hydramedium

### ***Konfokale Mikroskopie am lebenden Tier***

2% Urethan	2% (w/v)	Urethan in Hydramedium
500µM FM4-64-Lösung	500µM	FM4-64 in Hydramedium
50µM FM4-64-Lösung	50µM	FM4-64 in Hydramedium

### ***Minipräparation***

Lösung I	50mM	Glucose
	25mM	Tris
	10mM	EDTA, pH 8,0
		autoklavieren
		Lagerung bei 4°C

Lösung II	0,2N	NaOH
	1% (w/v)	SDS
Lösung III	3M	KAc
	11,5% (v/v)	Essigsäure
	Lagerung bei 4°C	
RNase A-Lösung	20µg/ml	RNase A in H <sub>2</sub> O

### **SDS-Gelelektrophorese**

2x Ladepuffer	85mM	1,5M Tris-Puffer pH 6,8
	18% (v/v)	Glycerin
	3,6% (w/v)	SDS
	9% (v/v)	2-Mercaptoethanol
	0,1% (w/v)	Bromphenolblau
4 x Ladepuffer	170mM	1,5M Tris-Puffer pH 6,8
	36% (v/v)	Glycerin
	7,2% (w/v)	SDS
	18% (v/v)	2-Mercaptoethanol
	0,2% (w/v)	Bromphenolblau
1x Laufpuffer	25mM	Tris
	190mM	Glycin
	0,1% (w/v)	SDS
	pH 8,3 einstellen	
Sammelgel	4,8% (v/v)	Acrylamid : Bisacrylamid (29:1)
	123mM	1,5M Tris-Puffer pH 6,8

	0,1% (w/v)	SDS
	0,1% (w/v)	APS
	0,001% (v/v)	TEMED
12% Trenngel	12%	Acrylamid : Bisacrylamid (29:1)
	375mM	1,5M Tris-Puffer pH 8,8
	0,1% (w/v)	SDS
	2,5% (v/v)	Glycerin
	0,036% (w/v)	APS
	0,0015% (v/v)	TEMED
1,5M Tris-Puffer pH 6,8	1,5M	Tris
	0,4% (w/v)	SDS
		pH 6,8 einstellen
1,5 M Tris-Puffer pH 8,8	1,5M	Tris
	0,4% (w/v)	SDS
		pH 8,8 einstellen

### ***Subzelluläre Fraktionierung***

100x Cocktail C10	1mg/ml	Pepstatin A
	1mg/ml	Aprotinin
	1mg/ml	Leupeptin
Mitopuffer	500mM	Saccharose
	10mM	Tris
	2mM	EGTA
		pH 7,4 einstellen

	1x	Cocktail C10
	1x	Pefablock
100x Pefabloc	50mg/ml	Pefabloc SC in H <sub>2</sub> O

### **Western Blot**

1x Blotpuffer	25mM	Tris
	190mM	Glycin
	20% (v/v)	Methanol
5% Milch-Lösung	5% (w/v)	Magermilchpulver in 1x TBST
Ponceau-Färbelösung	0,1% (w/v)	Ponceau S
	5% (v/v)	Essigsäure
1x TBS	25mM	Tris
	140mM	NaCl
	2,7mM	KCl
	pH 7,4 einstellen	
1x TBST	20mM	Tris
	140m M	NaCl
	0,1% (v/v)	Tween 20
	pH 7,6 einstellen	

### **Zellkultur**

DMEM/10% FKS/5% Pen/Strep	10% (v/v)	FKS
	5% (w/v)	Penicillin
	5% (w/v)	Streptomycin

	in DMEM	
PBS (Zellkultur)	139mM	NaCl
	2,7mM	KCl
	10,1mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O
	1,8mM	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	pH 7,4 einstellen	
	autoklavieren	
Blocklösung	10% (v/v)	FKS
	0,2% (v/v)	Tween 20
	in PBS (Zellkultur)	
DAPI/TO-PRO3-Färbelösung	1µg/ml	DAPI
	1µg/ml	TO-PRO3
	in PBS (Zellkultur)	
Permeabilisierungslösung	1% (v/v)	Triton X-100 in PBS (Zellkultur)
4% PFA / PBS	4% (w/v)	Paraformaldehyd in PBS (Zellkultur)
Waschlösung	1% (w/v)	BSA
	0,2%	Tween 20
	in PBS (Zellkultur)	

## 5.2 Molekularbiologische Methoden

### 5.2.1 Agarosegelelektrophorese

Es wurde ein 1%iges Agarosegel hergestellt. Dazu wurde die Agarose in 1x TAE-Puffer gegeben und unter Aufkochen vollständig gelöst. 100ml der gelöste Agarose wurde mit 1µl Ethidiumbromidfärbelösung versetzt. Das erstarrte Gel wurde mit Probe beladen, die zuvor mit DNA-Auftragspuffer versetzt wurde. Zudem wurde *Gene Ruler DNA ladder mix*

als DNA-Standard geladen. Das Gel wurde bei 80V ca. eine Stunde laufen gelassen und anschließend unter UV-Licht bei 365nm betrachtet.

### **5.2.2 DNA-Konzentrationsbestimmung**

Die DNA-Konzentration wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 260nm bestimmt.

### **5.2.3 Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterienzellen durch Alkalische Lyse**

#### ***Minipräparation***

Eine Übernachtskultur von transformierten Bakterien wurde 1min bei 16.000g abzentrifugiert, der Überstand wurde verworfen. Das *Pellet* wurde dann in 100µl Lösung I resuspendiert. Es wurden 200µl Lösung II zugegeben und das Gefäß mehrmals vorsichtig invertiert. Anschließend wurden 150µl Lösung III hinzugefügt, erneut invertiert und 5min auf Eis inkubiert. Es wurde dann 5min bei 12.000g und 4°C zentrifugiert. Der klare Überstand wurde in ein neues Gefäß überführt und mit 1ml 70% Ethanol versetzt und bei 12.000g und 4°C 10min zentrifugiert. Zum *Pellet* wurde 1ml 100% Ethanol gegeben und erneut bei 12.000g und 4°C 10min zentrifugiert. Das gewaschene *Pellet* wurde dann getrocknet und in 50µl RNase A-Lösung resuspendiert.

#### ***Maxipräparation***

Es wurden 100ml einer Übernachtskultur transformierter Bakterien für eine Maxipräparation verwendet. Die Präparation erfolgte mit Hilfe des NucleoBond PC500 Kits von Macherey-Nagel, wobei das DNA-*Pellet* schließlich in 360µl H<sub>2</sub>O resuspendiert wurde.

## 5.2.4 PCR

### **Standard-PCR**

Ein Reaktionsansatz aus ca. 100ng/μl der zu amplifizierenden DNA, 10x Puffer, 200μM dNTPs, je 0,5pmol/μl der spezifischen Primer und 1U Taq-Polymerase wurde hergestellt.

Eine Standard-PCR erfolgte gemäß Abb. 5-1. Zunächst kam es zu einer 5-minütigen Denaturierung bei 95°C. Anschließend folgten 30 Zyklen mit 0,5min bei 95°C, 1min mit der Primer-spezifischen Annealing-Temperatur und Elongation bei 72°C für 1min pro 1kb der zu amplifizierenden DNA. Schließlich kam es zur finalen Elongation für 7min bei 72°C.

95°C	5min	30 Zyklen
95°C	0,5min	
Annealingtemp	1min	
72°C	1min / kb	
72°C	7min	

**Abb. 5-1:** Schema der Standard-PCR

### **Touchdown-PCR**

Es wurde ein Reaktionsansatz aus 100ng/μl der zu amplifizierenden DNA, 0,5pmol/μl der spezifischen Primer und *Phusion Flash High-Fidelity PCR Master Mix* hergestellt.

Zunächst wurde die DNA 5min bei 95°C denaturiert. Anschließend folgte eine Phase mit ca. 30 Zyklen mit 30sec Denaturierung, 1min bei spezifischer Annealing-Temperatur und 1min pro 1kb bei 72°C. Dabei wurden zunächst 2 Zyklen bei einer Annealing-Temperatur von 5-10°C über der Primer-spezifischen Schmelztemperatur durchgeführt, anschließend wurde diese Temperatur für weitere 2 Zyklen um 2°C erniedrigt. Dieses Schema wurde für insgesamt 10 Zyklen wiederholt. Die letzten 20 Zyklen erfolgten bei einer gleichbleibenden Annealing-Temperatur, die ca. 5°C unter der Primer-spezifischen Schmelztemperatur liegt. Zuletzt erfolgte eine finale Elongation 7min bei 72°C.

95°C		5min	
95°C	0,5min	2 Zyklen	
Schmelztemp. + 5°C	1min	2 Zyklen	
72°C	1min / kb	2 Zyklen	
95°C	0,5min	2 Zyklen	
Schmelztemp. + 3°C	1min	2 Zyklen	
72°C	1min / kb	2 Zyklen	
95°C	0,5min	2 Zyklen	
Schmelztemp. + 1°C	1min	2 Zyklen	
72°C	1min / kb	2 Zyklen	
95°C	0,5min	2 Zyklen	
Schmelztemp. - 1°C	1min	2 Zyklen	
72°C	1min / kb	2 Zyklen	
95°C	0,5min	2 Zyklen	
Schmelztemp. - 3°C	1min	2 Zyklen	
72°C	1min / kb	20 Zyklen	
72°C		7min	

Abb. 5-2: Schema der Touchdown-PCR

### 5.2.5 Restriktionsverdau

Es wurde ein Aliquot von 500ng – 1µg der zu verdauenden DNA für einen Restriktionsverdau eingesetzt. Dazu wurden 10x Restriktionspuffer und 1U spezifische Restriktionsenzyme pro 1µg eingesetzte DNA zugegeben. Der gesamte Ansatz wurde entsprechend der Aktivität des Enzyms 90min bis 20h bei 37°C ink ubiert.

### **5.2.6 Dephosphorylierung**

Plasmide, die bei einer Ligation eingesetzt werden sollten, wurden nach Restriktionsverdau dephosphoryliert. Dazu wurde die Lösung mit 10x Phosphatase-Puffer und 1U Shrimp Alkaline Phosphatase versetzt und 1h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion bei 65°C, 20min gestoppt.

### **5.2.7 Ligation**

Ein Ligationsansatz aus dephosphoryliertem Plasmid und gewünschtem Insert in einem Verhältnis von 1:5 bis 1:10, sowie 10x Ligase-Puffer und 120U T4-Ligase wurde angesetzt. Es erfolgte Inkubation bei 16°C über Nacht. Der Ansatz wurde schließlich 20min bei 65°C inkubiert.

### **5.2.8 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese**

Zunächst wurde ein 12% Trenngel gegossen, das nach ca. 20min Polymerisation mit einem Sammelgel überschichtet wurde, wobei dieses ca. 15min auspolymerisierte. Mit Ladepuffer versetzte Proben wurden 2min bei 98°C erhitzt und auf das SDS-Gel geladen, das in 1x Laufpuffer zunächst bei 80V lief bis die Proben im Trenngel ankamen, dann wurde die Spannung auf 180V erhöht bis die Lauffront den unteren Rand der Gelkammer erreichte. Als Größenstandard wurden 3µl des PeqGOLD Protein-Marker IV (Prestained) aufgetragen.

### **5.2.9 Western Blot**

Proteine wurden mittels Western Blot von einem SDS-Polyacrylamid-Gel auf eine *Hybond ECL* Nitrocellulose Membran übertragen. Dies erfolgte zwei Stunden bei 200mA in 1x Blotpuffer. Anschließend wurde der erfolgreiche Transfer durch 1-2min Färbung mit Pon-ceau-Färbelösung überprüft. Die Membran wurde dann 1h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C in 5% Milch-Lösung blockiert, bevor sie für 1h bei Raumtemperatur

mit Primärantikörper überschichtet wurde. Anschließend wurde ungebundener Antikörper durch dreimal 10min Waschen mit 1x TBST entfernt, bevor die Membran mit Sekundäran-tikörper überschichtet und 1h bei Raumtemperatur im Dunklen inkubiert wurde. Es wurde erneut dreimal 10min mit 1xTBST sowie kurz mit 1x TBS gewaschen und mit Hilfe des *Odyssey Infrared Imager* entwickelt.

### **5.2.10 Bestimmung der Proteinkonzentration**

Zunächst wurde eine BSA-Eichkurve erstellt. Dazu wurden je 200µl BSA-Lösungen mit 0µg, 5µg, 10µg, 15µg und 20µg BSA hergestellt und mit 800µl Roti-Nanoquant-Arbeitslösung gemischt. Die Emissionen bei 590nm und 450nm wurden jeweils mit Hilfe des *UV/Vis Spectrophotometers* gegen H<sub>2</sub>O bestimmt. Der Quotient der beiden Emissionen aufgetragen gegen die BSA-Menge diente also Eichkurve.

Von der zu bestimmenden Probe wurden ebenfalls 200µl mit 800µl Roti-Nanoquant-Arbeitslösung vermischt und die Emissionen bei 590nm und 450nm gegen H<sub>2</sub>O gemessen. Mit Hilfe des Quotienten der Emissionen und der zuvor erstellten Eichkurve konnte die Konzentration der vorliegenden Probe ermittelt werden.

## **5.3 Methoden für Bakterien**

### **5.3.1 Kultivierung von *E.coli***

*E.coli* wurden in flüssigem LB-Selektionsmedium bei 200rpm und 37°C oder auf LB-Agar mit Antibiotika bei 37°C inkubiert.

### **5.3.2 Herstellung elektrokompetenter Bakterien**

Zunächst wurden 10ml LB-Tetracyclin-Medium mit einem Glycerolstock des *E.coli*-Stammes XL1-Blue MRF' angeimpft und bei 37°C, 200rpm über Nacht geschüttelt. Mit dieser Übernachtskultur wurden dann 250ml LB-Medium angeimpft und erneut bei 37°C, 200rpm bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,6 inkubiert. Es folgte eine 15-minütige Inkubation auf

Eis, bevor die Zellen bei 4000rpm, 20min und 4°C ab zentrifugiert wurden. Das *Pellet* wurde in 50ml eiskaltem H<sub>2</sub>O resuspendiert, anschließend erneut 10min bei 4000rpm und 4°C abzentrifugiert. Das entstehende *Pellet* wurde weitere dreimal mit je 50ml eiskaltem H<sub>2</sub>O gewaschen und 10min bei 4000rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, das *Pellet* in der restlichen Flüssigkeit resuspendiert. Es folgte Zentrifugation für 20min bei 10.000rpm und 4°C. Das *Pellet* wurde in einem Volumen 10% Glycerin aufgenommen und in 50µl-Aliquots aufgeteilt. Diese wurden auf Trockeneis eingefroren und bei -80°C gelagert.

### 5.3.3 Herstellung chemisch-kompetenter Bakterien

Zunächste wurden 10ml  $\Psi$ b-Medium mit einem Glycerolstock des *E.coli*-Stammes BL21 (DE3) angeimpft und über Nacht bei 37°C ohne Schütteln inkubiert. Von dieser Übernachtskultur wurden 5ml verwendet, um 100ml  $\Psi$ b-Medium anzuimpfen, die dann bei 37°C bis zu einem OD<sub>550</sub>-Wert von 0,5 geschüttelt wurden. Anschließend wurden die Bakterien 5min auf Eis inkubiert, bevor sie bei 5000g und 4°C für 5min abzentrifugiert wurden. Das *Pellet* wurde in 40ml eiskalter TfbI-Lösung resuspendiert und weitere 5min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die Lösung erneut bei 5000g und 4°C für 5min zentrifugiert, das *Pellet* in 4ml TfbII-Lösung resuspendiert und 15min auf Eis inkubiert. Aliquots von 50µl wurden dann auf Trockeneis eingefroren und bei -80°C gelagert.

### 5.3.4 Transformation

#### *Elektrotransformation*

Zu 50µl elektrokompenten Bakterien wurden 10-100ng gewünschte Plasmid-DNA gegeben. Anschließend wurde bei 2,5kV, 25µF und 200Ω mit Hilfe des *GenePulser*-Geräts elektroporiert. Dann wurde 1ml SOC-Medium auf die Bakteriensuspension gegeben und eine Stunde bei 37°C und 200rpm inkubiert. Ein Aliquot der Lösung wurde schließlich auf LB-Agar mit Antibiotika ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

### ***Chemische Transformation***

Zu einem 50µl-Aliquot chemisch-kompetenter Bakterien wurden 100-500ng der gewünschten DNA gegeben und die Lösung 30min auf Eis inkubiert. Nach 120sec bei 42°C wurden die Zellen 5min auf Eis gekühlt, bevor sie mit 500µl LB-Medium versetzt wurden. Nach einer Inkubation von einer Stunde bei 37°C, 200rpm wurden die Bakterien auf LB-Selektionsmedium ausplattiert und bei 37°C über Nacht inkubiert.

### **5.3.5 Bakterielle Expression von Proteinen im kleinen Maßstab**

#### ***Induktion der Expression***

Eine Übernachtskultur chemisch transformierter Bakterien wurde verwendet, um 20ml LB-Ampicillin-Medium anzupflanzen. Diese Kultur wurde bei 37°C, 200rpm bis zu einer OD<sub>600</sub> von ca. 0,6 inkubiert, anschließend mit 1mM IPTG induziert und weiter bei 37°C und 200rpm inkubiert. Bereits vor der Induktion, sowie 1h, 2h und 4h danach wurden jeweils 2ml der Kultur entnommen und bei 12.000g, 4°C, 3min zentrifugiert.

#### ***Aufschluss der Bakterien***

Das Bakterienpellet wurde in 250µl *Osmotic shock*-Puffer aufgenommen und dreimal 3x 10sec auf Eis mit Hilfe des *Sonopuls SD9*-Geräts sonifiziert. Die aufgeschlossenen Bakterien wurden dann 10min bei 12.000g und 4°C zentrifugiert, das Sediment in 50µl H<sub>2</sub>O resuspendiert und mit 50µl 2x Ladepuffer versetzt, während zum Überstand 200µl 2x Ladepuffer gegeben wurden. Beide Proben wurden bei 98°C, 2min aufgekocht und bei SDS-Gelelektrophorese und Western Blot eingesetzt.

### 5.3.6 Bakterielle Expression von Proteinen im großen Maßstab

#### ***Induktion der Expression***

Zwei Liter LB-Ampicillin-Medium wurden mit einer Übernachtskultur chemisch transformierter Bakterien angeimpft und bei 37°C und 200rpm bis zu einer OD<sub>600</sub> von ca. 0,6 geschüttelt. Anschließend wurde die Expression des Wunschproteins durch 1mM IPTG induziert, wobei die Kultur weiterhin bei 37°C und 200rpm inkubiert wurde. Die ideale Expressionsdauer wurde zuvor mit Hilfe der Expression im kleinen Maßstab ermittelt, so dass die gesamte Kultur nach dieser Dauer abzentrifugiert und das *Pellet* in 40ml DBB/I resuspendiert wurde.

#### ***Aufschluss der Bakterien***

Es erfolgte Ultraschallaufschluss 5x 10sec mit jeweils 10sec Pause mit Hilfe des *Branson Digital Sonifiers*. Bevor die Suspension 30min bei 4°C auf einem Drehrad inkubiert wurde, wurden 1µl RNase A-Lösung, 20µl DNase I-Lösung sowie 100µl MgCl<sub>2</sub>-Lösung zugegeben. Anschließend wurde 30min bei 4°C und 3500rpm zentrifugiert, 50µl vom Überstand abgenommen und mit 50µl 2x Ladebuffer versetzt, der Rest wurde weiter aufgereinigt.

#### ***Aufreinigung des überexprimierten Proteins***

600µl Nickel Sepharose wurden 3,5min bei 500g zentrifugiert, das *Pellet* mit 3ml H<sub>2</sub>O versetzt und vorsichtig 5min auf einem Drehrad inkubiert. Anschließend wurde erneut 3,5min bei 500g zentrifugiert und das *Pellet* in 600µl DBB/I aufgenommen. Diese gewaschene Sepharose wurde dann zum zuvor gewonnenen, aufgeschlossenen Bakterienüberstand gegeben und 30min bei Raumtemperatur auf einem Drehrad inkubiert. Nach Zentrifugation für 3,5min bei 500g wurden 50µl des Überstands mit 50µl 2x Ladebuffer versetzt, das *Pellet* wurde in 3ml DBB/I resuspendiert, 3min auf einem Drehrad gemischt und erneut 3,5min bei 500g zentrifugiert. Dieses Waschen wurde zweimal wiederholt, wobei jeweils 50µl der gewonnenen Überstände entnommen und mit 50µl 2x Ladebuffer versetzt wurden. Schließlich wurden die gereinigten Proteine von der Nickel Sepharose

eluiert. Dazu wurden 2ml DEB-Elutionspuffer zum Sepharose-*Pellet* gegeben, 5min auf einem Drehrad inkubiert und 3,5min bei 500g zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde weitere viermal wiederholt, wobei die Überstände der einzelnen Elutionsschritte getrennt aufbewahrt und jeweils 50µl davon mit 50µl 2x Ladepuffer versetzt wurden. Die während der Aufreinigung entnommenen Proben wurden 2min bei 98°C aufgeköcht und durch SDS-Gelelektrophorese und Western Blot analysiert.

## **5.4 Methoden für *Hydra***

### **5.4.1 Kultivierung von *Hydra vulgaris***

*Hydra vulgaris* wurde bei 18°C in Hydramedium kultiviert. Die Tiere wurden täglich mit *Artemia nauplii* gefüttert und nach ca. 4h gewaschen.

### **5.4.2 DAPT-Behandlung**

Hydren wurden 48h mit 40µM DAPT/1% DMSO behandelt, wobei diese DAPT-Lösung alle 12h erneuert wurde. Als Kontrolle wurden Hydren 48h mit 1% DMSO behandelt und auch diese Lösung alle 12h erneuert.

### **5.4.3 Herstellung von cDNA aus *Hydra***

Zur Herstellung von cDNA wurde zunächst mRNA aus 200 Hydren mit Hilfe des *Quick Prep Micro mRNA Purification Kits* gewonnen. Dazu wurden die Hydren in 0,6ml *Extraction buffer* mit 20 Stößen zerspritzt, 1,2ml *Elution buffer* hinzugefügt, und weiter nach Kit-Anweisungen verfahren. Eluiert wurde die mRNA zweimal in je 0,2ml warmen *Elution buffer*. Davon wurden 150ng zur cDNA-Synthese mit Hilfe des *First-Strand cDNA Synthesis Kits* verwendet.

#### 5.4.4 Ermittlung unbekannter 5' und 3'Enden mit Hilfe von RACE

Zunächst wurde mit Hilfe des *Quick Prep Micro mRNA Purification Kits* mRNA aus 200 Hydren gewonnen (siehe 5.4.3). Die mRNA wurde nach Elution entsprechenden dem *Quick Prep Micro mRNA Purification Kit* gefällt und schließlich in 30µl DEPC-H<sub>2</sub>O aufgenommen. Davon wurden 250ng bei der Herstellung von cDNA mittels *GeneRacer Kit with SuperScript III RT* eingesetzt. Bei der reversen Transkription wurden dabei in zwei unterschiedlichen Ansätzen die enthaltenen *Random Primer* beziehungsweise Oligo(dT)-Primer verwendet. Die resultierenden cDNAs wurden zur Amplifikation der gesuchten Gene in einer Touchdown-PCR eingesetzt. Vom PCR-Produkt wurden anschließend 4µl bei der TOPO-Klonierung nach *Zero Blunt TOPO PCR Cloning kit for Sequencing* eingesetzt. Es wurden alle transformierten Bakterien auf LB-Kanamycin-Medium ausplattiert, alle Klone gepickt und mittels Restriktionsverdau, Standard-PCR und Sequenzierung überprüft.

In der vorliegenden Arbeit wurden die 5' und 3'Enden von *Hyjagged* mittels RACE ermittelt. Die Identifikation des 3'Endes erfolgte aus einer cDNA, die mit dem Oligo(dT)-Primer revers transkribiert wurde, die Identifikation des 5'Endes aus einer cDNA, die mittels *Random Primer* erstellt wurde. Die entsprechenden Touchdown-PCR-Bedingungen können der nachfolgenden Tabelle entnommen werden.

**Tabelle 6:** PCR-Bedingungen für *Hyjagged*-5'- und 3'RACE

	<b>Verwendete Primer</b>	<b>Annealing-Temperaturen</b>	<b>Elongationszeit</b>
5'RACE	GeneRacer5'Nested HyJagged-5'RACE_rev	73°C, 71°C, 69°C, 67°C, 65°C – je 2 Zyklen  63°C – 30 Zyklen	3min
3'RACE	GeneRacer3' HyJagged-3'RACE_for	70°C, 68°C, 66°C, 64°C, 62°C, 60°C – je 2 Zyklen  58°C – 20 Zyklen	1min

## 5.4.5 Biolistische Transformation

### ***Vorbereitung der Micorcarrier***

Zunächst wurde 1ml 70% Ethanol zu 30mg Goldkugeln gegeben und 3 bis 5min gevortext. Nach 15-minütigem Ruhen wurde die Suspension 5sec zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Sediment weitere drei Mal mit je 1ml H<sub>2</sub>O gewaschen. Dabei wurden die Goldkugeln im Wasser eine Minute gevortext, anschließend ruhte die Suspension 1min bevor sie kurz zentrifugiert und der Überstand jeweils verworfen wurde. Schließlich wurden die gewaschenen Goldkugeln in 500µl 50% Glycerin/Hydramedium resuspendiert.

### ***Fällung der DNA auf die Microcarrier***

Zu 40µl der zuvor vorbereiteten *Microcarrier* wurden 20µg der spezifischen Maxipräparation gegeben. Außerdem wurden 20µl Spermidin und 50µl 2,5M CaCl<sub>2</sub> hinzugefügt. Die Suspension wurde 10min gevortext, kurz zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Sediment wurde dann mit 70% Ethanol gewaschen, kurz zentrifugiert und der Überstand erneut verworfen. Anschließend wurde 100% Ethanol auf das *Pellet* gegeben, kurz zentrifugiert und das resultierende Sediment in 50µl 100% Ethanol aufgenommen. Es wurden schließlich je 25µl dieser Goldlösung auf einen *Macrocarrier* gegeben und getrocknet.

### ***Biolistische Transformation***

Die Transformation von je 100 ungefütterten Hydren erfolgte mit dem *PDS-1000/He Particle Delivery System*. Zunächst wurde die Heliumflasche aufgedreht und ein Druck von 850 – 900psi eingestellt, sowie die Vakuumpumpe und die Goldkanone eingeschaltet. Es erfolgte eine Probeschuss mit lediglich einer *rupture disk*.

Ein in Isopropanol getränktes *rupture disk* wurde in die *Disk Retaining Cap* und der *Macrocarrier* in die *Macrocarrier Launch Assembly* gelegt, wobei ein mittlerer Abstand zwischen den beiden eingestellt wurde. Auf das *Target Shelf* wurde dann eine Petrischale mit den in möglichst wenig Hydramedium gehaltenen Hydren gestellt. Schließlich wurde Vakuum angelegt und der Feuerknopf betätigt, bis die *rupture disk* brach. Dieser Vorgang

wurde 2-3 Mal mit denselben Hydren wiederholt. Die Tiere wurden dann bei 18°C im Dunklen gehalten, bis die Expression von grün fluoreszierendem Protein am Fluoreszenzbinokular beobachtet werden konnte.

### 5.4.6 Immunfluoreszenz an ganzen Tieren

Zunächst wurden Hydren entsprechend des später verwendeten Primärantikörpers auf spezifische Weise fixiert. Die verwendeten Fixative können der Tabelle 7 entnommen werden.

**Tabelle 7:** Verwendetes Fixativ für spezifische Primärantikörper

Primärantikörper	Fixativ
Anti-CnASH	4% PFA/Hydramedium
Anti-JAG-IC	2% PFA / 70% EtOH oder 4% PFA/Hydramedium
Anti-Nowa	4% PFA/Hydramedium
Anti-Nv1	4% PFA/Hydramedium
Anti-Spinalin	4% PFA/Hydramedium
Anti-ZIC7A12	4% PFA/Hydramedium

#### ***Standard-Fixierung mit 4% PFA/Hydramedium***

Hydren wurden zunächst 2min in 2% Urethan relaxiert, anschließend eine Stunde mit 4% PFA/Hydramedium bei Raumtemperatur fixiert.

#### ***Fixierung für Membranfärbung mit 2% PFA/70% Ethanol***

Hydren wurden zunächst 2min in 2% Urethan relaxiert, anschließend 30min in 2% PFA/70% EtOH bei Raumtemperatur fixiert. Es folgte zweimal 5-minütiges Waschen mit PBS und eine Ethanolreihe. Dabei wurden Hydren jeweils 5min mit 20%, 30%, 40%,

50% und 70% Ethanol in PBS, dann in 100% Ethanol inkubiert. Anschließend wurde die Ethanolreihe in umkehrter Reihenfolge durchgeführt.

Nach diesen spezifischen Fixierungsmethoden wurde in beiden Fällen 15min mit Permeabilisierungslösung permeabilisiert, bevor die Hydren 15min in Blocklösung inkubiert wurden. Die Tiere wurden dann mit 100µl Primärantikörper versetzt und eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert, bevor sie dreimal 10min mit PBS gewaschen wurden. Anschließend erfolgte Inkubation in 100µl Sekundärantikörper für eine Stunde bei Raumtemperatur und erneutes dreimaliges Waschen mit PBS. Schließlich wurden die Hydren 5min mit 100µl DAPI/TO-PRO3-Färbelösung gefärbt, kurz mit PBS gewaschen und in Vectashield eingebettet.

#### **5.4.7 *In situ*-Hybridisierung**

##### ***Sondenherstellung***

###### ***Sondenherstellung durch Verdau***

Zunächst wurden 50µg einer spezifischen Maxipräparation mittels eines Restriktionsverdau mit je zwei einfach schneidenden Enzymen verdaut. Die linearisierte DNA wurde auf ein 1% Agarosegel aufgetragen und mit Hilfe des *peqGold Gel Extraction Kits* in EB-Puffer eluiert. Bei der anschließenden *in vitro*-Transkription wurde 1µg dieser gereinigten, linearisierten DNA eingesetzt.

###### ***Sondenherstellung durch PCR***

Zunächst wurde eine Standard-PCR durchgeführt mit je einem Gen-spezifischen sowie einem Polymerase-spezifischen Primer. Das PCR-Produkt wurde dann auf ein 1% Agarosegel aufgetragen und mit Hilfe des *peqGold Gel Extraction Kits* in EB-Puffer eluiert. Anschließend wurde diese DNA mittels Standard-PCR reamplifiziert. Ein Aliquot dieser Reamplifikation wurde auf ein 1% Agarosegel aufgetragen, um die Abwesenheit unспеzi-

fischer Banden zu garantieren. Das PCR-Produkt wurde in einem solchen Fall direkt bei der *in vitro*-Transkription eingesetzt.

### ***In vitro*-Transkription**

Der Reaktionsansatz bestand aus 1µg der linearisierten DNA, 10x Transkriptionspuffer, DIG beziehungsweise Fluorescein RNA Labeling Mix, 20U RNase Inhibitor und 40U der entsprechenden RNA-Polymerase. Nach zweistündiger Inkubation bei 37°C wurden weitere 20U RNA-Polymerase hinzugefügt und erneut zwei Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 20U DNase I (RNase-frei) zugegeben und mindestens 30min bei 37°C inkubiert. Der gesamte Reaktionsansatz wurde dann über *RNeasy Spin Column* aufgereinigt und in 30µl RNase-freies Wasser eluiert. Schließlich wurden 20U RNase Inhibitor zur fertiggestellten Sonde gegeben.

Die Bedingungen zur Herstellung der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Sonden können der Tabelle 8 entnommen werden.

**Tabelle 8:** Bedingungen zur Herstellung der verwendeten Sonden

		<b>Durch Linearisierung</b>	<b>Durch PCR</b>	<b>Verwendete RNA-Polymerase</b>
<i>Cnash</i>	Anti-sense	KpnI / XhoI	-	T7
	Sense	BamHI / NotI	-	T3
<i>Hyjagged</i>	Anti-sense	XhoI / NotI	-	SP6
	Sense	BamHI / KpnI	-	T7
<i>HyPou4</i>	Anti-sense	-	Pou4-Xho_for T7_long	T7
	Sense	-	Pou4-Eco_rev T3_long	T3
<i>Hyzic</i>	Anti-sense	BamHI / NotI	-	T3
	Sense	KpnI / XhoI	-	T7

## **Dot Blot**

Zur Bestimmung der einzusetzenden RNA-Sondenmenge wurde ein Dot Blot durchgeführt. Dazu wurde je 1 µl mehrerer Verdünnungsstufen der zu bestimmenden Sonde sowie einer Kontrollsonde auf eine *Biodyne B Transfer Membrane* aufgetropft und getrocknet. Nach Vernetzung der RNA-Sonden mit der Membranoberfläche mit Hilfe des *UV-Stratalinker 1800* wurde diese zunächst 1min mit MAB gewaschen. Anschließend wurde 30min mit MABB geblockt, bevor der Dot Blot 30min in anti-DIG-beziehungsweise anti-FITC-Antikörper-Lösung inkubiert wurde. Schließlich wurde die Membran 1min mit NTMT gewaschen und 5min im Dunklen mit NBT-BCIP-Färbelösung gefärbt. Diese Reaktion wurde mit 1x TE-Puffer gestoppt. Die Bestimmung der zu verwendenden Sondenmenge ergab sich aus dem Vergleich mit der Kontrollsonde, deren Einsatzmenge bekannt war.

## **Hybridisierungsreaktionen**

Mindestens ein Tag ungefütterte Hydren wurden 2min in 1ml 2% Urethan relaxiert bevor sie mit 4% PFA/Hydramedium, 10min bei 4°C fixiert wurden. Anschließend wurde diese Fixierungslösung erneuert und über Nacht bei 4°C weiterhin fixiert.

Die fixierten Tiere wurden 3x 5min in PBS (Hochsalz) gewaschen, anschließend je 5min in 25% MeOH/PBT, 50% MeOH/PBT, 75% MeOH/PBT und 100% MeOH dehydriert. Die Rehydrierung erfolgt je 5min mit zunächst 100% MeOH, dann 75% MeOH/PBT, 50% MeOH/PBT, zuletzt 25% MeOH/PBT. Die Proben wurden dann 3x 5min mit PBT gewaschen.

Zur Permeabilisierung wurden die Hydren 10min mit ProteinaseK-Arbeitslösung behandelt. Diese Reaktion wurde mit einer kurzen und einer 5-minütigen Behandlung mit Glycin-Arbeitslösung gestoppt. Anschließend wurde erneut 2x 5min mit PBT gewaschen bevor die Hydren 2x 5min in 0,1M Triethanolamin inkubiert wurden. Es folgten je 5min in 0,25% Acetanhydrid und 0,5% Acetanhydrid und erneutes Waschen 2x 5min mit PBT.

Die Tiere wurden dann 20min in 4% PFA/Hydramedium erneut fixiert und 5x 5min in PBT gewaschen. Anschließend wurden die Hydren 10min in 50% HybMix/PBT bei 55°C inkubiert, dann weitere 10min in 100% HybMix bei 55°C. Es folgten mindestens 2h in 100% HybMix bei 55°C.

Die einzusetzende Sondenmenge in HybMix (0,005 – 0,2ng/μl) wurde zunächst 2min bei 95°C aufgeköcht und 10min bei 55°C inkubiert bevor die Hydren darin über Nacht inkubiert wurden.

Die Sonde wurde durch Waschen mit 100% HybMix, 75% HybMix/2x SSC, 50% HybMix/2x SSC und 25% HybMix/2x SSC für je 5min bei 62°C entfernt. Es folgte Inkubation 2x 30min in 0,1% CHAPS/2x SSC bei 62°C. Anschließend wurden die Hydren 2x 10min mit MAB gewaschen bevor sie 1h bei Raumtemperatur und mindestens 1h bei 4°C in Blocklösung inkubiert wurden. Zuletzt wurden die Tiere in anti-DIG-Antikörper-Lösung über Nacht inkubiert.

Die Hydren wurden 6x 30min mit MAB gewaschen, anschließend 2x 5min mit NTMT. Es folgte die Färbung bei 37°C in NBT-BCIP-Färbelösung, die durch 20-minütiges Waschen in 100% EtOH gestoppt wurde. Die Tiere wurden zuletzt 2x 5min mit PBS (Hochsalz) gewaschen bevor sie in einem Tropfen PBS-Glycerin auf einem Objektträger eingebettet wurden.

### ***Doppel-Hybridisierungsreaktionen***

Doppel-*in situ*-Hybridisierungen erfolgten bis zur Farbreaktion identisch zu den einfachen Hybridisierungsreaktionen. Nach Färbung mit NBT-BCIP-Färbelösung und Waschen mit 100% EtOH wurden die Hydren hier stattdessen 10min in Glycin-HCl inkubiert, anschließend viermal kurz in MAB und dann zweimal 10min in MAB. Es erfolgte eine weitere Inkubation 1h bei Raumtemperatur und mindestens 1h bei 4°C in Blocklösung bevor die Hydren über Nacht bei 4°C in anti-FITC-Antikörper-Lösung gegeben wurden. Sie wurden dann erneut 6x 30min mit MAB gewaschen, zweimal 5min in NTMT inkubiert und schließlich mit *Fast Red TR/Naphthol AS-MX* bei 37°C gefärbt. Zuletzt wurden die gefärbten Hydren zweimal 5min mit DEPC-H<sub>2</sub>O gewaschen und in PBS-Glycerin eingebettet.

### **5.4.8 Subzelluläre Fraktionierung**

250 Hydren wurden in 2ml Mitopuffer auf Eis 20min inkubiert bevor mit 30 Stößen gepottert wurde. Durch Zentrifugation bei 1000g, 4°C, 10min wurden die Kerne von 250

Tieren pelletiert. Der Überstand wurde entnommen und 30min bei 16.000g, 4°C zentrifugiert. Im Sediment befanden sich die Mitochondrien von 250 Tieren. Der Überstand wurde erneut entnommen und 1h bei 4°C und 100.000g zentrifugiert. Dabei entstand die Mikrosomenfraktion im *Pellet*, der Überstand entsprach dem Zytoplasma von 250 Tieren. Alle Fraktionen wurden mit Ladepuffer versetzt und 2min bei 95°C aufgekocht.

## **5.5 Methoden für humane Zellen**

### **5.5.1 Kultivierung von HEK293T**

HEK293T-Zellen wurden in DMEM/10% FKS/5% Pen/Strep bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und gesättigter Luftfeuchtigkeit kultiviert.

### **5.5.2 Transfektion von HEK293T**

Zur Transfektion wurden 70-80% konfluente Zellen in einem 6-well auf einem Deckglas kultiviert. Zu 8µg Maxipräparation wurden 20µl PEI pH7,0 gegeben und 10min bei Raumtemperatur inkubiert. Diese Lösung wurde anschließend auf die Zellen gegeben und weitere 3h bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und gesättigter Luftfeuchtigkeit inkubiert. Schließlich wurde das Medium gegen frisches DMEM/10% FKS/5% Pen/Strep ersetzt. Transfizierte HEK293T wurden nach 24-48h fixiert.

### **5.5.3 Fixierung von HEK293T**

Transfizierte HEK293T wurden zunächst zweimal mit PBS (Zellkultur) gewaschen bevor sie mit 4% PFA/PBS 15min fixiert wurden. Anschließend wurden die Zellen erneut zweimal mit PBS (Zellkultur) gewaschen, 5min bei Raumtemperatur mit DAPI/TO-PRO3-Färbelösung gefärbt und in Vectashield eingebettet.

#### **5.5.4 Immunfluoreszenz an HEK293T**

Transfizierte HEK293T wurden zunächst zweimal mit PBS (Zellkultur) gewaschen und 15min mit 4% PFA/PBS fixiert. Nach erneutem zweimaligen Waschen mit PBS (Zellkultur) wurden die Zellen 15min mit Permeabilisierungslösung permeabilisiert und zweimal mit PBS (Zellkultur) gewaschen. Dann wurden sie eine Stunde in Blocklösung inkubiert, bevor sie auf 100µl Primärantikörper gegeben wurden. Es folgte dreimal 10-minütiges Waschen mit Waschlösung und Inkubation in 100µl Sekundärantikörper für eine Stunde. Anschließend wurde erneut dreimal 10min mit Waschlösung gewaschen, bevor die Zellen mit DAPI/TO-PRO3-Färbelösung gefärbt und in Vectashield eingebettet wurden.

#### **5.6 Antikörper-Herstellung**

Zur Herstellung der anti-ZIC7A12- und anti-CNA7B10-Antikörper wurden je 1mg/ml rekombinantes HyZic bzw. rekombinantes CnASH verwendet. Dieses wurde zuvor mittels bakterieller Expression im großen Maßstab gewonnen, über Nickel Sepharose aufgereinigt und die Proteinkonzentration ermittelt. Rekombinantes HyZic beziehungsweise CnASH wurde dann bei Frau E. Kremmer am Helmholtz Zentrum München zur Immunisierung von Ratten eingesetzt.

Zur Herstellung der anti-CnASH- und anti-JAG-IC-Peptidantikörper wurden Peptide (siehe 5.1.6) synthetisiert, die dann zur Immunisierung von Kaninchen verwendet wurden. Beides erfolgte durch die Davids Biotechnologie GmbH.

#### **5.7 Konfokale Mikroskopie**

Optische Schnitte wurden mit dem *Leica TCS SP Confocal Laser scanning* Mikroskop aufgenommen, das mit einem Ölimmersions Plan-Apochromat 100/1.4 NA Objektiv ausgestattet ist. EGFP, FITC, Alexa488 und FM4-64 wurden mit einem Argonlaser bei einer Anregungswellenlänge von 488nm und Emissionsfilter bei 520 – 540nm für eGFP, FITC und Alexa488 bzw. bei 640-760nm für FM4-64 visualisiert. Ein Helium-Neon-Laser wurde für die Visualisierung von TO-PRO3 bei einer Anregungswellenlänge von 633nm und Emissionsfiltern bei 660 – 760nm verwendet, während Cy3 und RFP mit Hilfe eines Kryp-

ton-Lasers bei einer Wellenlänge von 561nm angeregt und mit Emissionsfiltern bei 570 – 580nm visualisiert wurden. Die Auflösung der Bilder betrug 512 x 512 Pixel, der Abstand zwischen den optischen Schnitten 300nm bzw. 500nm. Weiterhin wurde jedes Bild dreimal aufgenommen, um Hintergrundrauschen zu reduzieren. Mit Hilfe von ImageJ 1.37k und Adobe Photoshop 10.0 wurden die resultierenden 8-bit Graustufen-Bilder zu RGB-Bildern überlagert und bearbeitet.

### ***Konfokale Mikroskopie am lebenden Tier***

Bei einem Lebend-Scan wurden die Tiere zunächst mit 2% Urethan 2-3min relaxiert und auf einem Objektträger platziert. Ein Deckglas mit Wachsfüßchen wurde vorsichtig darüber gegeben, um die *Hydra* zu fixieren. Es wurden sofort optische Schnitte angefertigt.

Bei zusätzlicher Anfärbung mit FM4-64 wurde zunächst 1µl einer 500µM FM4-64-Lösung in den Gastralraum injiziert, die *Hydra* anschließend in 50µM FM4-64-Lösung für 20min bis 20 Stunden inkubiert. Schließlich wurde die gefärbte *Hydra* wie oben beschrieben relaxiert und auf dem Objektträger platziert.

## **5.8 Erstellen eines phylogenetischen Stammbaums**

### ***POU-Stammbaum***

Ein *Alignment* mit den POU<sub>S</sub>- und POU<sub>H</sub>-Domänen, sowie dem Linker-Bereich verschiedener Organismen wurde mit Hilfe von ClustalX 2.0.9 angefertigt. Ein *Neighbour joining tree* wurde dann unter Ausschluss der Positionen mit Lücken und Korrektur von mehrfachen Substitutionen mit 10.000 *bootstraps* erstellt.

### ***Delta-Serrate-Jagged- und Mindbomb-Stammbaum***

Ein *Alignment* mit den Vollängenproteinen verschiedener Organismen wurde angefertigt und ein phylogenetischer Stammbaum entsprechend dem POU-Stammbaum erstellt.



## 6 Anhang

### 6.1 Gensequenzen

**CnASH** (U36275.1)

**HvNotch** (EU152252)

**HyZic** (AY436645)

#### AS-C3

```
ATGGTGGTTA TGACTCCAAA TATGACCGAT AAAAAAGGAC TAAAAAATAC AAGCAATGAA GAAACAAAA
AGAAAGTGGG ACTTGAAATT AAAAAAGAAA ATTTAAAGCC CGAGGTTTTT GAAACGTTTT TACCGACAAC
GATTAGTTAC CACTCGAATT GTTTACCAGA CGCGATTTTT CTTACGACGT CCAACGGTCA GTTAATCACA
ACATCTACAA TAAATTACTC AATATTTTTG ACAGACATTA CTTCTTCATC CGTTACAAAC AAACAAGAAA
CTAAAAAAGA TAAAGACGAG GAACATCTTA TAGCTGCAGC TCGGACGCCA TCTGCAAGTC AACTGTGTTC
ATCTGCAACG AGCAAAGAAG AAAACATATT CTCACCAAAG TTTCCATTTT TAACAACAAG TTCACAAAGC
GATAACAACA TTACAAAAC ATTTGCTCCA GTTTTCAGTT TATCCAATCC ATTACTTGCA CCGAACCTTG
CAATACCCAT TTACAACACT CAGCCAACTA CTACAGGTGT TGGTGATTCT TTTAAAAATA TATTTGTTAC
TACACCACAA GCAAAACCAA ACCCTTCTAA ATCTAAAGAA TCAGGTAACT CAGAGAGTGA CAGCCATAAT
ATGGCAACTT CACGGGGCAG AAAACGTACT GCTCAATCTC GTTTGCCAGC TAAACTTAAA GAACCAGCGG
CAGTTGCACG CAGAAATGCA CGTGAAAGAA GACGCGTAAA AATGGTTAAT GATGGCTTTT TAAGATTGCG
AAGACATGTT CCGACTGATC CTAAAAACAA AAAGCTATCT AAAGTTAAAA CACTTCGTTT AGCAATAGAG
TATATTCATC ATTTGCAACA CTTACTCCAA GTTGACAATT GTTCTCAACA AACTCTGCAA TTAGTTGCAA
ATATTTCTCA AGTGTCTTCA TTCGATGACA TAGACGGTGG GAATGCATGG CTGAACACTG AAGCTATGGT
GAGTAAATTT TAA
```

#### HyDsl

```
ATGATTTTTA TAGTTATTTT ATACCTTTGT CAAACTTTAC AGTTTTTAGA ATCCTCAGTG CTGTAAAGA
TTAATTTGGA AACATTTGAC ACCCGCTGTT CAAAAACCG AGATTTTAAAC GGAATACCAT GTAAAGTTT
ACCTGCTTCT GAGTGTTCGT TTAAATTTGA GATCTGCTAC GGTTCAAGTT CACTTCACTG TTTTTTTACA
CATACTTAA CTCAAGATAA AAATACAAGA ATTACAAGAT TTCCACTAAA GTTATCAAAT GATATGACTA
ACCCATTGAT ATTAAAAACA TCATCACACA AGGTAAGTTT TAATTTAAGC GTCACAATTT AACTCAATT
TCACGAAAAAT GACAAGAATA TCAATTTGTT CAATCGGTTG TCAAAAACAA TTTCACTTGA TGCAATCGGC
ATAAAAAAC ATATCATTTT AGGTGGAATA AATCCAATGA TATCAAATGG AATATCATTT ACAACAAGTT
TCGATTGCGA TGGCAATTTT AAACCGCCTA ATTGTCTTGA AAAAGTATGC ATCGAACATG ATGACGATAT
AAACGGACAC TACACATGTG AAAAAAATGG AGTTATAACA TGCAGAGTCG GGTGGACTGA CCCATCAAAG
AAATGCTTAG TTTCAACACT ACAACCTTTC TCAAAAAGTG GCTGCTATCA TGACTTTGGA CCTATCTTAG
GAAAACGACC TTTCCCAATA TTTGTTAATT ACCGCTCGTT AATTGACTGG AATAATAAAA AAGTTAGCTT
```

TGAAAAATA	ACTATGAAAT	GTTCTTCTTA	TGCTAAAGAA	AACGGGTTTG	AATACTTTGG	TATTGAATTT
TGGGGTGAGT	GTTGGACTGG	TGCAACACCC	AATATAAACT	ATGCTCGAGA	CGGAGAATCT	ACTTTTATGTT
GGCCTACTCC	AGATGAAAAAT	TTGGGTCCAA	TGCTTGTGGG	ACAAGACTCA	ACCATATGGT	GTACAAAAAGG
AATAAAATTGA						

**HyFringe – Hma2.222965-Teilstück**

ATGAAGTTGC	ATACTATCTT	GTTTTTATTT	TACCTTCATT	CAGTTGCACT	AGAGGTAGAA	GAACTCAAGT
CCAACGATGT	TCCATATCCA	GTGACTGGGT	CTGAAGTTGT	TTTTGTGATA	AGAAATAACC	TTGACAAATC
TGGTGTAATA	AAGGCAAAAA	CCATTAAAGC	AAGTATTAAT	AAGCAAGCAA	AGATGATAAA	TGAAACTGTT
ATTGTAAAAA	TGCTTCATGA	GAAATGGGCA	ACATATGGTG	GATGGACAGT	GTTGCCACTT	GTTGAACACT
TAATCAAAGC	ACACTATGAT	AAAAAATGGA	TATTTTCTG	TGAAGAGACA	ACAAAGGTTG	ATTTAAGGGA
AATACTTACA	ATTTTATCTA	GGCATAATCA	TAATGAGAAA	GTTTTTCTTG	GACATGCATT	ATTTGATTCT
CAACCTGTFA	TCATACACCA	TTTTAAATTT	TTGGATAATC	CTAAAAGCTT	TAAATATCCT	GACTTTGATG
CGGGATGGGC	AATATCACAA	GCATTACTAA	AGCAAACATT	TGAAAGACTG	CAACGAAATA	AAGTTCCTGG
TTTCTCAATT	GATGTTAAAC	ATGAGGTTGC	TTACTATTTT	TATGATGAAG	GCAATGGAAC	GCGGCTTACT
AATATTCCTG	AATTTTGTAT	AAACAAACCA	ATTGAGCCCG	GAGTATGTGC	AACATCAGTA	ATGTGGGAAG
CTCCAAATG	TGGAGAAAGT	GATGCAAATA	ATATTTTGAT	ATCAGTGAAA	ACTTGTGAGA	AATTCATAA
GACTAGAGTT	CCTATTGTTC	AAAAAACTGT	TGCTTTGGAT	GCGAAGAATA	TAGTTTATTA	CAGTGATGTT
ATTGACAAGA	ATATCCCTAC	AGAATATGCT	GATATTGCAA	ATACAGAAAG	AGGTCATTGC	CAAAAACTTT
TTAATATATT	ACAAAAATTT	TTAACTAATA	AAAAATGGGA	AAAGTTTACG	TGGCTAGTTG	TTATTGACGA
CGACACAATT	ATGAACCTFA	AATCCTTGCA	AAAGTFACTA	GCATGTTATG	ATFCTAATGA	ACCTATGGTC
ATAGGTGAAA	GATATGGTTA	TGTGGTTAAT	CAAAATGTGC	ATGGATATGA	GTATCCGACT	GGAGGGGGAG
GGATGGTTTT	AAGTCGTCCT	GCGGTGCAGT	TGATTGTAAA	TAGTATCTAC	AAGTGTGATA	ATGCTGACGA
TCCTGATGAT	ATGTGGCTAG	GATCAGCACT	TAAGCAGCTT	GGTATTTCTG	TAACTCATA	AAACTCTTTT
CATCAGGCAC	AGCCAAATCA	GTACAATGAA	GAATTTTTAT	CGCATCGCTA	TTTGGTTTCT	TTCCACAAAC
ATGAAGGTAT	GAGTCCTATG	GATGTCTTCA	CAAAATACTT	AACCAATCAA	GCAGCAAAAA	AAGCCCCAAC
CAAAACCTCA	GTCGATGTAG	CAACACTCCG	TTGCGAGTCA	GGCTATTTGT	CAGTCAATGT	AGCAGCACTC
CGTTGCGAGT	CAGGCTATAA	GATAGTCAAT	GTAGCATGTT	TTACAGTTAA	AAGTTAA	

**Hyjagged**

ATGGCAAAAA	TTGTATACCT	TTGTTGGGTT	GTGGTTGCAC	TGTCGCAGTT	TCAGAATACG	AAATCAATTG
GAAACATTGA	GATACATATA	GAATATTTTA	AATTTCAAAA	AGATTATCTG	AATTGC CGCG	ATACATGTCT
GCAATACGCT	AGCGTTTGCC	TATCGAATAT	TAACCATAAT	ACAAACTGCG	ATATTGGATA	CATTGAACAA
GAATATAAAC	AATATAATTT	CAACTTATCC	TTTATTAATT	TTACTTTGCC	ACTCGTTGTT	CCTGTTAAAG
ATTTATACAT	GATATCATTT	GAAGTAAACC	AACAACTTC	TAATAACAAC	TCAGCTCTTT	TAAAGAAATA
TAGCACTTAC	ATCAGCTTTA	CGCCTCACAA	CAAATGGGTA	GCAGTCCGCC	ACAATTTTAT	TGGATTTTAC
ATTCGCACAA	CGTGTGATTT	ACCCGAATCA	GCTAATGCTA	CATTTTGGTG	TGATCATCCT	GGCCACTATT
ATGGGTACAA	TGCAAAACAAT	GTTAAGTTAT	GTAATAAAGG	TTGGGAAGGA	AGAAACTGCG	ATAAAAAATA
CACAATTTGC	ATACCCAGAG	ATAACTATAG	GTGTAGAAAC	AACCAGAAAA	TATGCAATCC	TGGATGGACA

GGAATTAATT GTGAAGTTTC CACTTACAAG AAGTTGTGCA AGCCTCGTGA TGATCATACT GGCCATTATG  
GATGCAGCTA TGAAGGAAAC AAAGTCTGCA ATGTTGGCTG GGAAGGAGAA AACTGTCTGA AAAATATTGA  
TGATTGTTTA TCAAATCCTT GCCTAAATAA TGGTTCATGT ATTGATCTGC ATGCAAAATTT CGAATGTGTA  
TGCCCTGGAG AATATGGCGG AAAGCAATGT GAAATTGATT TTCGCAATGA GCCATGCAAA AATAAAGGCA  
TCATGTTACC GGACAATACA TGCAAGTGTC GTTTTGGGTA CAAAGGTAAT AAATGTGAAA TTTGTATTCC  
TTATCACCTC TGTGTTGATC ATGGGACGTG TAAAAACCAT GACACTTGTA ATGGATTATG TATACCTGGT  
GGTTGGGTTG GTC AATTCTG TGA AATAGAG CAAGATGGAT GTAGTCACAA CAGAGGCAAG AAATTTTGT  
CTAGTAAAGG GATATGTGTA AATGATCAAA AAGTGTGAGT TTCTGGACAA GCCTGGAAGT GTTATGTGTA  
TGAAGGATGG GTTGGTAAAC ACTGTGAAAT AAAGATACAT ATATGTAACA AAAGATCACC TTGTCAAAAT  
GGTGGCACCT GTTTAAAAATC TGGAAAGCAT TTTAACGATG ATCAGATTTA TAATTGCAGG TGCTCTTAG  
GATTTTCTGG AAAAAATTTGT GAAATTGAGA TAAATGTGTG TGAAAAGCTA TCACCTTGCC AAAATGGTGG  
CACTTGTTTTG AATATTGGAA AACATTTTAA TGATAATTTG ATTTATGAGT GTCAATGTCC TATAGGGTTT  
TCTGGCAAAA ATTGTGATAT TGATATGCAT GTATGCAATA AGCAATCACC TTGTCAAAAT GGTGGCACTT  
GTTTGAAATC TGGAAAGCAT TTTAATGATC AGGTTTATGA TTGCAGATGT CCTTTAGGAT TCTCTGGGAA  
AAACTGTGAA ATTACTTCTA TACAGTACAA GCAATGTATG TACAGGGAAA TGTGGTATAT TCACAATGAT  
ACTTGGGATG ATGCCTGCAA TGTTTGAGAG TGTGATGATG GAGTTGCAAA ATGTACAGAT GTATGGTGTG  
GCTTACCAAA TTGTTATCAA ATTGAAGATC CAAACTGTAA ATGCAAATTT GTAGAAGGGC ATTGTATCAC  
CCCTCCTTGT TTGCCTTGGG GTATGTGTAA TTTTCAAACA ATCCAGTAT TATATATGGG CTGCTTCACT  
GAATTTAATA CAGAATTGGC AGAGAACTGT GCTAAAGTCA TCTTTTTTTT TAATGTTAGA ATGCTTCCAA  
AGGGAATTTT ATTAGAAGAA TTATGTCAAC AGTTTCACAT TTATAAAAGA GTTCAAAGTT TATTTATTTT  
CAATGAAGTT AGCTTACAGT GTTCTCATGT TCGCTTTAAC TCTTCCCTGG ATCAATTAAT TATTAATATA  
TATAGCAAAA AAAAAAGCAAT TCAGCTATCT TTGGAGATTG CAAAGTACAA GCACACACTT GTCGAACAAT  
TTGAAAATTT TAAATGGCAC GCGCCGCCTA CATTAGTTCT TTTTTTTCGT TCTGTTGCAT ATACAACCAT  
TGAAAACCT TCTACTATGC ATAGTTTCTTA AAAGAAGAA GGATATTTTT TTCCGTTAGT CGGATGTATG  
GTTGTGTGCG TCTCGTACT TTTTGTGTGTC TTTATTTGT GGTTGTATAA GAAAATGACA GTGAAAAAAG  
TATACCTATC TGACACAACA ACAATTATTGA GCATAATAA ACTCAAAGAA AACACTTTGC TTGTTAACAA  
AGATAATTTG AAAAAAGGAA TTTTAAACT ATATCTAGA AAATCTGAAC TACTGTAA

## HyLiAS

ATGACAAGCA CATAACATA TACCACAGAC GGCAATGGTT TGTCGTATCT GCCTTATGAC GTATACAATT  
GTGTTTCATC TCCTACAGAC AACTTTTGTA TTGATGCTGG TTTATTAGAC TACGATCAAC CAGTTGTTCA  
GAGAACACCA ATTGATAACT GGGTTATAAC AAACATTAAC CCAAATCGT ACAACAACGG AATTAACTTT  
AGTGTTTTGA CATATCCGTA CTTACATGAT FATGGCGAGC CAGGTTTCAT TCGCAAAAGA AATGAACGAG  
AAAGAATGAG AGTTCGGAAT GTTAATGAAG GTTATGCTCG TCTTAGAGAC CATTGCCCC TTGAACCAAA  
CGAAAAAAGA CTTTCAAAG TTGAGACACT CCGAGGAGCC ATTAAC TACA TTAAGCTTCT GCAAGATATT  
TTAGAAAAAT CTTCAAAGT TGATAAAAAA ACAACTTAT ACGAAAAGAA ACTGAATGAA GAAACAAATG  
ACATTGACGT AGAAAATTA

## HyMib1

ATGGCCACTG CACATAACAT ATCAATAGAT GTTTGTTTAA GCAGCACCAT TGGGAGTCGT ATAGTGCGTG  
GTCTTGATTG GAAATGGGGT AAACAAGATG GAGGTGAAGG TCATGTTGGT ACAATAAGAA GTTTTGAGAG  
TAATGAGGAA GTGGTGGTTG TTTGGGATAA TGGCACTGCA GCTAATTATA GATGTTCTGA AAGTTATGAT  
TTAAGAATAC TAGATTCAGG GCCTAGTGGT ATTAACATG ATGGTACAAT ATGTGATGGT TGTAGATGTC  
AGCCAATATA TGGGATGCGG TGGGTATGTG CAGATTGCAA CAACTATGAT TTATGCACTG TTTGTTACCA  
TGCTGATAGA CATCAGTTGC GACATCGATT TTACAGAATA TGTGCACCAA ATGGAAATGA AGTACTGATG  
GAACCGCGCA AAAAAGCTAA AAAGTTAATT TCTCGTGGGA TCTTTCCTGG TGCAAGGGTG ACTCGTGGAG  
TTGATTGGCA CTGGGAGGCA CAAGATGGTG AGGCTGGCCG AAGAGGTAAA GTGGTTGATA TTCAAAATTG  
GAGTGCTACT ACCCCCCGTA GTGCTGCTTA TGTTGCTTGG GATACAGGTG CAAAGAATCT CTATCGTATT  
GGTTTTGAAG GAATGGTTGA TTTGAAATGT ATTTCTGATG CCAAGGGATC ATCATTTTAC AGAGATCATT  
TGCCTTTACT TGGAGAGAAT TTAACAACCT CTCAATCAAT GACCAAACAT TGGAAAGATAG GTGATTTTGT  
GCGAGTAAAT CTCGATTTAG ATATTGTGCA AACTCTCCAG CGGGGCCATG GAGGGTGGGC AGATGGTATG  
GTTGAGGCAA TGGGGAGCAT TGGAGTTGTT TTTGGGTTTG ATGAAGACAG AGATGTTATT GTTCTATGTC  
CAGTGGCAAT AAGTGGATAT TTAACCCATC AGTTCCTACT TGTGGATTCA GAGAGTGATG GTCCAAAAAG  
ACTTGCTGTT GGAGATATTG TGCAGATCTT AAATGATCAA GAACAAGTAA GCAATTTACA AATTGGACAT  
GGAGAATGGA CTGATGTTAT GGTGCTACC TTAGGAAGA TTGGTTGTGT TACTAAAGTT TATCATGATG  
GAGATTTAAA GGTTGAAGTT AATGGAACAA GCTGGACTTA CAATCCAAAA TGTCTAAAAA GAATTAGTTC  
ACGTGGAACA AACTCAGCAT CCAAAATCTT TAAATTCCTT GAAAGTCATT CGTCTAAAGA CCCTGCTGAA  
TTATTTGTTA AAGCTGCTGC AGAAGGCAAT ATTA AAAATT TAGAGGAGTT ATGTCATTTT CCAAATTTTG  
ATATAAATGT TCTGTATGCA GGTCAACAG CACTTCAAGT TGCCTGTCAA AATGGAAAAT TAGAAAGTAT  
TAAATTTCTT CTCCAATTAA ATGCAGATGT TGAAGTTGAA GATAATGATG GTGATAAAGC TGTCATCAT  
GCTACATTTT ATGATGAAAAG TAGAACCTTT GCTTTGTTGA AGGAGGCAAA TGCAGATTTG AACTCTCGCA  
ATAAAGACG CCAAACCTGCA TTACATGTTG CTGTAACAAA AGGTCACATA GGAATATCA AAGCTTTGCT  
TGATGCTGGT GTTCATGTCA ATTTGCAAGA TTCTGAAGGA GATACTGCAT TGCATGATGC TATTTCCAAA  
AAGCGAGATG ATATTGTTGA GCTCCTACTT AACTCTGGTA CAGATATTTT GCTGTCCAAT AACAATGGCT  
TTAATTCATT ACATCATGCA GCTTTAAGAG GAAATGTAAA GGCAGTCCAA CTGATGTTGG AAAAGAAAAGA  
TAAACCGTGG ATGTCAATG AGCAAAAAGA TGATGGATAT TGTGCCTTGC ATTTAGCTTC ATTAATAAT  
CATTTAGAGG TAGCAAACT CTTAATAAAA TTAGGACATA CCAATGTTAA CATTCAAAAC ACAAATTTAC  
AAACACCACT TCATCTGGCT GTACAAAAGC AACATGAAGA AATCGTAAAG CTTCTTGTTC CTGAAGGAGC  
AAATGTTAAT GTGCAAGACA AAGATGGTGA TTCACCCTA CATGAAGCTT TAAGAAACCA TACGTTATTA  
AGATTAAAAG AAATGCAAAG TGTCAAAGAT GTTTCCAAGT TATTAATGGG GTTTGGATCG CAAGACTTTA  
CAAAAACCTAG CAGTACCTCA ATTGCATGCT TTCTTGCTGA GCATGGTGCT CAATTAGCTT GTAAAAATAA  
TAAAGGTCAG ACTCCTCTTG ATCTCTGTCC AGATCCAGGC TTATGCAATG CACTTAGACT ATCTTATGGA  
CAAAGTATTC AGAAAAACAA GAAAATGTTG GAGACAGAAT GTGTGTTTG TFCAGACATG CCGCGTGAAG  
TTATTTTCTC ACCCTGTGGC CACCTGTAG CATGTCTGG TTGTGCCCCG CGAATTAATA AATGTTAAT  
TTGCAAAGAG TTGGTTCAAT CTCGACAAA GATTGAAGAG TGTTTAGTGT GTTCTGATAA ACCTGCAAGC  
GTTCTTTTTC AACCTTGTTG TCATATTCCT GCGTGCTCTG CATGTTCTAG CTTAATGAAG AAGTGTGTCC  
AGTGTAGAGG AACTATATTA AAGATGGTTC CTTCCATAGA TTTATGTGGT TTAAAAGAAT CTTATCTTC  
ATCTTTAATT AACACAATG ATATTCTTTT ATTGGAATAA CAGATTCAAG AAATGAAGGA GCAGACAACG  
TGCGTTGTTT GCTTGGATAG ACGAAAAAC ATGATATTTT TGTGTGGCCA TGGATCATGT CAAGTTTGCG  
GTGACCAATT ATCCGAATGT CCTATGTGCA GAAAATTAAT CGAGAAGAAA ATTTTGCTAT TTTGCTAA

## HyPou4

```
ATGTTTTCTC ATGTTAAAGG ATACGGAGTT TCAAACATGT TTGACAACAT GGACGACTCC CATTTGTTGG
GATCTCAAAT AGACTCAATG TCAAAATATT TGCCAAAACA AAGCGGTGGT TCAAAGTTAC CAAGTGCTTT
TCTACACAGT CTTCATGCAA ATCAAGACCC TACTCAATAC GATCCCATG ATATCTTAGA TCAAATATCA
GCTTCTCTTC AACCGAACGC GAATGAAAAC TCTTATGAGC ATCATCTAC AGCAATATCA TCGAACACAA
ACAATTACTC AACCAAGTCAT TFACTGTCTC CATCGTCAAC TTCATTTTCT ACTTCATTTA ACAATCCAAA
TTTTAGCAGT TTCAATAATT CTTTTGTGTC TGCCCGCAGCT GCAGCTGCAG CCGCAGCCGC AGCGGCTCAA
GTTGGCCAAG AGGTTGAATG TACACCACGA GAACTAGAAT GGTTTGCGA ACGCTTTAAA CAAAGACGTA
TTAAACTAGG AGTTACTCAA GCGGATGTTG GAACAGCTCT CGCACACTTA AACTTCCAG GTGTAGGATC
CTTAAGTCAG TCTACTATAT GTCGGTTTGA ATCTCTTACG CTAAGTCATA ATAACATGAT GGCTTTAAAG
CCTGTTTTAT CGGCTTGGTT AGATGAGGCA GAACGTGCAA ACCGTATGAA ATCTAAAGAC AGTGCATTTT
TACCAAATGC TGATAAAAAA AGAAAACGCA CTTCTATTGG TCGCGCCGAA AAACGATCGC TTGAGGCATA
CTTTGCAATG CAACCCAGAC CTTGAGCGA TAAAATTGCC GCAATAGCTG AAAAATTAGA CTTATCTAAA
AATGTTGTCC GCGTTTGGTT TTGCAACCAA AGGCAAAAGA AAAAAAGAAT GAAGTTTTCT GTTCATTAA
```

## Kringelchen

(AY193769)

## 6.2 Proteinsequenzen

Arg-1 (C. elegans)	(NP_001024615)	Lag-2 (C. elegans)	(NP_503877)
Apx-1 (C. elegans)	(NP_503882)	Mindbomb1 (B. taurus)	(XP_613236)
Brn-3a (M.musculus)	(NP_035273.3)	Mindbomb2 (B. taurus)	(XP_618469)
Brn-3b (D. rerio)	(NP_997972)	Mindbomb1 (D. rerio)	(NP_775393)
Brn-3b (M.musculus)	(AAB30578)	Mindbomb2 (D. rerio)	(NP_001073146)
Brn-3c (D. rerio)	(NP_571353)	Mindbomb1 (D. melanogaster)	(NP_648826)
Brn-3c (M.musculus)	(AAB30579)	Mindbomb2 (D. Melanogaster)	(NP_609933)
Brn5 (M. musculus)	(P56223)	Mindbomb1 (G. gallus)	(XP_419157)
CEH-6 (C. elegans)	(AAG10298)	Mindbomb2 (G. gallus)	(NP_001006301)

CEH-18 ( <i>C.elegans</i> )	(AAA52203)	Mindbomb1 ( <i>H. sapiens</i> )	(NP_065825)
DeltaA ( <i>D. rerio</i> )	(NP_571029)	Mindbomb2 ( <i>H. sapiens</i> )	(NP_543151)
DeltaB ( <i>D. rerio</i> )	(NP_571033)	Mindbomb1 ( <i>M. musculus</i> )	(NP_659109)
DeltaC ( <i>D. rerio</i> )	(NP_571019)	Mindbomb2 ( <i>M. musculus</i> )	(NP_660106)
DeltaD ( <i>D. rerio</i> )	(AAL31528)	Mindbomb1 ( <i>X. laevis</i> )	(NP_001085805)
Delta-like4 ( <i>D. rerio</i> )	(NP_001073304)	Mindbomb2 ( <i>X. laevis</i> )	(NP_001121336)
DeltaD1 ( <i>D. melanogaster</i> )	(AAR21456)	Oct1 ( <i>M. musculus</i> )	(NP_035267)
Delta-like1 ( <i>G. gallus</i> )	(NP_990304)	Oct2 ( <i>M. musculus</i> )	(Q00196)
Delta-like4 ( <i>G. gallus</i> )	(XP_421132)	Oct3/4 ( <i>M. musculus</i> )	(NP_038661)
Delta-like1 ( <i>H. sapiens</i> )	(NP_005609)	Oct6 ( <i>M. musculus</i> )	(P21952)
Delta-like3 ( <i>H. sapiens</i> )	(NP_058637)	Oct7 ( <i>M. musculus</i> )	(NP_032925)
Delta-like4 ( <i>H. sapiens</i> )	(NP_061947)	Oct8 ( <i>M. musculus</i> )	(P31361)
Delta-like1 ( <i>M. musculus</i> )	(NP_031891)	Oct9 ( <i>M. musculus</i> )	(P62515)
Delta-like3 ( <i>M. musculus</i> )	(NP_031892)	Oct11a ( <i>M. musculus</i> )	(P31362)
Delta-like4 ( <i>M. musculus</i> )	(NP_062327)	Oct1 ( <i>X.laevis</i> )	(NP_001095255)
Delta-like1 ( <i>X. laevis</i> )	(AAC38017)	Pit-1 ( <i>D. rerio</i> )	(AAI62244)
Delta-like2 ( <i>X. laevis</i> )	(AAB37131)	Pit-1 ( <i>M. musculus</i> )	(CAA40737)
DSL-1 ( <i>C. elegans</i> )	(NP_500054)	POU2 ( <i>D. rerio</i> )	(BAA05901)
DSL-2 ( <i>C. elegans</i> )	(NP_500052)	POU-c ( <i>D. rerio</i> )	(CAA48481)
DSL-3 ( <i>C. elegans</i> )	(NP_500108)	POU6 ( <i>E. dichotoma</i> )	(ABU92523)
DSL-5 ( <i>C. elegans</i> )	(NP_502191)	POU6f2 ( <i>M. musculus</i> )	(NP_778171.2)

DSL-6 ( <i>C. elegans</i> )	(NP_502148)	POU6 ( <i>O. anatinus</i> )	(XP_001513485)
Fringe ( <i>D. melanogaster</i> )	(NP_524191)	POU5f1 ( <i>P. major</i> )	(BAH08689)
I-POU ( <i>D. melanogaster</i> )	(P24350)	POU6f1 ( <i>X. Tropicalis</i> )	(AAI53339)
Jagged1a ( <i>D. rerio</i> )	(NP_571936)	Serrate ( <i>D. melanogaster</i> )	(CAA40148)
Jagged1b ( <i>D. rerio</i> )	(NP_571938)	Serrate1 ( <i>G. gallus</i> )	(CAA64604)
Jagged2 ( <i>D. rerio</i> )	(AAI63889)	Serrate2 ( <i>G. gallus</i> )	(BAA21713)
Jagged1 ( <i>H. sapiens</i> )	(AAC51731)	Serrate1 ( <i>X. laevis</i> )	(NP_001083776)
Jagged2 ( <i>H. sapiens</i> )	(AAB84215)	SPRM-1 ( <i>M. musculus</i> )	(P56225)
Jagged1 ( <i>M. musculus</i> )	(NP_038850)	Unc-86 ( <i>C. elegans</i> )	(NP_001021191)
Jagged2 ( <i>M. musculus</i> )	(NP_034718)	ZP-50 ( <i>D. rerio</i> )	(Q90482)



## 7 Literaturverzeichnis

**Del Alamo, D. & Mlodzik, M.** (2006). Frizzled/PCP-dependent asymmetric Neuralized expression determines R3/R3 fates in the *Drosophila* eye. *Developmental Cell* 11, 887-894

**Alonso, M.C. & Cabrera, C.** (1988). The achaete-scute gene complex of *Drosophila melanogaster* comprises four homologous genes. *EMBO Journal* 7, 2585-2591

**Aruga, J., Minowa, O., Yaginuma, H., Kuno, J., Nagai, T., Noda, T., Mikoshida, K.** (1998). Mouse *Zic1* is involved in cerebellar development. *Journal of Neuroscience* 18, 284-293

**Aruga, J.** (2004). The role of *Zic* genes in neural development. *Molecular and Cellular Neuroscience* 26, 205-221

**Bailey, A.M. & Posakony, J.W.** (1995). Suppressor of *Hairless* directly activates transcription of Enhancer of split complex genes in response to Notch receptor activity. *Genes & Development* 9, 2609-2622

**Benedyk M.J., Mullen, J.R., DiNardo, S.** (1994). *Odd-paired*: a zinc finger pair-rule protein required for the timely activation of *engrailed* and *wingless* in *Drosophila* embryos. *Genes & Development* 8, 105-117

**Berdnik, D., Torok, T., Gonzalez-Gaitan, M., Knoblich, J.** (2002). The endocytic protein  $\alpha$ -Adaptin is required for numb-mediated asymmetric cell division in *Drosophila*. *Developmental Cell* 3, 221-231

**Bode, H.R., Gee, L.W., Chow, M.A.** (1990). Neuron differentiation in hydra involves dividing intermediates. *Developmental Biology* 139, 231-243

**Bode, H.R.** (1996). The interstitial cell lineage of hydra: a stem cell system that arose early in evolution. *Journal of Cell Science* 109, 1155-1164

**Böttger, A. & Alexandrova, O.** (2007). Programmed cell death in *Hydra*. *Seminars in Cancer Biology* 17, 134-146

- Bray, S.J.** (2006). Notch signaling: a simple pathway becomes complex. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 7, 678-689
- Brückner, K., Perez, L., Clausen, H., Cohen, S.** (2000). Glycosyltransferase activity of Fringe modulates Notch-Delta interactions. *Nature* 406, 411-415
- Campbell, R.D.** (1967). Tissue dynamics of steady state growth in *Hydra littoralis*. II. Patterns of tissue movement. *Journal of Morphology* 121, 19-28
- Campbell, R.D. & David, C.N.** (1974). Cell cycle kinetics and development of *Hydra attenuate*, II. Interstitial cells. *Journal of Cell Science* 16, 349-358
- Castro, D., Skowronska-Krawczyk, D., Armant, O., Donaldson, I., Parras, C., Hunt, C., Critchley, J., Nguyen, L., Gossler, A., Göttgens, B., Matter, J.-M., Guillemot, F.** (2006). Proneural bHLH and Brn proteins coregulate a neurogenic program through cooperative binding to a conserved DNA motif. *Developmental Cell* 11, 831-844
- de Celis, J.F. & Bray, S.** (1997). Feed-back mechanisms affecting Notch activation at the dorsoventral boundary in the *Drosophila* wing. *Development* 124, 3241-3251
- Chen, C.M., Kraut, N., Groudine, M., Weintraub, H.** (1996). I-mf, a novel myogenic repressor, interacts with members of the MyoD family. *Cell* 86, 731-741
- Chen, N. & Greenwald, I.** (2004). The lateral signal for LIN-12/ Notch in *C.elegans* vulval development comprises redundant secreted and transmembrane DSL proteins. *Developmental Cell* 6, 183-192
- Chiba, S.** (2006). Notch Signaling in Stem Cell Systems. *Stem Cells* 24, 2437-2447
- Chitnis, A.** (2006). Why is Delta endocytosis required for effective activation of notch? *Developmental Dynamics* 235, 886-894
- Cubas, P., de Celis, J.-F., Campuzano, S., Modolell, J.** (1991). Proneural clusters of *achaete/scute* expression and the generation of sensory organs in the *Drosophila* imaginal wing disc. *Genes & Development* 5, 996-1008

**Dale, J.K., Maroto, M., Dequeant, M.L., Malapert, P., McGrew, M., Pourquie, O.** (2003). Periodic notch inhibition by lunatic fringe underlies the chick segmentation clock. *Nature* 421, 275-278

**David, C.N.** (1973). A quantitative method for maceration of hydra tissue. *Wilhelm Roux' Archiv* 171, 259-268

**David, C.N. & Gierer, A.** (1974). Cell cycle kinetics and development of *Hydra attenuate*. III. Nerve and nematocyte differentiation. *Journal of Cell Science* 16, 359-375

**David, C.N. & Murphy, S.** (1977). Characterization of interstitial stem cells in Hydra by cloning. *Developmental Biology* 58, 372-383

**David, C.N. & Challoner, D.** (1974). Distribution of interstitial cells and differentiating nematocytes in nests in *Hydra attenuata*. *Amer. Zool.* 14, 537-542

**Diaz-Benjumea, F.J. & Cohen, S.M.** (1995). Serrate signals through Notch to establish a Wingless-dependent organizer at the dorso-ventral compartment boundary of the *Drosophila* wing. *Development* 121, 4215-4225

**Doherty, D., Feger, G., Younger-Sheperd, S., Jan, L.Y., Jan, Y.N.** (1996). Delta is a ventral to dorsal signal complementary to Srrate, another Notch ligand, in Drosophila wing formation. *Genes & Development* 10, 421-434

**Ebert, P.J., Timmer, J.R., Nakada, Y., Helms, A.W., Parab, P.B., Liu, Y., Hunsaker, T.L., Johnson, J.E.** (2003). Zic1 represses *Math1* expression via interactions with the Math1 enhancer and modulation of Math1 autoregulation. *Development* 130, 1949-1959

**Engel, U., Pertz, O., Fauser, C., Engel, J., David, C.N., Holstein, T.W.** (2001). A switch in disulfide linkage during minicollagen assembly in *Hydra* nematocysts. *EMBO Journal* 20, 3063-3073

**Engel, U., Özbek, S., Engel, R., Petri, B., Lottspeich, F., Holstein, T.** (2002). Nowa, a novel protein with minicollagen Cys-rich domains, is involved in nematocyst formation in *Hydra*. *Journal of Cell Science* 115, 3923-3934

- Fehon, R.G., Kooh, P.J., Rebay, I., Regan, C.L., Xu, T., Muskavitch, M.A., Artavanis-Tsakonas, S.** (1990). Molecular interactions between the protein products of the neurogenic loci Notch and Delta, two EGF-homologous genes in *Drosophila*. *Cell* 61, 523-534
- Fleming, R.J.** (1998). Structural conservation of Notch receptors and ligands. *Seminars in Cell and Developmental Biology* 9, 599-607
- Fortini, M.E. & Artavanis-Tsakonas, S.** (1994). The suppressor of hairless protein participates in notch receptor signaling. *Cell* 79, 273-282
- Fryer, C.J., White, J.B., Jones, K.A.** (2004). Mastermind recruits CycC:CDK8 to phosphorylate the Notch ICD and coordinate activation with turnover. *Molecular Cell* 16, 509-520
- Gazave, E., Lapébie, P., Richards, G.S., Brunet, F., Ereskovsky, A.V., Degnan, B.M., Borchiellini, C., Vervoort, M., Renard, E.** (2009). Origin and evolution of the Notch signalling pathway: an overview from eukaryotic genomes. *BMC Evolutionary Biology* 9:249
- Gordon, W.R., Vardar-Ulu, D., Histen, G., Sanchez-Irizarry, C., Aster, J.C., Blacklow, S.C.** (2007). Structural basis for autoinhibition of Notch. *Nature Structural and Molecular Biology* 14, 295-300
- Greenwald, I.S., Sternberg, P.W., Horvitz, H.R.** (1983). The *lin-12* locus specifies cell fates in *Caenorhabditis elegans*. *Cell* 34, 435-444
- Grens, A., Mason, E., Marsh, J.L., Bode, H.R.** (1995). Evolutionary conservation of a cell fate specification gene: the *Hydra achaete-scute* homolog has proneural activity in *Drosophila*. *Development* 121, 4027-4035
- Grimmelikhuijzen, C.J., Dockray, G.J., Schot, L.P.** (1982). FMRamide-like immunoreactivity in the nervous system of hydra. *Histochemistry* 73, 499-508
- Guder, C., Pinho, S., Nacak, T., Schmidt, H., Hobmayer, B., Niehrs, C., Holstein, T.** (2005). An ancient Wnt-Dickkopf antagonism in Hydra. *Development* 133, 901-911
- Haines, N. & Irvine, K.D.** (2003). Glycosylation regulates Notch signalling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 4, 786-797

- Hartenstein, V. & Posakony, J.W.** (1989). Development of adult sensilla on the wing and notum of *Drosophila melanogaster*. *Development* 107, 389-405
- Hayakawa, E., Fujisawa, C., Fujisawa, T.** (2004). Involvement of *Hydra achaete-scute* gene *CnASH* in the differentiation pathway of sensory neurons in the tentacles. *Development, Genes & Evolution* 214, 486-492
- Heitzler, P. & Simpson, P.** (1991). The choice of cell fate in the epidermis of *Drosophila*. *Cell* 64, 1083-1092
- Hobmayer, B., Holstein, T.W., David, C.N.** (1990). Tentacle morphogenesis in hydra, I. The role of head activator. *Development* 109, 887-895
- Holstein, T.W. and Tardent, P.** (1984). An ultrahigh-speed analysis of exocytosis: nematocyst discharge. *Science* 223, 830-833
- Holstein, T.W., Hobmayer, E., David, C.N.** (1991). Pattern of epithelial cell cycling in hydra. *Developmental Biology* 148, 602-611
- Holstein, T.W., Benoit, M., von Herder, G., Wanner, G. David, C.N., Gaub, E.H.** (1994). Fibrous mini-collagens in *Hydra* nematocytes. *Science* 223, 402-404
- Hwang, J., Ohyanagi, H., Hayakawa, S., Osato, N., Nishimiya-Fujisawa, C., Ikeo, K., David, C., Fujisawa, T., Gojobori, T.** (2007). The evolutionary emergence of cell type-specific genes inferred from the gene expression analysis of Hydra. *PNAS* 104, 14735-14740
- Ikeya, T. & Hayashi, S.** (1999). Interplay of Notch and FGF signaling restricts cell fate and MAPK activation in the *Drosophila* trachea. *Development* 126, 4455-4463
- Imai, K.S., Satou, Y., Satoh, N.** (2002). Multiple functions of a Zic-like gene in the differentiation of notochord, central nervous system and muscle in *Ciona savignyi* embryos. *Development* 129, 2723-2732
- Jacobsen, T., Brennan, K., Arias, A., Muskavitch, M.** (1998). Cis-interactions between Delta and Notch modulate neurogenic signalling in *Drosophila*. *Development* 125, 4531-4540

- Jarriault, S., Brou, C., Logeat, F., Schroeter, E.H., Kopan, R., Israel, A.** (1995). Signaling downstream of an activated mammalian Notch. *Nature* 377, 355-358
- Kageyama, R. & Nakanishi, S.** (1997). Helix-loop-helix factors in growth and differentiation of the vertebrate nervous system. *Current Opinion in Genetics & Development* 7, 659-665
- Käsbauer, T., Towb, P., Alexandrova, O., David, C.N., Dall'Armi, E., Staudigl, A., Stiening, B., Böttger, A.** (2007). The Notch signaling pathway in the cnidarian *Hydra*. *Developmental Biology* 303, 376–390
- Kimble, J.** (1981). Alteration in cell lineage following laser ablation of cells in the somatic gonade of *Caenorhabditis elegans*. *Developmental Biology* 87, 286-300
- Koch, A.W., Holstein, T.W., Mala, C., Kurz, E., Engel, J., David, C.N.** (1998). Spinalin, a new glycine- and histidine-rich protein in spines of *Hydra* nematocysts. *Journal of Cell Sciences* 111, 1545-1554
- Koizumi, O. & Bode, H.R.** (1986). Plasticity in the nervous system of adult hydra. I. The position-dependent expression of FMRFamide-like immunoreactivity. *Developmental Biology* 116, 407-421
- Koizumi, O., Wilson, J.D., Grimmelikhuijzen, C.J., Westfall, J.A.** (1989). Ultrastructural localization of RFamide-like peptides in neuronal dense-cored vesicles in the peduncle of *Hydra*. *Journal of Experimental Zoology* 249, 17-22
- Kooh, P.J., Fehon, R.G., Muskavitch, M.A.T.** (1993). Implications of dynamic patterns of Delta and Notch expression for cellular interactions during *Drosophila* development. *Development* 117, 493-507
- Kopan, R., Schroeter, E.H., Weintraub, H., Nye, J.S.** (1996). Signal transduction by activated mNotch: importance of proteolytic processing and its regulation by the extracellular domain. *PNAS* 93, 1683-1688
- Koyabu, Y., Nakata, K., Mizugishi K., Aruga, J., Mikoshiba, K.** (2001). Physical and functional interactions between Zic and Gli proteins. *Journal of Biological Chemistry* 276, 6889-6892

**Kraut, N., Snider, L., Chen, C.M., Tapscott, S., Groudine, M.** (1998). Requirement of the mouse *l-mfa* gene for placental development and skeletal patterning. *EMBO Journal* 17, 6276-6288

**Kuhlbrodt, K., Herbarth, B., Sock, E., Enderich, J., Hermans-Borgemeyer, I., Wegner, M.** (1998). Cooperative function of POU proteins and SOX proteins in glial cells. *Journal of Biological Chemistry* 273, 16050-16057

**Kunisch, M., Haenlin, M., Campos-Ortega, J.A.** (1994). Lateral inhibition mediated by the *Drosophila* neurogenic gene *Delta* is enhanced by proneural proteins. *PNAS* 91, 10139-10143

**Kurz, E.M., Holstein, T.W., Petri, B.M., Engel, J., David, C.N.** (1991). Mini-collagens in hydra nematocytes. *Journal of Cell Science* 115, 1159-1169

**Le Borgne, R. & Schweisguth, F.** (2003). Notch signaling: endocytosis makes delta signal better. *Current Biology* 13, R273-R275

**Le Borgne, R., Bardin, A., Schweisguth, F.** (2005). The roles of receptor and ligand endocytosis in regulating Notch signaling. *Development* 132, 1751-1762

**Ledent, V., Paquet, O., Vervoort, M.** (2002). Phylogenetic analysis of human basic helix-loop-helix proteins. *Genome Biology* 3 No.6

**Li, L., Krantz, I.D., Deng, Y., Genin, A., Banta, A.B., Collins, C.C., Qi, M., Trask, B.J., Kuo, W.L., Cochran, J., Costa, T., Pierpont, M.E., Rand, E.B., Piccoli, D.A., Hood, L., Spinner, N.B.** (1997). Alagille syndrome is caused by mutations in human *Jagged1*, which encodes a ligand for Notch1. *Nature Genetics* 16, 212-213

**Lindgens, D., Holstein, T.W., Technau, U.** (2004). *Hyzic*, the *Hydra* homolog of the *zic/odd-paired* gene, is involved in the early specification of the sensory nematocytes. *Development* 131, 191-201

**Lissemore, J.L. & Starmer, W.T.** (1999). Phylogenetic analysis of vertebrate and invertebrate Delta/Serrate/LAG-2 (DSL) proteins. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 11, 308-319

- Logeat, F., Bessia, C., Brou, C., LeBail, O., Jarriault, S., Seidah, N.G., Israel, A.** (1998). The Notch1 receptor is cleaved constitutively by furin-like convertase. PNAS 95, 8108-8112
- Major, R. & Irvine, K.** (2005). Influence of Notch on dorsoventral compartmentalization and actin organization in the *Drosophila* wing. Development 132, 3823-3833
- Matsuda, M. & Chtinis, A.** (2009). Interaction with Notch determines endocytosis of specific Delta ligands in zebrafish neural tissue. Development 135, 197-206
- Matsuno, K., Diederich, R.J., Go, M.J., Blaumueller, C.M., Artavanis-Tsakonas, S.** (1995). Deltex acts as a positive regulator of Notch signaling through interactions with the Notch ankyrin repeats. Development 121, 2633-2644.
- Merzdorf, C.** (2007). Emerging roles for zic genes in early development. Developmental Dynamics 236, 922-940
- Minobe, S., Koizumi, O., Sugiyama, T.** (1995). Nerve cell differentiation in nerve-free tissue of epithelial Hydra from precursor cells introduced by grafting. I. Tentacles and Hypostome. Developmental Biology 172, 170-181
- Mizugishi, K., Hatayama, M., Tohmonda, T., Ogawa, M., Inoue, T., Mikoshiba, K., Aruga, J.** (2004). Myogenic repressor I-mfa interferes with the function of Zic family proteins. Biochemical and Biophysical Research Communications 320, 233-240
- Mohr, O.L.** (1919). Character Changes Caused by Mutation of an Entire Region of a Chromosome in *Drosophila*. Genetics 4, 275-282
- Mumm, J.S., Schroeter, E.H., Saxena, M.T., Griesemer, A., Tian, X., Pan, D.J., Ray, W.J., Kopan, R.** (2000). A ligand-induced extracellular cleavage regulates  $\gamma$ -secretase-like proteolytic activation of Notch1. Molecular Cell 5, 197-206
- Münder, S., Käsbauer, T., Prexl, A., Aufschnaiter, R., Zhang, X., Towb, P., Böttger, A.** (2010). Notch signalling defines critical boundary during budding in *Hydra*. Developmental Biology, in press

**Munro, S. & Freeman, M** (2000). The Notch signalling regulator Fringe acts in the Golgi apparatus and requires the glycosyltransferase signature motif DxD. *Current Biology* 10, 813-820

**Murre, C., McCaw, P.S., Vässin, H., Caudy, M., Jan, L.Y., Jan, Y.N., Cabrera, C.V., Buskin, J.N., Hauschka, S.D., Lassar, A.B., Weintraub, H., Baltimore, D.** (1989). Interactions between heterologous helix-loop-helix proteins generate complexes that bind specifically to a common DNA sequence. *Cell* 58, 537-544

**Nichols, J.T., Miyamoto, A., Olsen, S.L., D'Souza, B., Yao, C., Weinmaster, G.** (2007). DSL ligand endocytosis physically dissociates Notch1 heterodimers before activating proteolysis can occur. *Journal of Cell Biology* 176, 445-458

**Nishida, H. & Sawada, K.** (2001). Macho-1 encodes a localized mRNA in ascidian eggs that specifies muscle fate during embryogenesis. *Nature* 409, 724-729

**Nolo, R., Abbott, L.A., Bellen, H.J.** (2000). Senseless, a Zn finger transcription factor, is necessary and sufficient for sensory organ development in *Drosophila*. *Cell* 102, 349-362

**Okajima, T., & Irvine, K.D.** (2002). Regulation of Notch signaling by O-linked fucose. *Cell* 111, 893-904

**Okajima, T., Xu, A., Irvine, K.D.** (2003). Modulation of Notch-ligand binding by protein O-fucosyltransferase 1 and fringe. *Journal of Biological Chemistry* 278, 42340-42345

**Okajima, T., Xu, A., Lei, L., Irvine, K.D.** (2005). Chaperone activity of protein O-fucosyltransferase 1 promotes notch receptor folding. *Science* 307, 1599-1603

**Otto, J.J. & Campbell, R.D.** (1977). Budding in *Hydra attenuata*: Bud stages and fate map. *Journal of Experimental Zoology* 200, 417-428

**Palmeirim, I., Henrique, D., Ish-Horowicz, D., Pourquie, O.** (1997). Avian hairy gene expression identifies a molecular clock linked to vertebrate segmentation and somitogenesis. *Cell* 91, 639-648

**Panin, V.M., Papayannopoulos, V., Wilson, R., Irvine, K.D.** (1997). Fringe modulates Notch-ligand interactions. *Nature* 387, 908-910

- Parks, A., Klueg, K.M., Stout, J.R., Muskavitch, M.A.** (2000). Ligand endocytosis drives dissociation and activation in the Notch pathway. *Development* 127, 1373-1385
- Phillips, K. & Luisi, B.** (2000). The Virtuoso of Versatility: POU proteins that flex to fit. *Journal of Molecular Biology* 302, 1023-1039
- Phillipp, I., Aufschnaiter, R., Özbek, S., Pontasch, S., Jenewein, M., Watanabe, H., Rentzsch, F., Holstein, T., Hobmayer, B.** (2009). Wnt/ $\beta$ -Catenin and noncanonical Wnt signaling interact in tissue evagination in the simple eumetazoan *Hydra*. *PNAS* 106, 4290-4295
- Pires-daSilva, A. & Sommer, R.J.** (2003). The evolution of signalling pathways in animal development. *Nature Reviews Genetics* 4, 39-49
- Poulson, D.F.** (1937). Chromosomal Deficiencies and the Embryonic Development of *Drosophila Melanogaster*. *PNAS* 23, 133-137
- Radtke, F. & Raj, K.** (2003). The role of Notch in tumorigenesis: oncogene or tumour suppressor? *Nature Reviews Cancer* 3, 756-767
- Radtke, F., Schweisguth, F., Pear, W.** (2005). The Notch 'gospel'. *EMBO reports* 6, 1120-1125
- Rebay, I., Fleming, R.J., Fehon, R.G., Chebas, L., Chebas, P., Artavanis-Tsakonas, S.** (1991). Specific EGF repeats of Notch mediate interactions with Delta and Serrate: implications for Notch as a multifunctional receptor. *Cell* 67, 687-699
- Rhyu, M.S., Jan, L.Y., Jan, Y.N.** (1994). Asymmetric distribution of Numb protein during division of the sensory organ precursor cell confers distinct fates to daughter cells. *Cell* 76, 477-491
- Ryan, A.K. & Rosenfeld, M.G.** (1997). POU domain family values: flexibility, partnerships, and developmental codes. *Genes & Development* 11, 1207-1225
- Sakamoto, K., Ohara, O., Takagi, M., Takeda, S., Katsube, K.** (2002). Intracellular cell-autonomous association of Notch and its ligands: a novel mechanism of Notch signal modification. *Developmental Biology* 241, 313-326

**Sakata, T., Sakaguchi, H., Tsuda, L., Higashitani, A., Aigaki, T., Matsuno, K., Hayaishi, S.** (2004). *Drosophila* Nedd4 regulates endocytosis of Notch and suppresses its ligand-independent activation. *Current Biology* 14, 2228-2236

**Schroeter, E.H., Kisslinger, J.A., Kopan, R.** (1998). Notch-1 signalling requires ligand-induced proteolytic release of intracellular domain. *Nature* 393, 382-386

**Schweisguth, F., Posakony, J.W.** (1994). Antagonistic activities of Suppressor of Hairless control alternative cell fates in the *Drosophila* adult epidermis. *Development* 120, 1433-1441

**Seydoux, G. & Greenwald, I.** (1989). Cell autonomy of lin-12 function in a cell fate decision in *C. elegans*. *Cell* 57, 1237-1245

**Shaye, D. & Greenwald, I.** (2005). LIN-12/Notch trafficking and regulation of DSL ligand activity during vulval induction in *Caenorhabditis elegans*. *Development* 132, 5081-5092

**Shi, S. & Stanley, P.** (2003). Protein O-fucosyltransferase 1 is an essential component of Notch signaling pathways. *PNAS* 100, 5234-5239

**Six, E., Ndiaye, D., Laâbi, Y., Brou, C., Gupta-Rossi, N., Israel, A., Logeat, F.** (2003). The Notch ligand Delta1 is sequentially cleaved by an ADAM protease and  $\gamma$ -secretase. *PNAS* 100, 7638-7643

**Slautterback, D.B. & Fawcett, D.W.** (1959). The development of the cnidoblasts of *Hydra*. An electron microscope study of cell differentiation. *Journal of Biophysical and Biochemical Cytology* 5, 441-452

**Song, W.H., Nadeau, P., Yuan, M.L., Yang, X.D., Shen, J., Yanker, B.A.** (1999). Proteolytic release and nuclear translocation of Notch-1 are induced by presenilin-1 and impaired by pathogenic presenilin-1 mutations. *PNAS* 96, 6959-6963

**Sprinzak, D., Lakhanpal, A., LeBon, L., Santat, L., Fontes, M., Anderson, G., Garcia-Ojalvo, J., Elowitz, M.** (2010). *Cis*-interactions between Notch and Delta generate mutually exclusive signalling states. *Nature* 465, 86-90

**Struhl, G. & Greenwald, I.** (1999). Presenilin is required for activity and nuclear access of Notch in *Drosophila*. *Nature* 398, 522-525

**De Strooper B, Annaert W, Cupers P, Saftig P, Craessaerts K, Mumm JS, Schroeter EH, Schrijvers V, Wolfe MS, Ray WJ, Goate A, Kopan R.** (1999). A presenilin-1-dependent gamma-secretase-like protease mediates release of Notch intracellular domain. *Nature* 398, 518-522

**Sturm, R.A. & Herr, W.** (1988). The POU domain is a bipartite DNA-binding structure. *Nature* 336, 601-604

**Sudhop, S., Coulier, F., Bieller, A., Vogt, A., Hotz, T., Hassel, M.** (2004). Signalling by the FGFR-like tyrosine kinase, Kringelchen, is essential for bud detachment in *Hydra vulgaris*. *Development* 131, 4001-4011

**Szczepanek, S., Cikala, M., David, C.N.** (2002). Poly- $\gamma$ -glutamate synthesis during formation of the nematocyst capsules in *Hydra*. *Journal of Cell Science* 115, 745-751

**Tardent, P.** (1987). *Hydra*. Veröffentlichung der Naturforschenden Gesellschaft in Zürich. Heft Nr.5

**Tax, E, Yeagers, J.J., Thomas, J.H.** (1994). Sequence of *C.elegans* lag-2 reveals a cell-signalling domain shared with Delta and Serrate of *Drosophila*. *Nature* 368, 150-154

**Varnum-Finney, B., Wu, L., Yu, M., Brashem-Stein, C., Staats, S., Flowers, D., Griffin, J.D., Bernstein, I.D.** (2000). Immobilization of Notch ligand, Delta-1, is required for induction of notch signaling. *Journal of Cell Science* 113, 4313-4318

**Verrijzer, C.P. & Van der Vliet, P.C.** (1993). POU domain transcription factors. *Biochimica et Biophysica Acta* 1173, 1-21

**Villares, R. & Cabrera, C.V.** (1987). The *achaete-scute* gene complex of *D. melanogaster*: conserved domains in a subset of genes required for neurogenesis and their homology to *myc*. *Cell* 50, 415-424

**Wang, S., Sdrulla, A.D., diSibio, G., Bush, G., Nofziger, D., Hicks, D., Weinmaster G., Barres, B.** (1998). Notch receptor activation inhibits oligodendrocyte differentiation. *Neuron* 21, 63-75

**Wang, W. & Struhl, G.** (2004). *Drosophila* Epsin mediates a select endocytic pathway that DSL ligands must enter to activate Notch. *Development* 131, 5367-5380

**Weber, J.** (1990). Poly( $\gamma$ -glutamic acid)s are the major constituents of nematocysts in *Hydra* (Hydrozoa, Cnidaria). *Journal of Biological Chemistry* 265, 9664-9669

**Wendland, B.** (2002). Epsins: adaptors in endocytosis? *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 3, 971-977

**Wittlieb, J., Khalturin, K., Lohmann, J., Anton-Erxleben, F., Bosch, T.** (2006). Transgenic *Hydra* allow *in vivo* tracking of individual stem cells during morphogenesis. *PNAS* 103, 6208-6211

**Wolfe, M.S.** (2006). The  $\gamma$ -secretase complex: membrane-embedded proteolytic ensemble. *Biochemistry* 45, 7931-7939



## 8 Abkürzungen

AC	anchor cell	DEPC	Diethylpyrocarbonat
ADAM	a disintegrin and metallopeptidase	DIG	Digoxygenin
AP	Alkalische Phosphatase	DMEM	Dulbeccos minimal essential medium
APS	Ammoniumpersulfat	DMSO	Dimethylsulfoxid
AS-C	Achaete-Scute Complex	dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
BCIP	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl Phosphate	DSL	Delta, Serrate, Lag-2
bHLH	basischer Helix-loop-Helix Transkriptionsfaktor	DTT	Dithiothreitol
BSA	Bovine Serum Albumin	EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
cDNA	copy DNA	EGTA	Ethylendioxy-bis-(ethylenitrilo)-tetraessigsäure
CHAPS	3-((3-Chloramidopropyl)-1-dimethyl-ammonio)-1-propansulfonat	EST	Expressed Sequence Tag
CnASH	Cnidarian Achaete-Scute Homolog	FITC	Fluoresceinisothiocyanat
CSL	CBF1, Su(H), Lag-1	FKS	Fötales Kälberserum
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol	HES	hairy / Enhancer of Split
DAPT	N-[N-(3,5-Difluorphenacetyl)-L-alanyl]-S-phenylglycine-t-butyl ester	HyDkk	<i>Hydra</i> Dickkopf
		HyLiAS	<i>Hydra</i> Like Achaete/Scute
		HyZic	<i>Hydra</i> Zic
		I-mfa	Inhibitor of MyoD family
		IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
		kD	Kilo-Dalton

LNR	Lin-12 Notch Repeat	PEI	Polyethylenimin
MMP	Matrix Metalloprotease	POU	Pit-1, Oct-1, Oct-2, Unc-86
MOPS	3-[N-morpholino] propansulfonat	Rpm	rounds per minute
NBT	Nitro Blue Tetrazolium	SDS	Natriumdodecylsulfat
NICD	Notch intracellular domain	SOP	sensory organ precursor
Nowa	Nematocyst outer wall antigen	TACE	Tumor-necrosis factor- $\alpha$ converting enzyme
OD	optische Dichte	TEMED	Tetramethylethylendiamin
O-Fut	O-Fucosyltransferase	VU	ventral uterine
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>	VWC	von Willebrand Typ C
PBS	Phosphate buffered saline		

## Danksagung

Zunächst möchte ich Jörg Wittlieb von der Christian-Albrechts-Universität Kiel dafür danken, dass er mir die transgenen Hydren, die GFP in den ekto- bzw. endodermalen Epithelzellen exprimieren, zukommen lies. Auch Professor Dr. Monika Hassel von der Philipps-Universität Marburg möchte ich danken für die Bereitstellung des *kringelchen*-Klons., sowie Dr. med. Elisabeth Kremmer für die Herstellung der monoklonalen Antikörper.

Weiterhin gilt mein besonderer Dank Angelika Böttger und Charles David, die mich bereits seit meiner Diplomarbeit unterstützen und fördern. In ihrem Labor herrschte stets eine sehr angenehme Arbeitsatmosphäre, bei dem die Forschung immer Spaß gemacht hat, so dass man gerne Neues erlernt, ausprobiert und anwendet, um dadurch mehr Selbstsicherheit zu erlangen.

Besonders wichtig für diese tolle Atmosphäre sind natürlich die zahlreichen Mitarbeiter, die ich während meiner Diplomarbeit und Promotion miterleben durfte. Vor allem Alexander Wolf, Christina Grimm, Astrid Heim, Erika Klement, Margherita Lasi und Sandra Münder haben mich während wichtiger Phasen der Doktorarbeit begleitet.

Meine lieben Freundinnen Michaela Grunert, Irene Hasler, Elisabeth Kuhn, Margherita Lasi und Sandra Münder, die immer zum Mitzittern, Händchen-Halten und Feiern für mich da waren, haben meine Promotion außerdem erheblich erleichtert.

Schließlich möchte ich mich ganz herzlich bei meiner Familie bedanken, die ebenfalls in allen Situationen mit mir mitgefiebert haben. Sie haben sich immer für meine Forschung interessiert, sich nach meiner Verfassung erkundigt und mir vor allem ein Leben außerhalb des Labors gezeigt.

Mein größter Dank gilt meinem Mann, Alexander Prexl. Er hat mich immer unterstützt und mir den notwendigen Freiraum gegeben, um meine Forschung voranzubringen. Vor allem aber hat er mir immer zugehört und mich immer ertragen.



## Publikationen

Münder, S., Käsbauer, T., **Prexl, A.**, Aufschnaiter, R., Zhang, X., Towb, P., Böttger, A. (2010). Notch signalling defines critical boundary during budding in *Hydra*. *Developmental Biology*, in press

Käsbauer, T., Towb, P., Alexandrova, O., David, C.N., Dall'Armi, E., **Staudigl, A.**, Stiening, B., Böttger, A. (2007). The Notch signaling pathway in the cnidarian *Hydra*. *Developmental Biology* 303, 376–390



# Lebenslauf

## ***Persönliche Daten***

Name: Andrea Prexl geb. Staudigl  
Geburtsdatum / -ort: 23.07.1983 in München  
Familienstand: verheiratet

## ***Ausbildung***

1989-1993 Grundschole, Oregon Episcopal School,  
Portland, OR USA  
1993-1998 Aventinus Gymnasium Burghausen  
1998-1999 Collège du Sacre-Coeur Écully, Lyon  
Frankreich  
1999-2002 Aventinus Gymnasium Burghausen  
2002 Abiturabschluss  
2002-2006 Biologie-Studium an der Ludwig-Maximilians-Universität,  
München (Hauptfach: Zellbiologie, Nebenfächer: Genetik,  
Biochemie)  
Dez.2005-Sep.2006 Diplomarbeit an der Ludwig-Maximilians-Universität,  
München, Abteilung Zell- und Entwicklungsbiologie  
2006 Biologie Diplomabschluss  
2006-2010 Doktorarbeit an der Fakultät für Biologie, Ludwig-  
Maximilians-Universität, München, Abteilung Zell- und  
Entwicklungsbiologie (Prof. Dr. Angelika Böttger)