

**Über die Bildung von Körperanhängen bei
Platynereis dumerilii und die Homologie
molekularer Entwicklungsmechanismen
innerhalb der Bilateria**

**On the formation of body appendages in *Platynereis
dumerilii* and the homology of molecular
development mechanisms across bilateria**

Dissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades in den Naturwissenschaften
(Doctor rerum naturalium, Dr. rer. nat.)
am Fachbereich 08 – Biologie und Chemie
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von
Jan Grimmel
geboren in Lübeck

Gießen, 23.08.2016

Dekan: Prof. Dr. Volker Wissemann

Promotionsausschussvorsitzender: Prof. Dr. Bernhard Spengler

Erster Gutachter: Prof. Dr. Adriaan W.C. Dorresteyn

Zweite Gutachterin: Prof. Dr. Tina E. Trenczek

Teile der vorliegenden Arbeit wurden in der folgenden Originalpublikation veröffentlicht:

Grimmel J, Dorresteijn AWC, Fröbius AC (2016) "Formation of body appendages during caudal regeneration in *Platynereis dumerilii*: adaptation of conserved molecular toolsets." *Evodevo* 7:10.

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung	1
1.1. Summary	2
2. Einleitung	3
2.1. Zielsetzung	7
3. Material & Methoden	8
3.1. Verbrauchsmaterialien und Geräte	8
3.1.1. Chemikalien	8
3.1.2. Lösungen und Puffer	9
3.1.3. Kultur- und Nährmedien	13
3.1.4. Antikörper und Kits	14
3.1.5. Verwendete Primersequenzen	14
3.1.6. Geräte und Software	16
3.2. Tiermaterial	17
3.2.1. Haltung	17
3.2.2. Fixierung von Larven für die <i>in situ</i> -Hybridisierung	17
3.2.3. Herstellung und Fixierung von Regeneraten für die <i>in situ</i> -Hybridisierung	18
3.3. Isolation der Gene	19
3.3.1. RNA Isolation	19
3.3.2. Bestimmung der RNA-Konzentration	19
3.3.3. Reverse Transkription	20
3.3.4. PCR	20
3.3.5. Agarose-Gelelektrophorese	21
3.3.6. Schneiden und Aufreinigen der DNA aus dem Agarose-Gel	22
3.3.7. Ligation	22
3.3.8. Transformation	22
3.3.9. Klon-Check-PCR	23

3.3.10. Plasmid-Präp	24
3.3.11. RACE-PCR	24
3.3.12. Semi nested PCR der RACE-Fragmente	26
3.4. Herstellung der Sonden für die <i>in situ</i> -Hybridisierung	27
3.4.1. Template-Erstellung für Sondensynthese	27
3.4.2. Sondensynthese	28
3.5. <i>Whole mount in situ</i> -Hybridisierung	29
3.5.1. Vorbehandlung	29
3.5.2. Prähybridisierung	29
3.5.3. Hybridisierung	30
3.5.4. Posthybridisierung	30
3.5.5. Visualisierung der Sonden	31
4. Ergebnisse	32
4.1. Verlauf der posterioren Regeneration bei <i>Platynereis dumerilii</i>	32
4.2. Vergleich eines larvalen und eines adulten Parapodiums bei <i>Platynereis dumerilii</i>	34
4.3. <i>Pdu-dac</i> Expression	36
4.4. <i>Pdu-Dll</i> Expression	41
4.5. <i>Pdu-dpp</i> Expression	46
4.6. <i>Pdu-exd</i> Expression	51
4.7. <i>Pdu-hth</i> Expression	56
4.8. <i>Pdu-sp/btd</i> Expression	61
5. Diskussion	66
6. Literaturverzeichnis	76
7. Versicherung	83
8. Danksagung	84
9. Appendix	85

1. Zusammenfassung

Bei der Bildung von Körperanhängen wirkt ein umfangreiches Set von Genen zusammen. Durch Kombinationen und Wechselwirkungen dieser Gene können viele verschiedene Arten von Körperanhängen mit unterschiedlichsten Funktionen entwickelt werden. Je nachdem, welche Taxa beziehungsweise welche Arten von Körperanhängen miteinander verglichen werden, weisen die molekularen Mechanismen, die den Bildungsprozessen zugrunde liegen, teilweise starke Gemeinsamkeiten, aber auch erhebliche Unterschiede auf. Der überwiegende Teil der bisher zur Bildung von Körperanhängen veröffentlichten Forschungsergebnisse beruht auf Daten zu Arthropoden und Vertebraten. Vor allem Arthropoden sind interessante Forschungsobjekte, da sie eine Vielzahl unterschiedlicher Körperanhänge ausbilden.

Im Rahmen dieser Arbeit werden sechs Gene von *Platynereis dumerilii*, einem Vertreter der Anneliden, isoliert, deren Funktion innerhalb dieses Prozesses bei Arthropoden und Vertebraten unbestritten ist. Dabei handelt es sich um *Pdu-dac* (*dachshund*), *Pdu-Dll* (*Distal-less*), *Pdu-dpp* (*decapentaplegic*), *Pdu-exd* (*extradenticle*), *Pdu-hth* (*homothorax*) und *Pdu-sp/btd* (*specific protein 1/buttonhead*). Alle isolierten Gene weisen Expression in den sich entwickelnden Parapodien von *Platynereis dumerilii* auf. Diese kann sowohl während der Larvalentwicklung als auch während der caudalen Regeneration beobachtet werden. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die sechs Gene auch an der Bildung von Körperanhängen bei *Platynereis dumerilii* beteiligt sind und dabei sowohl Ähnlichkeiten als auch Unterschiede im Vergleich zu der Bildung von Körperanhängen bei Arthropoden und Vertebraten sichtbar werden.

1.1. Summary

A large set of genes interacts in appendage development. Many types of appendages with variable functions can be developed by combining and through interactions of these genes. Depending on the taxa or the kind of appendage which are compared with, the molecular mechanisms possess strong similarities as well as remarkable differences. Most findings concerning appendage development is based on data of arthropods and vertebrates. Especially arthropods are very interesting research objects, because they develop a various number of different appendages.

In this thesis six genes, which have an indisputable function within appendage formation in arthropods and vertebrates, are isolated from *Platynereis dumerilii*, an annelid representative. These genes are *Pdu-dac* (*dachshund*), *Pdu-Dll* (*Distal-less*), *Pdu-dpp* (*decapentaplegic*), *Pdu-exd* (*extradenticle*), *Pdu-hth* (*homothorax*) and *Pdu-sp/btd* (*specific protein 1/buttonhead*). All isolated genes are expressed in the developing parapodia of *Platynereis dumerilii*. This expression can be detected during larval development as well as during caudal regeneration. The results of this thesis show, that all six genes are involved in appendage development in *Platynereis dumerilii* and both, similarities and differences can be observed compared to arthropod and vertebrate appendage formation.

2. Einleitung

Die Bildung von Körperanhängen ist ein komplizierter, aber sehr interessanter Prozess, bei dem eine Vielzahl von Genen zusammenspielen, um unterschiedlichste Arten von Körperanhängen zu bilden. Dazu gehören beispielsweise Beine zur Fortbewegung, Antennen zur sensorischen Wahrnehmung oder auch Strukturen zur Verteidigung und Nahrungsaufnahme. Dieser Prozess ist bis heute besonders bei Arthropoden, aber auch teilweise bei Vertebraten umfangreich erforscht (Angelini und Kaufman 2005, Pueyo und Couso 2005).

Distal-less (Dll), eines der am besten erforschten regulativen Gene für Entwicklungsprozesse, wird bei Arthropoden in frühen Stadien der Bildung von Körperanhängen zunächst in einem eher großflächigen Bereich exprimiert. Im weiteren Verlauf der Entwicklung wird die Expression, mit Ausnahme einer schmalen, proximal gelegenen ringförmigen Domäne, auf den distalen Bereich beschränkt (Abu-Shaar und Mann 1998, Schoppmeier und Damen 2001, Abzhanov und Kaufman 2000, Prpic und Tautz 2003, Jockusch et al. 2000, Inoue et al. 2002, Rogers et al. 2002, Beermann et al. 2001, González-Crespo und Morata 1996). Die proximalen Bereiche sind durch die Expression von *homothorax (hth)* und *extradenticle (exd)* geprägt. Diese beiden Gene werden häufig co-exprimiert, da sich deren Proteine *in-vivo* gegenseitig stabilisieren, HTH den Transport von EXD in den Zellkern regelt und die Bindefähigkeit an die DNA als HTH-EXD-Komplex erhöht (Jaw et al. 2000, Rieckhof et al 1997). Bezüglich dieser beiden Gene ist noch ein Phänomen bekannt, das bereits von Prpic et al. (2003) beobachtet wurde. Bei den nicht zu den Insekten gehörenden Arthropoden zeigt sich, dass *hth* deutlich stärker in distaler Richtung exprimiert wird als *exd*. Bei *exd* kann, wenn überhaupt, lediglich eine stark begrenzte, ringförmige Expressionsdomäne distal der Hauptexpression beobachtet werden (Abzhanov und Kaufman 2000, Prpic et al. 2003, Prpic und Tautz 2003). Die *hth*-Expression in *Cupiennius salei* ist sogar fast im kompletten Körperanhang, mit Ausnahme der distalen Spitze, zu finden (Prpic et al. 2003). Insekten zeigen ein ähnliches Bild, jedoch ist das Expressionsmuster der beiden Gene vertauscht. Hier wird *exd* im gesamten Körperanhang, inklusive der distalen Spitze, exprimiert, während sich die Expression von *hth* auf die proximalen

Bereiche mit einer bei einigen Taxa auftretenden ringförmigen Domäne distal der Hauptexpression beschränkt (Jockusch et al. 2000, Inoue et al. 2002, Prpic et al. 2003, Rauskolb et al. 1995, Rieckhof et al. 1997). Dieses Phänomen wird von Prpic et al. (2003) als evolutionäre Verschiebung („evolutionary shift“) bezeichnet. Eine Ausnahme davon scheint das Taxon der *Acheta* zu sein. Obwohl es zu den Insekten gehört, ist die *exd*-Expression nach aktuellen Erkenntnissen nicht, wie bei den anderen Insekten, im gesamten Körperanhang wiederzufinden (Abzhanov und Kaufman 2000).

Dachshund (*dac*) ist für die Bildung einer intermediären Domäne zwischen der proximalen und distalen Region zuständig (Abzhanov und Kaufman 2000, Angelini und Kaufman 2004, Inoue et al. 2002, Mardon et al. 1994, Prpic 2001, Prpic et al 2003, Prpic und Tautz 2003).

Für die Expression von *Dll* werden in *Drosophila* zwei weitere Gene benötigt: *buttonhead* (*btd*) und *specific protein 1* (*sp1*) (Estella et al. 2003). Allerdings wurde diese Aussage nach einiger Zeit verändert und präzisiert. Während der frühen Entwicklungsphase der Beine von *Drosophila* wird *sp1* eine deutlich stärker regulierende Rolle als *btd* zugeschrieben. In der späteren Entwicklung werden jedoch beide Gene gleichermaßen benötigt (Estella und Mann 2010).

Decapentaplegic (*dpp*) zeigt im Gegensatz zu den zuvor beschriebenen Genen bei Arthropoden kein einheitliches Expressionsmuster. Das führt zu der Annahme, dass seine Funktion nicht konserviert ist (Abu-Shaar und Mann 1998, Angelini und Kaufman 2005 [2], Jockusch et al. 2000, Niwa et al. 2000, Prpic et al. 2003, Prpic 2004, Sanchez-Salazar et al. 1996).

Die Bildung der Extremitäten bei den Vertebraten unterscheidet sich grundlegend von der bei Arthropoden. Vertebraten bilden ihre Extremitäten aus mesodermalem Gewebe (Tickle 2003), wohingegen die der Arthropoden aus epidermalemem Gewebe entstehen (Kojima 2004). Zwei spezielle Bereiche wurden bei Vertebraten beschrieben, die eine tragende organisatorische Rolle bei der Entwicklung der Extremitäten spielen. Zum einen die „apical ectodermal ridge“ (AER) und zum anderen die „zone of polarizing activity“ (ZPA). Zwischen diesen beiden Regionen gibt es so genannte „positive Feedback“-Interaktionen, die für die Entwicklung der Extremitäten von Vertebraten eine große Bedeutung haben. Bei Arthropoden existieren keine vergleichbaren Mechanismen (Tickle

2003). Daneben gibt es noch weitere Unterschiede in Bezug auf die Anzahl und Anordnung von Extremitätenelementen, die Position der muskulären und skeletalen Strukturen und deren Innervation. Diese Unterschiede können als apomorphe Merkmale verstanden werden.

Entgegen all dieser Unterschiede bestehen auch eindeutige Gemeinsamkeiten bei der Bildung von Extremitäten bei Arthropoden und Vertebraten. Die homologen Gene von *Dll* werden bei den Vertebraten in der *Dlx*-Genfamilie zusammengefasst. Diese sind zu Beginn der Entwicklung im Ektoderm der Extremitätenknospe zu finden und verlagern sich in deren Verlauf in die AER, den distalen Randbereich der Extremität (Panganiban et al. 1997). *Meis*, das homologe Gen zu *hth*, wird in den distalen Bereichen der Extremitäten verdrängt und ist dann ausschließlich in den proximalen Bereichen zu finden (Capdevila et al. 1999, Mercader et al. 2000). Des Weiteren wird *Pbx*, das homologe Gen zu *exd*, mit *Meis* in den proximalen Bereichen co-exprimiert und die beiden Proteine MEIS und PBX formen, wie HTH und EXD, ein stabiles Heterodimer (Capdevila et al. 1999). Die beiden Gene *sp8* und *sp9* sind homolog zu *btd* und *sp1*, ihren Vertretern bei den Arthropoden (Estella und Mann 2010, Kawakami et al. 2004). Zu Beginn der Entwicklung werden *sp8* und *sp9* im Ektoderm der Extremitäten von Vertebraten exprimiert, verlagern sich im Verlauf jedoch komplett in die AER, wo sie die Regulation der *Fgf8*-Expression übernehmen. *Fgf8* wird wiederum für die Expression von *Dlx* in den distalen Bereichen der Extremitäten benötigt (Kawakami et al. 2004). *Dach1*, das homologe Gen zu *dac*, ist bei Vertebraten zu Beginn der Entwicklung im mittleren und distalen Mesenchym und der AER, nicht jedoch in der posterior-distalen Region nachzuweisen. In späteren Stadien ist *Dach1* im gesamten Mesenchym einschließlich der AER zu finden (Kida et al. 2004).

Lange Zeit galt die Gruppe der Articulata, die sowohl die Anneliden als auch die Arthropoden umfasste, aufgrund von morphologischen Ergebnissen als gesetzt. Erst durch neuere molekulare Daten wurden diese beiden Gruppen systematisch getrennt. Dabei wurden die Tentakulata mit den Trochozoen, zu denen auch die Anneliden gehören, zusammengeschlossen. Sie bilden nun die Gruppe der Lophotrochozoa. Die Arthropoden und die Cycloneuralia bilden seitdem die neue Gruppe der Ecdysozoa. Diese Systematik ist durch die Betrachtung morphologischer Charakteristika nur sehr schwer nachvollziehbar.

Sie gründet voll und ganz auf den molekular erhobenen Daten (Aguinaldo et al. 1997, Halanych 2004). Abseits dieser Diskussion gilt *Platynereis dumerilii* mit seiner homonomen Segmentierung als eine der ursprünglichsten Formen innerhalb der Bilateria. In seiner Kopfregion befinden sich das Prostomium, das Peristomium und einige zu Kopfsegmenten umgewandelte Körpersegmente, die unterschiedlichste Arten von Körperanhängen, wie zum Beispiel Antennen, Cirren und Palpen, tragen. Am Rumpf, der eine Vielzahl von nahezu identischen Segmenten umfassen kann, sind beidseitig paddelartige Körperanhänge zu finden, die Parapodien genannt werden, und zur Fortbewegung dienen. Am Hinterende befinden sich die posteriore Wachstumszone, an der neue Segmente gebildet werden, und das Pygidium mit dem Anus und den Analcirren. Eine weitere Besonderheit bei den Anneliden ist die umfangreiche Fähigkeit zur Regeneration (Hauenschild und Fischer 1969). Bei einer Verletzung oder dem Verlust von ganzen Körpersegmenten setzt zunächst die Wundheilung ein. Darauf folgen Prozesse wie Gewebeumbau, Dedifferenzierung von Geweben und die Aktivierung sowie die Vermehrung von Stammzellen (Abb. 1). Diese Prozesse können einzeln oder in beliebiger Kombination vorkommen und führen schließlich zur Determination und Differenzierung in das finale Gewebe (Alvarado und Tsonis 2006).

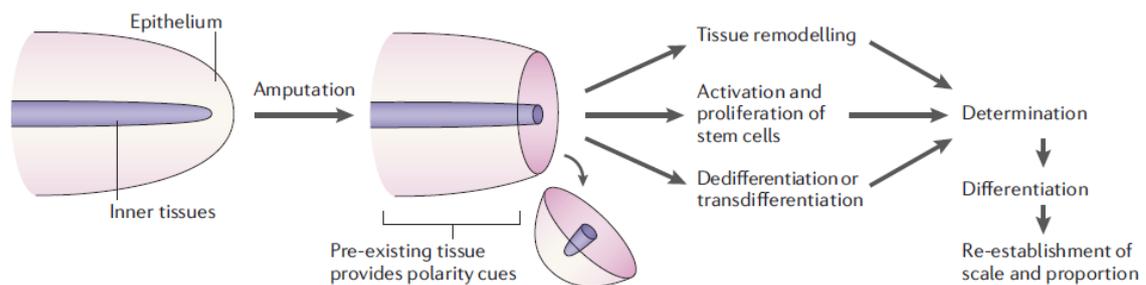


Abbildung 1: Grundlegender Ablauf der Regeneration (Alvarado und Tsonis 2006)

Die Fähigkeit zur Regeneration ist jedoch nicht bei allen Anneliden gleich ausgeprägt. Einige Arten sind in der Lage, sowohl anteriore als auch posteriore Segmente zu regenerieren. Andere Arten wie auch *Platynereis dumerilii* können nur posterior verloren gegangene Segmente ersetzen (Bely 2006). Durch die ursprüngliche Form innerhalb der Bilateria, das Vorhandensein der Parapodien und die Fähigkeit zur caudalen Regeneration wird *Platynereis* zu einem

interessanten Versuchstier für Untersuchungen über die Bildung von Körperanhängen. Sowohl bei der larvalen Entwicklung als auch bei der Regeneration kann die Bildung der Körperanhänge innerhalb von wenigen Tagen studiert werden. Bei den Regeneraten ist durch die unterschiedlichen Entwicklungsstufen der Segmente in einem Regenerat sogar der zeitliche Ablauf der Genexpression bis zu einem gewissen Grad nachvollziehbar.

2.1. Zielsetzung

Für diese Arbeit werden sechs Gene von *Platynereis dumerilii* isoliert, die in die Entwicklungsvorgänge bei der Entstehung von Körperanhängen bei Arthropoden und Vertebraten involviert sind. Bei den Genen handelt es sich um: *dachshund* (*Pdu-dac*), *Distal-less* (*Pdu-Dll*), *decapentaplegic* (*Pdu-dpp*), *extradenticle* (*Pdu-exd*), *homothorax* (*Pdu-hth*) und *specific protein 1/buttonhead* (*Pdu-sp/btd*). Es werden sowohl Larven als auch caudale Regenerate hinsichtlich der Expression der einzelnen Gene untersucht, um ein breiteres Ergebnisspektrum zu erhalten. Die Arbeit hat nicht das explizite Ziel, die aktuell gültige Systematik in Frage zu stellen. Es soll lediglich eine der ursprünglichsten Formen der Bilateria, die mit den Parapodien eine annähernd vergleichbare Art von Körperanhängen tragen, hinsichtlich der Expression von Genen untersucht werden, die für die Entwicklung solcher Körperanhänge bei anderen Taxa mitverantwortlich sind.

3. Material & Methoden

3.1. Verbrauchsmaterialien und Geräte

3.1.1. Chemikalien

Agar-Agar	Roth
Agarose	Roth
Ampicillin-Natriumsalz	Roth
5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat (BCIP)	AppliChem/Roth
Bromphenolblau	Roth
Blocking-Reagenz	Roche
Rinderalbumin (BSA)	AppliChem/Serva
DEPC	Roth
Dimethylformamid (DMF)	Roth/Serva
Essigsäureanhydrid	Roth
Ethanol	Roth
Ethidiumbromid	Roth
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Serva
Ethylendiamintetraacetat-Dinatriumsalz-Dihydrat ($\text{Na}_2\text{EDTA}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	VWR Chemicals
Formaldehyd	Roth
Formamid	Roth
Glycin	Roth
Glycerol	Roth
Hefeextrakt	Roth
Heparin-Natriumsalz	Roth
Lachssperma DNA	AppliChem
Magnesiumchlorid-Hexhydrat	Roth

Meersalz (Tropic Marin®)	aQua united GmbH
Methanol	Roth
Mercaptoethanol	Roth
Natriumchlorid	Roth
Nitroblau-Tetrazoliumchlorid (NBT)	AppliChem/Roth
Pepton/Trypton	Roth
Proteinase K	Roth
Natriumdodecylsulfat (SDS)	AppliChem/Roth
20x SSC	Eppendorf
Triethanolamin	Roth
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Roth
Triton X100	Roth
Tween-20	Sigma Aldrich

3.1.2. Lösungen und Puffer

Ampicillin-Stammlösung	100 mg/ml in ddH ₂ O
AP-Puffer	100 mM NaCl 50 mM MgCl ₂ 100 mM Tris (pH 9,5) 0,5% Tween-20 in ddH ₂ O
AP-Park-Puffer	100 mM NaCl 100 mM Tris-HCl (pH 8) 0,5% Tween-20 in ddH ₂ O
AP-Stop-Puffer	20 mM Tris-HCl (pH 8) 5 mM EDTA 0,1% Tween-20 in ddH ₂ O

AP-Substratlösung	0,5 µl/ml NBT 3,5 µl/ml BCIP in AP-Puffer
BCIP-Stammlösung	50 mg/ml in DMF
Blockingpuffer	1x Maleinsäure-Puffer 1x Blocking-Reagenz in ddH ₂ O
10x Blocking-Reagenz	0,1 g/ml Blocking-Reagenz 1x Maleinsäure-Puffer in ddH ₂ O
5% BSA	1:20 BSA in ddH ₂ O
DEPC-H ₂ O	1 µl/ml DEPC in ddH ₂ O, über Nacht rühren, autoklavieren
10x DNA Ladepuffer	7,58 mg/ml Bromphenolblau 33% 150 mM Tris (pH 7,6) 60% Glycerol in ddH ₂ O
0,5 M EDTA	500 mM EDTA in DEPC-H ₂ O
3,7% Formaldehyd	1:10 37% Formaldehyd in PTw bzw. PBS (pH 9,6)
80% Glycerol	8 Teile Glycerol 1 Teil 10x PBS (pH 7,4) 1 Teil ddH ₂ O
Glycin-Stammlösung	40 mg/ml in DEPC-H ₂ O
Glycin-Verbrauchslösung	2 mg/ml in PTw
Heparin-Stammlösung	20 mg/ml in DEPC-H ₂ O

Hybridisierungspuffer (Hybe)	50% Formamid 5x SSC (pH 4,5) 50 µg/ml Heparin 0,1% Tween-20 1% SDS 50 µg/ml Lachssperma DNA (10 min auf 100°C + 2 min auf Eis) in DEPC-H ₂ O
Lachssperma DNA	10 mg/ml in DEPC-H ₂ O
1 M Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	1 M MgCl ₂ in ddH ₂ O
7,5% Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	16,01 g MgCl ₂ ·6H ₂ O pro 100 ml ddH ₂ O
10x Maleinsäure-Puffer	100 mM Maleinsäure 150 mM NaCl in ddH ₂ O auf pH 7,5 einstellen
Methanolreihe	60% Methanol / 40% PTw 30% Methanol / 70% PTw
0,5 M Na ₂ EDTA	500 mM Na ₂ EDTA in DEPC-H ₂ O auf pH 8,0 einstellen
1 M Natriumchlorid (NaCl)	1 M NaCl in ddH ₂ O
NBT-Stammlösung	75 mg/ml NBT 70% DMF in ddH ₂ O

10x PBS	18,6 mM NaH ₂ PO ₄ 84,1 mM Na ₂ HPO ₄ Phosphate mischen, auf pH 7,4 einstellen 1750 mM NaCl in ddH ₂ O mit DEPC (1 µl/ml) behandeln
PBT	1x PBS (pH 7,4) 0,1% BSA 0,2% Triton X100 in ddH ₂ O
Posthybridisierungslösungen	75% Hybe / 25% 2x SSC 50% Hybe / 50% 2x SSC 25% Hybe / 75% 2x SSC 75% 0,05x SSC / 25% PTw 50% 0,05x SSC / 50% PTw 25% 0,05x SSC / 75% PTw
Proteinase K-Stammlösung	20 mg/ml in DEPC-H ₂ O
Proteinase K-Verbrauchslösung	0,01 mg/ml in PTw
PTw	1x PBS (pH 7,4) 0,1% Tween-20 in DEPC-H ₂ O
10% SDS	1:10 SDS in DEPC-H ₂ O zum Lösen auf 68°C erhitzen, dann auf pH 7,2 einstellen
0,05x SSC	1:400 20x SSC in DEPC-H ₂ O
2x SSC	1:10 20x SSC in DEPC-H ₂ O

50x TAE	2 M Tris 50 mM Na ₂ EDTA 5,71% Eisessigsäure in dH ₂ O
TE-Puffer	10 mM Tris 1 mM Na ₂ EDTA in DEPC-H ₂ O
1% Triethanolamin	1:100 Triethanolamin in PTw
1 M Tris-HCl	1 M Tris in ddH ₂ O pH einstellen (32% HCl-Lösung)
20% Tween-20	1:5 Tween-20 in DEPC-H ₂ O

3.1.3. Kultur- und Nährmedien

KSW	Wasser mit Meersalz (Tropic Marin®) versetzt
GSW	1:1 Gemisch aus NSW + KSW
NSW	natürliches Seewasser aus der Nordsee
LB _{amp} -Platten (ca. 20 Platten)	500 ml LB-Medium 7,5g Agar-Agar autoklavieren auf ca. 50°C abkühlen lassen 100 µg Ampicillin pro ml Medium
LB-Medium (500 ml)	5 g Pepton/Trypton 2,5 g Hefeextrakt 5 g NaCl in dH ₂ O auf pH 7,0 einstellen
SOC-Medium	New England Biolabs (NEB)

3.1.4. Antikörper und Kits

α -Digoxegenin-AP Fab fragmente (1:5000)	Roche
dNTP-Polimerisations-Mix	GeneCraft
Fast Plasmid Mini Kit	5Prime
MinElute Gel Extraction Kit	Qiagen
Megascript Sp6 Kit	Ambion/ThermoFisher Scientific
Megascript T7 Kit	Ambion/ThermoFisher Scientific
pGEM-T _{easy} Vektor System I Kit	Promega
RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit	Fermentas
RNeasy Mini Kit	Qiagen
SMART RACE cDNA Amplification Kit	Clontech/Takara Bio
Taq Polymerase/Standard Taq-Puffer	New England Biolabs (NEB)

3.1.5. Verwendete Primersequenzen

Standard Primersequenzen:

dpp_Fw1: 5'-CGA ACA AGC AGT CCA GGC TAA C-3'
dpp_Fw2: 5'-ACC ACC ACC AGA AGC ACA AGA G-3'
dpp_Rev1: 5'-CAA TGA CCG TCG TAA TCG CAC-3'
dpp_Rev2: 5'-AGC CTC AGG GTT CAC AGA ATG C-3'
dac_Fw1: 5'-ATC TCA ACC ACG ACC TCC AG-3'
dac_Fw2: 5'-AAT GAT CGA CTA CCG AGG GG-3'
dac_Rev1: 5'-TAG TGG TAG CCA TTG CCG AA-3'
dac_Rev2: 5'-CAG CTT CTC GAT TGT CTC CG-3'

degenerierte Primersequenzen:

sp/btd-Fw1: 5'-TGY CAY GTN CCN GGN TGY-3'
sp/btd-Fw2: 5'-GGN AAR GTN TAY GGN AAR AC-3'
sp/btd-Rev1: 5'-RTG NGT YTT NAC RTG YTT-3'

sp/btd-Rev2: 5'-RCA NGC RAA NCK YTT YTC-3'

hth/meis-Fw1: 5'-TTY GAR AAR TGY GAR YTN GC-3'

hth/meis-Fw2: 5'-GAR YTN TGY GAY AAY TTY TGY CAY-3'

hth/meis-Rev1: 5'-NGC RTT DAT RAA CAA RTT RTT-3'

hth/meis-Rev2: 5'-NAR RTC DAT NGG CAT YTT NCC-3'

exd/Pbx-Fw1: 5'-TGY GAR ATH AAR GAR AAR AC-3'

exd/Pbx-Fw2: 5'-GAR AAR TAY GAR CAR GCN TGY-3'

exd/Pbx-Rev1: 5'-DAT CAT NAC NGC YTC RCA NGT-3'

exd/Pbx-Rev2: 5'-YTT NCC DAT RTT YTT YTT RTA-3'

RACE Primersequenzen:

sp_3'out: 5'-GCG AAT CTC TTC TCT CCT GTG TGG GTT CG-3'

sp_3'in: 5'-TGC AGT TCG TCC GAG CGG GTA AAT CTC-3'

sp_5'out: 5'-TTT GCG CTG GCA CAC GGG TGA AC-3'

sp_5'in: 5'-TCG GAC GAA CTG CAG CGC CAT CTA C-3'

hth_5'out: 5'-GAG ACG GCG GTT CGA CAC CCA-3'

hth_5'in: 5'-GCC AAC GGC AGT GAT ACC GGT CC-3'

hth_3'out: 5'-CTG ATG GGT ATG GAT GCG AGA GAT GTT GGA-3'

hth_3'in: 5'-GCT GCT TTC CGA GTC CTC GTC GGC-3'

exd_5'out: 5'-TCA GAG GTG CAC AAG AAG AGG AGC CC-3'

exd_5'in: 5'-CCG CAG TTG ATG CGA CTG GAC AAC ATG-3'

exd_3'out: 5'-CCT GCG AGA CTG TGA TGC AAC ATT TGC-3'

exd_3'in: 5'-CAC CTC CGC TGC TTG CTT GCT GAA G-3'

3.1.6. Geräte und Software

Gerät/Software:	Model/Version:	Hersteller:
Analysewaage	CP 1245	Sartorius
Bildbearbeitung	Photoshop CS4	Adobe
Bilddokumentation	analySIS	Soft Imaging Systems
Autoklav	Tuttnauer 2540 EL	Systec
Binokular	MZ16	Leica
	M5-71585	Wild Heerbrugg
Digitalkameras	Coolpix 4500	Nikon
	CC-12	Soft Imaging Systems
Elektrophoresekammer	Modell 40-0708	peQLab
Elektrophoresenetzgerät	E 835	Consort
Geldokumentation	E-Box Videosystem	peQLab
Heizblock	LS1	VLM
Hybridisierofen	Compact Line OV4	Biometra
Inkubationshaube	Certomat H	B. Braun Biotech Int.
Kaltlichtlampe	KL1500 LCD	Schott
Kühltischzentrifuge	Micro R22	Hettich Zentrifugen
Magnetrührer	Model L-71	Micro Bio Tec Brand
Mikrowelle	Microwave 800	Severin
PCR-Cycler	Mastercycler gradient	Eppendorf
Mikroskop	BX51	Olympus
PC-System	Optiplex 755	Dell
pH-Meter	pH 211	Hanna Instruments
Schüttler	Rotamax 120	Heidolph
	Certomat R	B. Braun Biotech Int.
Spectrophotometer	SmartSpec 3000	Bio-Rad

Sterilbank	LaminAir S2010 1.2	Heto-Holten
Tischzentrifuge	Mikro 20	Hettich Zentrifugen
UV-Tisch	TCP-20.C	Vilber Lourmat
Vortexer	Model L 46	Micro Bio Tec Brand
Wasseraufbereitung	Simplicity	Millipore
Wasserbad	HC 4	Julabo

3.2. Tiermaterial

3.2.1. Haltung

Für die Versuche werden sowohl larvale (48h, 58h, 72h und 96h alt) als auch adulte Stadien (ca. 3-4 Monate alt) des marinen Polychaeten *Platynereis dumerilii* verwendet. Die Tiere wurden aus der Laboraufzucht der Arbeitsgruppe Dorrestein entnommen, die einer Zucht entstammt, die schon in den 1960er Jahren aufgebaut wurde. In dieser Zeit wurde die Zucht bereits mehrmals genetisch erneuert.

Die Haltung erfolgt in einer speziellen Kühlkammer, die die Temperatur konstant bei 18°C hält. Die Schalen, in denen sich die Tiere befinden, sind mit einem Gemisch aus künstlichem (KSW) und natürlichem (NSW) Seewasser gefüllt und werden permanent belüftet. Gefüttert werden die Tiere abwechselnd mit Algen, die im Institut gezüchtet werden, oder mit Spinat, der aus einem Eigenanbau der Universität stammt. In der Kühlkammer herrschen Langtagbedingungen, das heißt 16 Stunden Licht und 8 Stunden Dunkelheit. In einem 4-wöchigen Rhythmus wird eine 1-wöchige Mondphase simuliert, wodurch geschlechtsreife Tiere in den folgenden beiden Wochen ihre Wohnröhre verlassen, um sich zu paaren. Diese können abgesammelt und kontrolliert miteinander verpaart werden.

3.2.2. Fixierung von Larven für die *in situ*-Hybridisierung

Die Larven werden aus der Schale vorsichtig durch ein feines Sieb abgekippt und dann mit einer Pasteurpipette in ein Eppendorf-Gefäß überführt. Mit einem Tropfen 37%igem Formaldehyd werden die Larven abgetötet und sinken zu Boden. Der Überstand wird abgenommen, die Larven werden zweimal mit 3,7%

Formaldehyd in PBS (pH 9,6) gewaschen und anschließend über Nacht bei 4°C fixiert. Am folgenden Tag werden die Larven viermal mit PTw gewaschen, wodurch die Fixierlösung herausgewaschen wird. Anschließend wird dreimal mit Methanol gewaschen, um das Gewebe zu dehydrieren. Dann können die Larven bei -20°C eingefroren werden.

3.2.3. Herstellung und Fixierung von Regeneraten für die *in situ*-Hybridisierung

Für die Herstellung von Regeneraten werden 3-4 Monate alte adulte Tiere benötigt, die mindestens eine Anzahl von 35 Segmenten aufweisen. Es werden 10-20 Tiere aus der Zucht entnommen und in ein Sammelgefäß überführt. Dann werden die Tiere in 3,75% Magnesiumchlorid in natürlichem Seewasser (NSW) betäubt. Unter dem Binokular werden die posterior gelegenen Segmente abgetrennt, wobei darauf geachtet wird, dass nach dem 30. Segment geschnitten wird. Die abgetrennten Hinterenden werden verworfen und die noch betäubten Tiere werden einzeln, je in einen separaten Behälter, mit einem 1:1 Gemisch aus künstlichem und natürlichem Seewasser (GSW) überführt. Diese Einzelhaltung nach Amputation des Hinterendes ist notwendig, da die Tiere sich sonst gegenseitig angreifen und die frischen Wunden anfressen würden. Nach 16 Tagen werden den Tieren die neugebildeten Hinterenden, die Regenerate, mit einem zusätzlichen adulten Segment abgetrennt. Dazu werden die Tiere, wie schon zuvor, mit 3,75% Magnesiumchlorid in NSW betäubt. Die Regenerate werden sofort nach der Amputation in 3,7% Formaldehyd in PBS (pH 9,6) überführt und auf Eis gestellt. Nachdem alle Regenerate abgetrennt worden sind, wird die Formaldehydlösung durch frisches, exakt konzentriertes 3,7% Formaldehyd in PBS (pH 9,6) ersetzt. Anschließend werden die Regenerate über Nacht bei 4°C fixiert. Am folgenden Tag werden die Regenerate viermal mit PTw gewaschen, um das Fixativ herauszuwaschen. Danach wird dreimal mit Methanol gewaschen, um das Gewebe zu dehydrieren. Anschließend werden die Regenerate bei -20°C gelagert.

3.3. Isolation der Gene

3.3.1. RNA Isolation

(RNeasy Mini Kit)

Etwa 48h alte Trochophora-Larven werden mit Hilfe eines Siebes in ein „Eppendorf-Tube“ überführt. Diese werden dann mit 1 μ l β -Mercaptoethanol abgetötet, so dass sie zu Boden sinken und der Überstand weitgehend abgenommen werden kann. Auf die Larven werden dann 600 μ l RLT-Buffer mit 1% β -Mercaptoethanol gegeben. Mit einem Pistill wird das Zellgewebe zerstört und der Ansatz weiterbearbeitet oder weggefroren.

Das Lysat wird drei Minuten bei maximaler Drehzahl zentrifugiert und der Überstand in ein Eppendorf-Gefäß überführt. Dazu werden 600 μ l 70%iges Ethanol gegeben und vorsichtig mit der Hand gemischt. Die Probe (max. 700 μ l pro Durchlauf) wird auf eine Säule gegeben und bei 10.000 RPM 15 Sekunden zentrifugiert. Der Durchfluss wird verworfen. Danach werden 700 μ l RW1-Puffer auf die Säule gegeben und erneut bei 10.000 RPM 15 Sekunden lang zentrifugiert. Der Durchfluss wird verworfen und ein neues 2 ml Sammelgefäß (Collection-Tube) verwendet. Dann folgen zwei Waschschriffe mit je 500 μ l RPE-Puffer. Der erste für 15 Sekunden bei 10.000 RPM und der zweite für zwei Minuten bei 10.000 RPM. Der Durchfluss wird jeweils verworfen. Ein weiteres 2 ml Sammelgefäß wird verwendet und die Säule eine weitere Minute bei maximaler Drehzahl zentrifugiert, um die Membran von allen Flüssigkeitsresten zu befreien. Ein neues 1,5 ml Eppendorf-Gefäß wird verwendet und auf die Säule 30 μ l RNase-freies Wasser gegeben. Es wird eine Minute bei 10.000 RPM zentrifugiert. Das Eluat wird erneut auf die Säule gegeben und erneut bei gleicher Einstellung zentrifugiert. Das Eppendorf-Gefäß enthält nun die totale RNA und wird auf Eis gestellt.

3.3.2. Bestimmung der RNA-Konzentration

Die Konzentration und Reinheit der RNA wird mit Hilfe eines Spektrophotometers gemessen.

3.3.3. Reverse Transkription

(*RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit*)

Pro Ansatz:

Gesamt RNA	0,5 - 5 µg
Oligo (dt) ₁₈ Primer (50 mM)	1 µl
DEPC-Wasser	ad 12 µl

Die Proben werden optional für fünf Minuten bei 65°C inkubiert. Danach werden die Proben sofort auf Eis gestellt und abzentrifugiert.

5x RT-Puffer	4 µl
RiboLock RI	1 µl
dNTP-Mix (je 10mM)	2 µl
M-MuLV H- RT (200 U/µl)	1 µl

Die Proben werden für 60 Minuten bei 42°C und danach für fünf Minuten bei 70°C inkubiert. Im Eppendorf-Gefäß ist nun die cDNA enthalten. Die cDNA wird aliquotiert (1:10 Verdünnung) und eingefroren (-80°C) oder weiterverwendet.

3.3.4. PCR

Pro Ansatz mit Standard-Primern:

ddH ₂ O	18,78 µl
Taq-Puffer (mit Mg ²⁺ , 10x)	2,5 µl
Taq-Polymerase (1 U/µl)	0,2 µl
dNTP-Mix (je 10 mM)	0,62 µl
<i>sense</i> Primer (15 µM)	0,2 µl
<i>antisense</i> Primer (15 µM)	0,2 µl
cDNA (1:10)	<u>1 µl</u>
	25 µl

Standard-PCR-Programm

95°C 3 min

94°C	30 sek	
54°C	30 sek	38-40 Zyklen
72°C	30-120 sek	

72°C 3 min

4°C Ende

Pro Ansatz mit degenerierten Primern und variabler MgCl-Konzentration:

Taq-Puffer (Mg ²⁺ -frei, 10x)	2,5 µl
Taq-Polymerase (1 U/µl)	0,2 µl
dNTP-Mix (je 10 mM)	0,62 µl
MgCl ₂ (25 mM)	1,5 - 3 µl
<i>sense</i> Primer (100 µM)	0,2 µl
<i>antisense</i> Primer (100 µM)	0,2 µl
cDNA (1:10)	1 µl
ddH ₂ O	<u>ad 25 µl</u>
	25 µl

Wahlweise kann die Taq-Polymerase auch durch die Adv. 2 Polymerase von Clontech ersetzt werden. Diese verwendet einen eigenen Puffer und dNTP-Mix.

3.3.5. Agarose-Gelelektrophorese

Der TAE-Puffer mit der Agarose wird aufgeköcht bis eine homogene Lösung entsteht. Dann wird 0,05 µl Ethidiumbromid pro ml Gel hinzugegeben und das Gel in die Form gegossen. Es muss für ca. 30 Minuten aushärten. Nach dem Aushärten wird die Elektrophoresekammer mit 1x TAE gefüllt. Die PCR-Proben werden mit je 10x Ladepuffer gemischt und auf das Agarose-Gel aufgetragen. Es wird eine für die erwarteten Fragmentlängen passende Ladder verwendet und ebenfalls aufgetragen. Bei einer Spannung von 100 V läuft der Elektrophoreseprozess 30-60 Minuten.

3.3.6. Schneiden und Aufreinigen der DNA aus dem Agarose-Gel

(MinElute Gel Extraction-Kit)

Das Fragment wird mit einem Skalpell aus dem Gel geschnitten. Zu dem Gelblöckchen wird das dreifache Volumen an QG-Puffer gegeben und bei 50°C ca. zehn Minuten inkubiert, bis sich das Gelblöckchen komplett gelöst hat. Dann wird das einfache Volumen des Gelblöckchens an Isopropanol dazugegeben und gemischt. Die Probe wird auf eine Säule geladen und bei 13.000 RPM eine Minute lang zentrifugiert. Der Durchfluss wird verworfen. Dann werden 500 µl QG-Puffer auf die Säule pipettiert und erneut bei gleicher Einstellung zentrifugiert. Der Durchfluss wird wiederum verworfen. Es folgt ein Waschschrift mit 750 µl PE-Puffer bei gleicher Zentrifugeneinstellung. Der Durchfluss wird ebenfalls verworfen. Vor der Elution wird die Säule trocken zentrifugiert. Zur Elution werden 10 µl EB-Puffer auf die Säule gegeben und erneut bei gleicher Einstellung zentrifugiert. Dieser Schritt wird mit den 10 µl Eluat wiederholt, um die Ausbeute zu erhöhen. Im Eluat befindet sich das jeweilige PCR-Produkt.

3.3.7. Ligation

(pGEM-T_{easy} Vektor System I)

Pro Ansatz:

Ligase-Puffer (2x)	5 µl
pGem-T easy Vektor	1 µl
T ₄ -Ligase	1 µl
PCR-Produkt	<u>3 µl</u>
	10 µl

Der Ligationsansatz wird bei 4°C in einem Kühlblock über Nacht aufbewahrt.

3.3.8. Transformation

Die kompetenten Bakterien werden auf Eis aufgetaut. Der Ligationsansatz wird für zehn Minuten auf 70°C erhitzt. Je 25 µl der Bakterien-Suspension werden in ein Inkubationsröhrchen gegeben und mit 2,5 µl des Ligationsansatzes gemischt. Die Bakterien werden für 30 Minuten auf Eis gestellt. Danach folgt ein

Hitzeschock für 70-90 Sekunden bei 42°C. Dann werden die Bakterien für zwei Minuten erneut auf Eis gestellt. Dann werden 250 µl SOC-Medium dazugegeben und die Bakterien bei 37°C eine Stunde auf dem Schüttler (150 RPM) inkubiert. Anschließend werden zwei LB-Platten pro Ansatz mit 60 µl bzw. 120 µl Bakteriensuspension ausplattiert und über Nacht (max. 16 Stunden) inkubiert.

3.3.9. Klon-Check-PCR

Pro Klon wird ein PCR-Tube mit der unten genannten Zusammensetzung vorbereitet. Dann werden neun Klone pro Ansatz mit Hilfe eines Zahnstochers gepickt und zunächst der Großteil der Bakterien auf einer Masterplatte ausgestrichen. Anschließend wird der Zahnstocher kurz in das jeweilige PCR-Tube gehalten, um den Rest der Bakterien dorthin zu überführen.

Pro Ansatz:

ddH ₂ O	21,425 µl
PCR-Puffer mit Mg ²⁺ (10x)	2,5 µl
dNTPs (10 mM)	0,625 µl
Taq-Polymerase	0,2 µl
Sp6-Primer (100 µM)	0,125 µl
T7-Primer (100 µM)	<u>0,125 µl</u>
	25 µl

PCR-Programm

94°C 3 min

94°C	30 sek	
54°C	20 sek	38-40 Zyklen
72°C	30-120 sek	

72°C 3 min

4°C Ende

Die PCR-Produkte werden mit einer Agarose-Gelelektrophorese analysiert und die positiven Klone selektiert. Die Masterplatte wird bei 37°C über Nacht (max. 16 Stunden) inkubiert.

3.3.10. Plasmid-Präp

(Fast Plasmid Mini Kit)

Ein paar der positiven Klone werden am nächsten Tag im Rahmen einer Plasmid-Präp weitergeführt. Dazu werden die Klone von der Masterplatte gepickt und in ein Inkubationsröhrchen mit 5 ml LB-Medium gegeben. Die Bakterien werden erneut über Nacht (max. 16 Stunden) bei 37°C schüttelnd (270 RPM) inkubiert. Am nächsten Tag werden 1,5 ml der Bakteriensuspension in ein 2 ml Tube überführt. Die Suspension wird für eine Minute bei 13.000 RPM zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Pellet auf Eis gestellt. Auf das Pellet werden 400 µl eiskalte Lyse-Lösung gegeben und 30 Sekunden gevortext. Danach werden die Bakterien drei bis fünf Minuten in der Lyse-Lösung inkubiert. Dann werden 125 µl Isopropanol dazugegeben und gemischt. Die Lösung wird auf eine Säule gegeben und für eine Minute bei 13.000 RPM zentrifugiert. Dann werden 400 µl Wasch-Puffer auf die Säule aufgetragen und erneut mit gleichen Einstellungen zentrifugiert. Der Durchfluss wird verworfen. Die Säule wird nochmals trocken zentrifugiert und danach in ein frisches 1,5 ml Tube gestellt. Dann werden 50 µl Elutions-Puffer auf die Säule gegeben und fünf Minuten lang inkubiert. Die Säule wird erneut für eine Minute bei 13.000 RPM zentrifugiert. Im Eluat befindet sich nun das Plasmid, dessen Konzentration und Reinheit zunächst bestimmt wird. Danach kann das Plasmid sequenziert werden.

3.3.11. RACE-PCR

(SMART RACE cDNA Amplification Kit)

Um Gen-Fragmente zu verlängern, damit eine Sonde mit ausreichender Länge erstellt werden kann, wird eine RACE-PCR durchgeführt.

Pro Ansatz:

ddH ₂ O	17,25 µl
BD Adv.2 PCR-Puffer (10x)	2,5 µl
dNTP-Mix (50x)	0,5 µl
BD Adv.2 Polymerase-Mix (50x)	<u>0,5 µl</u>
	20,75 µl

Danach werden entweder die 5'RACE, die 3'RACE oder beide durchgeführt. Werden beide RACE-PCRs durchgeführt, muss der doppelte Ansatz des Mastermix hergestellt werden.

5'RACE

Mastermix	20,75 µl
5'RACE-cDNA	1,25 µl
Univ. Primer-Mix (10x)	2,5 µl
Gensp. Primer 3' (10 µM)	<u>0,5 µl</u>
	25 µl

3'RACE

Mastermix
3'RACE-cDNA
Univ. Primer-Mix (10x)
Gensp. Primer 5' (10 µM)

PCR-Programm

94°C	30 sek	5 Zyklen
72°C	20 sek	

94°C	30 sek	5 Zyklen
54°C	30 sek	
72°C	3 min	

94°C	30 sek	25 Zyklen
68°C	30 sek	
72°C	3 min	

72°C 3 min

4°C Ende

3.3.12. Semi nested PCR der RACE-Fragmente

Pro Ansatz

ddH ₂ O	18,175 µl
Reaction-Buffer m. Mg ²⁺ (10x)	2,5 µl
dNTP-Mix (10 mM)	0,625 µl
Taq-Polymerase	0,2 µl

Danach werden entweder der 5'Ansatz, der 3'Ansatz oder beide durchgeführt. Werden beide nested-PCRs durchgeführt, muss der doppelte Ansatz des Mastermix hergestellt werden.

5'Ansatz

Mastermix	21,5 µl
Nested Univ. Primer (10x)	0,5 µl
Gensp. Primer 3' (10 µM)	0,5 µl
5' Produkt 1. PCR (1:50)	<u>2,5 µl</u>
	25 µl

3'Ansatz

Mastermix
Nested Univ. Primer (10x)
Gensp. Primer 5' (10 µM)
3' Produkt 1. PCR (1:50)

PCR-Programm

94°C 3 min

94°C	30 sek	
68°C	30 sek	25 Zyklen
72°C	3 min	

72°C 3 min

4°C Ende

3.4. Herstellung der Sonden für die *in situ*-Hybridisierung

3.4.1. Template-Erstellung für Sondensynthese

Für die Sondensynthese wird zunächst bestimmt, in welcher Orientierung das Gen im Vektor vorliegt. Daran orientiert sich, welches Kit (Sp6 oder T7) zur Herstellung des Templates benutzt wird.

Pro Ansatz:

Phire Reaktions-Puffer (5x)	40 µl
dNTPs (10 mM)	4 µl
Phire II-Polymerase	4 µl
Primer Sp6 (15 µM)	1 µl
Primer T7 (15 µM)	1 µl
Plasmid (100 ng)	x µl
ddH ₂ O	<u>ad 150 µl</u>
	200 µl

PCR-Programm

98°C 1 min

98°C	10 sek	
45°C	10 sek	38-40 Zyklen
72°C	40 sek	

72°C 2 min

4°C Ende

Die PCR-Produkte werden mit einer Agarose-Gelelektrophorese analysiert, die Banden ausgeschnitten und aus dem Gel aufgereinigt. Die Konzentration und Reinheit werden bestimmt. Benötigt wird eine Konzentration von mindestens 220 - 230 ng/µl.

3.4.2. Sondensynthese

(*Megascript Sp6/T7 Kit*)

Die Reaktion wird bei Raumtemperatur angesetzt, da der Puffer bei niedriger Temperatur ausfällt. Je nachdem, wie die Sonde im Vektor eingebaut wurde, wird entweder das Sp6 oder das T7 Kit verwendet.

Pro Ansatz:

Rx-Puffer (10x)	1 µl
ATP	1 µl
CTP	1 µl
GTP	1 µl
UTP	0,68 µl
dig-11-UTP	2,1 µl
DNA (0,5 µg)	x µl
Enzym-Mix	1 µl
ddH ₂ O	<u>ad 10 µl</u>
	10 µl

Der Ansatz wird für vier bis sechs Stunden bei 37°C inkubiert. Dann wird 1 µl DNase zugegeben und weitere 15 min bei 37°C inkubiert. Danach werden 40 µl RNase freies H₂O und 25 µl LiCl₂ dazugegeben und der Ansatz zunächst für 20 Minuten bei -20°C und dann über Nacht bei -80°C eingefroren. Am nächsten Tag wird zunächst für 15 Minuten bei 4°C und maximaler Drehzahl zentrifugiert. Der Überstand wird abgenommen. Auf das Pellet werden 150 µl 70%iges RNase freies Ethanol gegeben und das Pellet abgelöst. Es wird weitere zwei Minuten bei 4°C und maximaler Drehzahl zentrifugiert. Das Ethanol wird abpipettiert. Dann werden 50 µl TE-Puffer auf das Pellet gegeben und die Probe resuspendiert. Die Probe wird für zehn Minuten bei 50°C inkubiert. Danach wird die Konzentration und Reinheit der Probe gemessen und mit Hybe-Puffer auf eine Konzentration von 50 ng/µl eingestellt. Die Sonde wird bei -20°C eingefroren.

3.5. *Whole mount in situ*-Hybridisierung

3.5.1. Vorbehandlung

Die *whole mount in situ*-Hybridisierung (WMISH) wird, wie zuvor von Seaver und Kaneshige (2006) bei *Capitella teleta* beschrieben, mit Larven und nach kleinen Modifikationen auch mit Regeneraten von *Platynereis dumerilii* durchgeführt. Die Larven bzw. Regenerate werden, sofern sie zuvor bei -20°C in Methanol gelagert wurden, über eine absteigende Methanolreihe (60% Methanol/40% PTw bzw. 30% Methanol/70% PTw) rehydriert und dann viermal mit PTw gewaschen. Alle Waschschr itte erfolgen, falls nicht anders angegeben, bei Raumtemperatur in einer 24-well-Kulturplatte mit 500 µl Volumen auf dem Schüttler (75 - 100 RPM) für fünf Minuten. Als Nächstes wird das Gewebe mit 0,01 mg/ml Proteinase K in PTw für fünf Minuten (für Larven) bzw. für zwölf Minuten (für Regenerate) angedaut und dann zweimal mit 2 mg/ml Glycin in PTw gewaschen, um den Verdauungsprozess zu stoppen. Das Gewebe wird dann in 1% Triethanolamin in PTw überführt und 1,5 µl Essigsäureanhydrid hinzugegeben. Durch diesen Schritt werden reaktive Gruppen abgesättigt. Nach fünf Minuten werden nochmals 1,5 µl Essigsäureanhydrid hinzugegeben. Dann folgen zwei Waschschr itte mit PTw und eine weitere Fixierung des Gewebes mit 3,7% Formaldehyd in PTw für 30 Minuten (bei Larven) bzw. für 40 Minuten (bei Regeneraten). Der Fixierung folgen fünf weitere Waschschr itte mit PTw. Abschließend wird das Gewebe für zehn Minuten (bei Larven) bzw. für 30 Minuten (bei Regeneraten) auf 80°C erhitzt, um die endogene alkalische Phosphatase zu inaktivieren. Die Larven/Regenerate werden danach zur besseren Handhabbarkeit in ein Eppendorf-Gefäß überführt.

3.5.2. Prähybridisierung

Das PTw wird soweit wie möglich abpipettiert, durch Hybridisierungspuffer (Hybe) ersetzt und das Gewebe für zehn Minuten gewaschen. Anschließend wird der Puffer durch frischen Hybridisierungspuffer ersetzt und das Gewebe über Nacht bei Hybridisierungstemperatur (65°C) im Hybridisierungssofen inkubiert.

3.5.3. Hybridisierung

Die RNA-Sonden werden mit erwärmtem Hybridisierungspuffer auf die finale Konzentration gebracht und bei 85°C im Heizblock zehn Minuten denaturiert. Dann wird der Prähybridisierungspuffer durch die Sonde in Hybridisierungspuffer getauscht. Die Hybridisierung erfolgt bei 65°C über Nacht.

3.5.4. Posthybridisierung

Nach der Hybridisierung werden die folgenden Waschschrirte durchgeführt:

- fünf Minuten in vorgewärmtem Hybridisierungspuffer bei Hybridisierungstemperatur
- 20 Minuten in vorgewärmtem Hybridisierungspuffer bei Hybridisierungstemperatur
- zehn Minuten in 75% Hybridisierungspuffer/25% 2x SSC bei Hybridisierungstemperatur
- zehn Minuten in 50% Hybridisierungspuffer/50% 2x SSC bei Hybridisierungstemperatur
- zehn Minuten in 25% Hybridisierungspuffer/75% 2x SSC bei Hybridisierungstemperatur
- zehn Minuten in 100% 2x SSC bei Hybridisierungstemperatur
- Zweimal 30 Minuten in 0,05x SSC bei Hybridisierungstemperatur
- zehn Minuten in 75% 0,05x SSC/25% PTw bei Raumtemperatur
- zehn Minuten in 50% 0,05x SSC/50% PTw bei Raumtemperatur
- zehn Minuten in 25% 0,05x SSC/75% PTw bei Raumtemperatur
- zehn Minuten in 100% PTw bei Raumtemperatur

Die Larven/Regenerate werden danach zurück in die 24-well-Kulturplatte überführt.

3.5.5. Visualisierung der Sonden

Die Larven/Regenerate werden zunächst fünfmal mit PBT gewaschen und dann in Blocking-Puffer für eine Stunde geblockt, um eine unspezifische Bindung des Antikörpers zu verhindern. Dann wird der Antikörper anti-Dig/AP mit Blocking-Puffer auf eine Konzentration von 1:5000 verdünnt und auf die Larven/Regenerate gegeben. Die Inkubation wird bei 4°C im Kühlraum über Nacht auf dem Schüttler durchgeführt. Am nächsten Tag werden die Proben zunächst sieben- bis achtmal für jeweils zehn Minuten mit PBT gewaschen. Danach folgen drei Waschschriffe mit AP-Puffer. Schließlich werden die Larven/Regenerate in AP-Substratlösung überführt und im Dunkeln gefärbt. Die Färbung wird bis zur gewünschten Intensität durchgeführt und die Farbreaktion dann dreimal mit AP-Stopp-Puffer gestoppt. Die Larven/Regenerate werden dann in 80% Glycerol in PBS überführt und im Kühlschrank gelagert.

4. Ergebnisse

4.1. Verlauf der posterioren Regeneration bei *Platynereis dumerilii*

Trennt man die posterioren Segmente bei *Platynereis dumerilii* ab, kann man bereits nach kurzer Zeit erkennen, wie die Wundheilung beginnt. Die Darmwände stülpen sich nach außen und verbinden sich mit dem Integument. So entsteht ein erster provisorischer Wundverschluss, der zunächst das Ausfließen von Hämolymphe und Coelomflüssigkeit verhindern soll. Nach 24 Stunden ist die Wunde im Regelfall vollständig verschlossen (Abb. 2 A). Die Darmöffnung bleibt während der gesamten Wundheilung durchgehend geöffnet. Nach weiteren 24 Stunden kann man im Wundbereich die Bildung eines Regenerationsblastems beobachten (Abb. 2 B). Nach einem weiteren Tag sind schon die ersten Ansätze der Analcirren zu erkennen (Abb. 2 C). Am vierten Tag der Regeneration sieht man deutlich, wie das Blastem und die Analcirren an Länge gewonnen haben. Außerdem werden die ersten Blutgefäße sichtbar, die sich im Blastem gebildet haben, um die neuen Strukturen zu versorgen (Abb. 2 D). An den folgenden Tagen wachsen das Regenerat und die Analcirren weiter aus (Abb. 2 E,F). Nach sieben Tagen kann man die Bildung der ersten Segmente und Parapodienknospen, die paarweise an jedem Segment angelegt werden, erkennen (Abb. 2 G). Einen Tag später sind bereits mehrere Segmente entstanden. Dabei zeigen die anterior liegenden Segmente, also die ältesten Segmente des Regenerats, bereits voll entwickelte Parapodien, die nur noch auswachsen müssen (Abb. 2 H). Nach 16 Tagen sind ca. 8-15 neue Segmente angelegt worden. Die Amputationsstelle ist zunehmend schwerer zu identifizieren, da die ältesten Segmente des Regenerats sich kaum mehr von den adulten Segmenten unterscheiden. Der Grad des Wachstums und der Entwicklung nimmt von anterior nach posterior schrittweise ab. So ist es möglich, die komplette Entwicklung der Parapodien, von der Knospenbildung bis zum voll ausgewachsenen Parapodium, an einem einzigen Regenerat zu beobachten (Abb. 2 I).

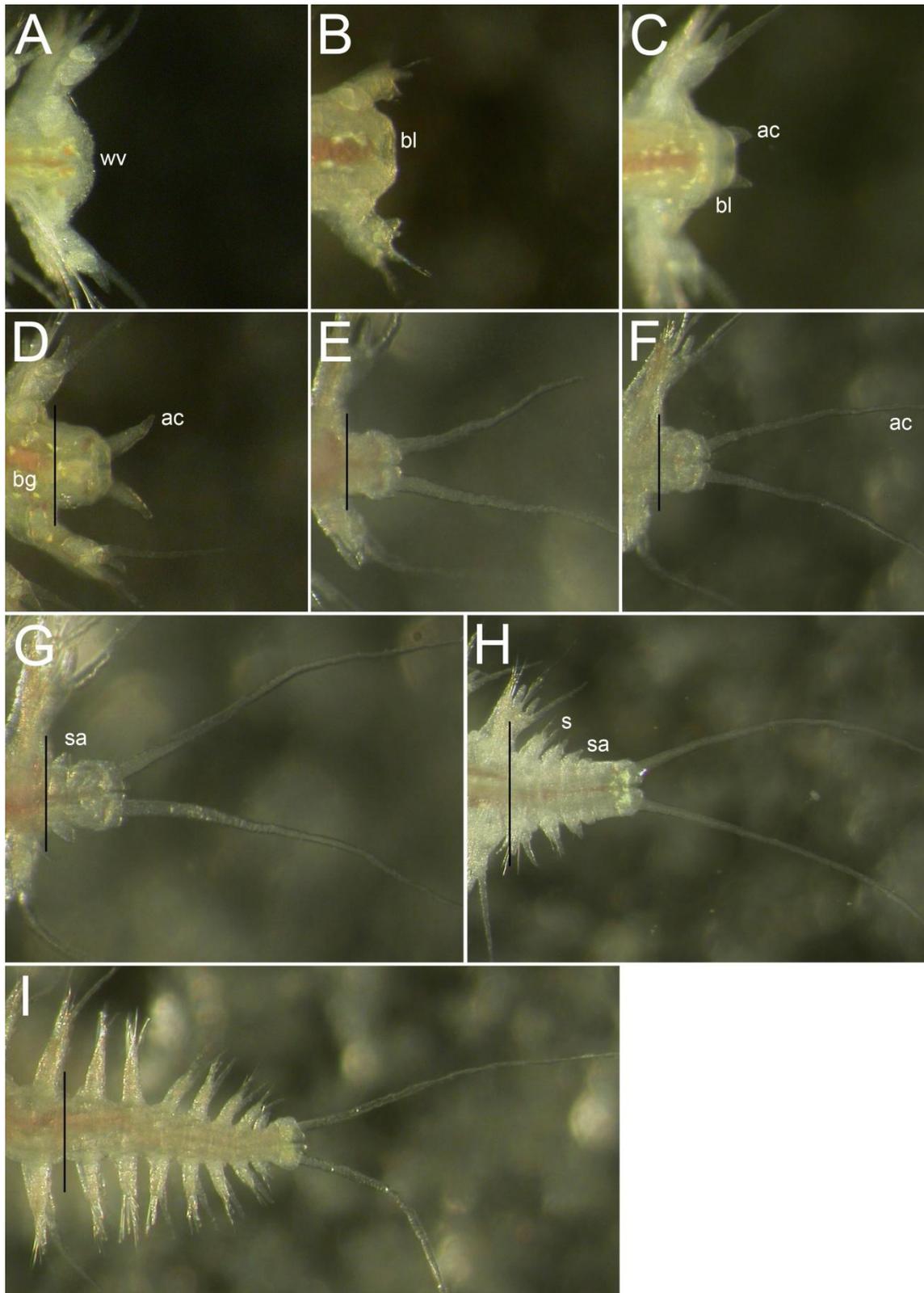


Abbildung 2: Verlauf der posterioren Regeneration bei *Platynereis dumerilii*. Lebendaufnahmen von zwei regenerierenden adulten Tieren (A-D Tier 1, E-I Tier 2), denen das Hinterende nach dem 30. Segment amputiert wurde. Die Fortschritte der Regeneration werden über 16 Tage lang beobachtet und dokumentiert. A-D sind Dorsal- und E-I Ventraalaufnahmen. (A-H) 1-8 Tage (I) 16 Tage nach Amputation des Hinterendes. (ac) Analcirren, (bg) Blutgefäß, (bl) Blastem, (sa) Segmentanlage mit Parapodienknospe, (s) voll entwickelte Segmente mit Parapodien, (wv) Wundverschluss, schwarze Linie - Amputationsstelle.

4.2. Vergleich eines larvalen und eines adulten Parapodiums bei *Platynereis dumerilii*

Da in dieser Arbeit sowohl mit Larven als auch mit caudalen Regeneraten adulter, nicht geschlechtsreifer Stadien von *Platynereis dumerilii* gearbeitet wird, bietet es sich an, beide miteinander zu vergleichen. Dazu wird ein Parapodium einer 96-Stunden alten Larve mit dem eines adulten, nicht geschlechtsreifen Tieres verglichen (Abb. 3). Der generelle Aufbau des Parapodiums ist relativ ähnlich. Das Parapodium gliedert sich in die zwei Teilbereiche Notopodium (dorsal) und Neuropodium (ventral). Das Noto- und Neuropodium besteht bei Larven aus jeweils zwei ungleichen Ausstülpungen, wobei jeweils die obere alle Chaeten (Borsten) trägt. Bei adulten Tieren gliedert sich das Notopodium in dorsoventraler Reihenfolge in drei ungleiche Ausstülpungen: den Dorsalcirrus, das obere Zügelchen und die obere Lippe. Die Chaeten treten zwischen den letzten beiden hervor. Das Neuropodium besteht aus vergleichbaren Ausstülpungen, die allerdings spiegelbildlich angeordnet sind und sich in der Größe von ihren dorsalen Vertretern unterscheiden. Hier treten die beiden Borstenbündel aus der unteren Lippe hervor. Die Acicularien, die die Stützelemente der Parapodien darstellen, sind sowohl im Parapodium der Larve als auch im adulten Parapodium wiederzufinden. Die Chaeten wachsen bei den Larven deutlich ungeordneter und weniger gebündelt als bei den adulten Tieren. Außerdem sieht es so aus, als ob bei den adulten Tieren drei Borstenbündel vorhanden sind. Bei den Larven sind es nur zwei. Auch das Aussehen der Chaeten unterscheidet sich. Während es bei den Larven nur ein Typ von Chaeten gibt, sind bei den adulten Tieren zwei grundlegende Typen von Chaeten zu unterscheiden. Diese werden nachfolgend als Typ 1 beziehungsweise Typ 2 bezeichnet. Die Chaeten vom Typ 1, die auch bei den Larven zu finden sind, bestehen aus zwei Teilen und haben eine dünne, am Ende spitz zulaufenden Form. Die Chaeten vom Typ 2 sind ebenfalls zweigeteilt, haben dagegen eine sichel- oder klauenförmige Endstruktur. Im Notopodium eines adulten Tieres sind ausschließlich Chaeten vom Typ 1 zu finden. Im Neuropodium finden sich hingegen beide Chaeten-Typen, wobei mehr Chaeten vom Typ 2 vorhanden sind.

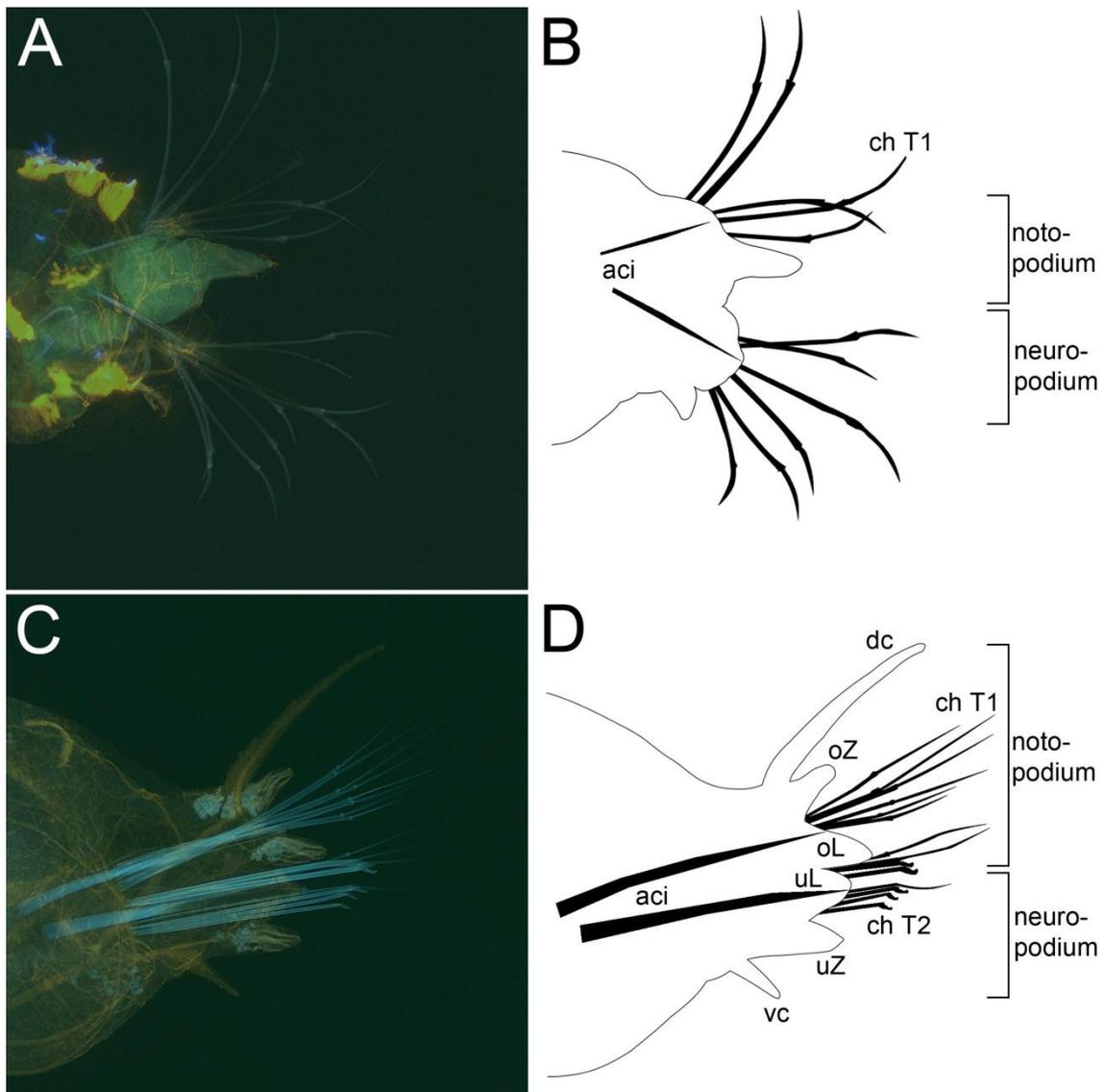


Abbildung 3: Vergleich von Querschnitten eines larvalen und eines adulten Parapodiums.

Querschnitt eines Segmentes (A) einer 96-Stunden alten Larve und (C) eines adulten Tieres (ca. 30. Segment). Immunhistochemische Färbung von Axonen mit anti-acetyliertem Tubulin Antikörper (gelb) und durch UV-Licht angeregte Autofluoreszenz, die Acicularien, Chaeten und Spinndrüsen hervorhebt (blau). (B,D) Schematische Darstellung der jeweiligen Querschnitte. (aci) Acicularien, (ch T1) Chaeten Typ 1, (ch T2) Chaeten Typ 2, (dc) Dorsalcirrus, (oL) obere Lippe, (oZ) oberes Zügelchen, (uL) untere Lippe, (uZ) unteres Zügelchen, (vc) Ventralcirrus.

4.3. *Pdu-dac* Expression

Die Expression des Gens *Pdu-dac* ist in allen untersuchten Larvenstadien und auch während der Regeneration des Hinterendes eines adulten Tieres nachzuweisen. In 48-Stunden alten Larven kann man bereits mehrere Expressionsdomänen im Kopf- und Rumpfbereich erkennen. Diese liegen paarig, links und rechts der Mittellinie (Abb. 4 A,B). Der subepidermale Bereich caudal des Prototrochs ist komplett klar und frei von Expression. Die Expression im Rumpf liegt auf der ventralen Seite, wohingegen die Expression im Kopfbereich eher zentral lokalisiert ist (Abb. 4 C). Bei den 72- und 96-Stunden alten Larven kann man deutlich erkennen, dass die Expression sich auf das zweite und dritte Segment beschränkt (Abb. 4 D,F) und eher mittig im Rumpf in der Nähe der Mittellinie liegt (Abb. 4 G). Aus der Lateralansicht lässt sich erkennen, dass die Expression, wie auch bei den Larven, im Kopf eher mittig und im Rumpf ventral lokalisiert ist (Abb. 4 E,H). Die Basen sowie auch die Parapodien selbst sind komplett ungefärbt und zeigen keine Expression (Abb. 4 D,F). Das Gleiche gilt auch für die anderen Körperanhänge wie die Analcirren oder die Peristomialcirren. Bei den 96-Stunden alten Larven kann man außerdem noch erkennen, dass sich das Expressionsmuster im Kopfbereich verändert hat. Während es bei 48-Stunden alten Larven noch aus zwei kugelig geformten Domänen besteht, hat es sich bei den 96-Stunden alten Larven zu zwei eher länglichen und leicht gebogenen Domänen entwickelt, die sich an der Mittellinie fast berühren (Abb. 4 A,F).

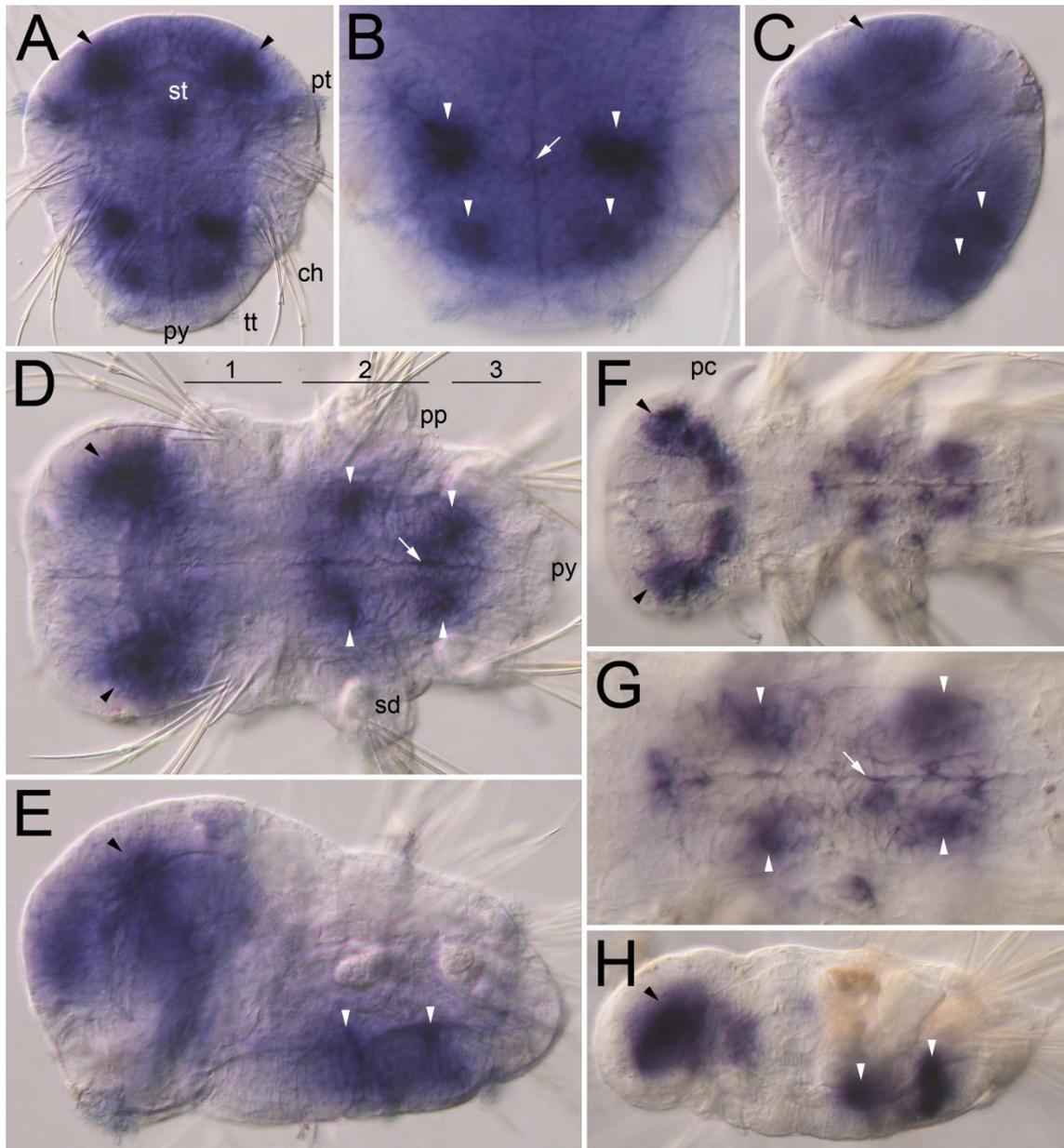


Abbildung 4: *Pdu-dac* Expression in 48-, 72- und 96-Stunden alten Larven. *Whole mount in situ*-Hybridisierung.

(A) Ventralansicht mit (B) Detailvergrößerung der Expression im zweiten und dritten Segment und (C) Lateralansicht (ventral ist rechts) einer 48-Stunden alten Larve, (D) Ventral- und (E) Lateralansicht (ventral ist unten) einer 72-Stunden alten Larve, (F) Ventralansicht mit (G) Detailvergrößerung der Expression im zweiten und dritten Segment und (H) Lateralansicht (ventral ist unten) einer 96-Stunden alten Larve.

(ch) Chaeten, (pc) Peristomialcirrus, (pp) Parapodium, (pt) Prototroch, (py) Pygidium, (sd) Spinndrüse, (st) Stomodeum, (tt) Telotroch (1,2,3) Segmente 1-3, schwarze Pfeilköpfe - paarige Expression im Kopfbereich, weiße Pfeilköpfe - paarige Expression im zweiten und dritten parapodientragenden Segment, weißer Pfeil - Expression in der ventralen Mittellinie.

Während bei der larvalen Entwicklung keine Expression von *Pdu-dac* in den Körperanhängen zu finden ist, gestaltet sich das Expressionsmuster bei der Regeneration etwas anders. Sowohl im Noto- als auch im Neuropodium sind Expressionsdomänen nachzuweisen, die allerdings nur wenige Zellen betreffen. Im Notopodium sind diese eher im distalen Bereich und im Dorsalcirrus lokalisiert (Abb. 5 D,E), wohingegen im Neuropodium die Expression eher im proximalen Bereich des Parapodiums zu finden ist (Abb. 5 F,G). Diese Expression ist allerdings nur über einen gewissen Zeitraum nachzuweisen. In den älteren Segmenten des Regenerates ist die Expression im Notopodium beispielsweise nicht mehr nachweisbar und auch die Expression im Neuropodium ist sichtbar schwächer geworden. Das trifft auch auf die Expression im Rumpf zu, die in rostraler Richtung deutlich an Intensität verliert (Abb. 5 A). Neben der Expression in den Parapodien kann man außerdem noch Expression in den Analcirren und in deren Basen nachweisen (Abb. 5 B,C). Die Querschnitte des Regenerates bestätigen die Beobachtungen aus der Ventralansicht. Man kann auch hier wieder die Expression im distalen Bereich des Notopodiums, an der Basis des Dorsalcirrus, und im Dorsalcirrus selbst sowie die Expression im proximalen Bereich des Neuropodiums erkennen (Abb. 6 B,D,F). Auch das Verschwinden der Expression im Notopodium bei älteren Segmenten ist hier nachvollziehbar (Abb. 6 F). Zusätzlich kann man in den Querschnitten die Expression im Rumpf genauer zuordnen. Zum einen handelt es sich um Expression im Bereich des Nervensystems und zum anderen um Expression im Bereich des Darms. Genauere Aussagen darüber, in welchen Geweben *Pdu-dac* exprimiert wird, lassen sich mit diesen Querschnitten, bedingt durch die große Schnittdicke, nicht treffen. Was aber deutlich zu sehen ist, ist der Verlust an Intensität der Expression bei älteren Segmenten (Abb. 6 A,C,E).

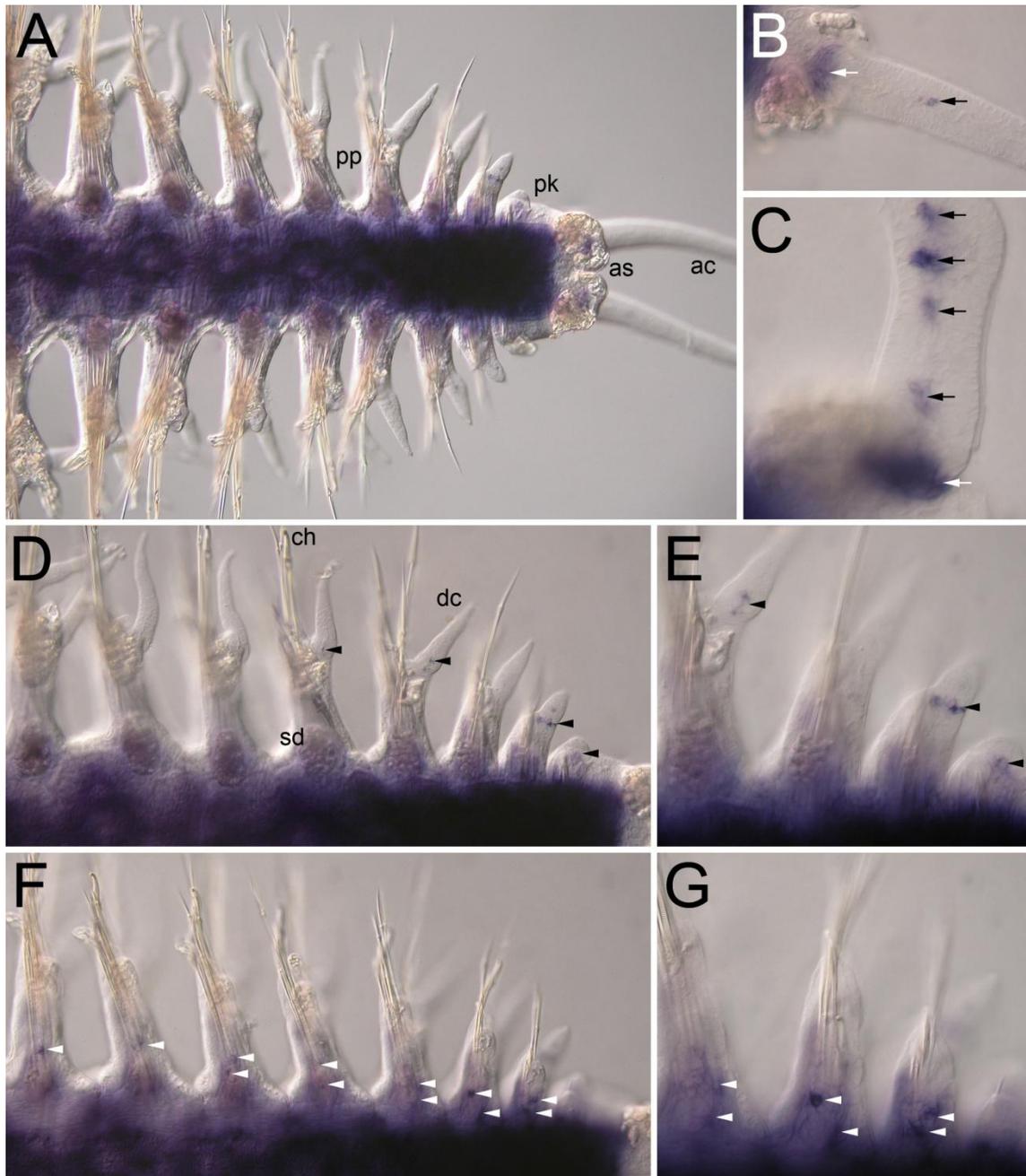


Abbildung 5: *Pdu-dac* Expression in 16 Tage alten Regeneraten (Ventralansicht). *Whole mount in situ*-Hybridisierung.

(A) Übersicht des Regenerates, (B,C) Expression in den Analcirren bei zwei unterschiedlichen Tieren, (D) Ventralansicht und (E) Detailvergrößerung der Parapodien mit dorsaler Fokusebene, (F) Ventralansicht und (G) Detailvergrößerung der Parapodien mit ventraler Fokusebene.

(ac) Analcirrus, (as) anale Spinndrüsen, (ch) Chaeten, (dc) Dorsalcirrus, (sd) Spinndrüse, (pk) Parapodienknospe, (pp) Parapodium, schwarze Pfeilköpfe - Expression im Notopodium, weiße Pfeilköpfe - Expression im Neuropodium, schwarze Pfeile - Expression in den Analcirren, weiße Pfeile - Expression in der Basis der Analcirren.

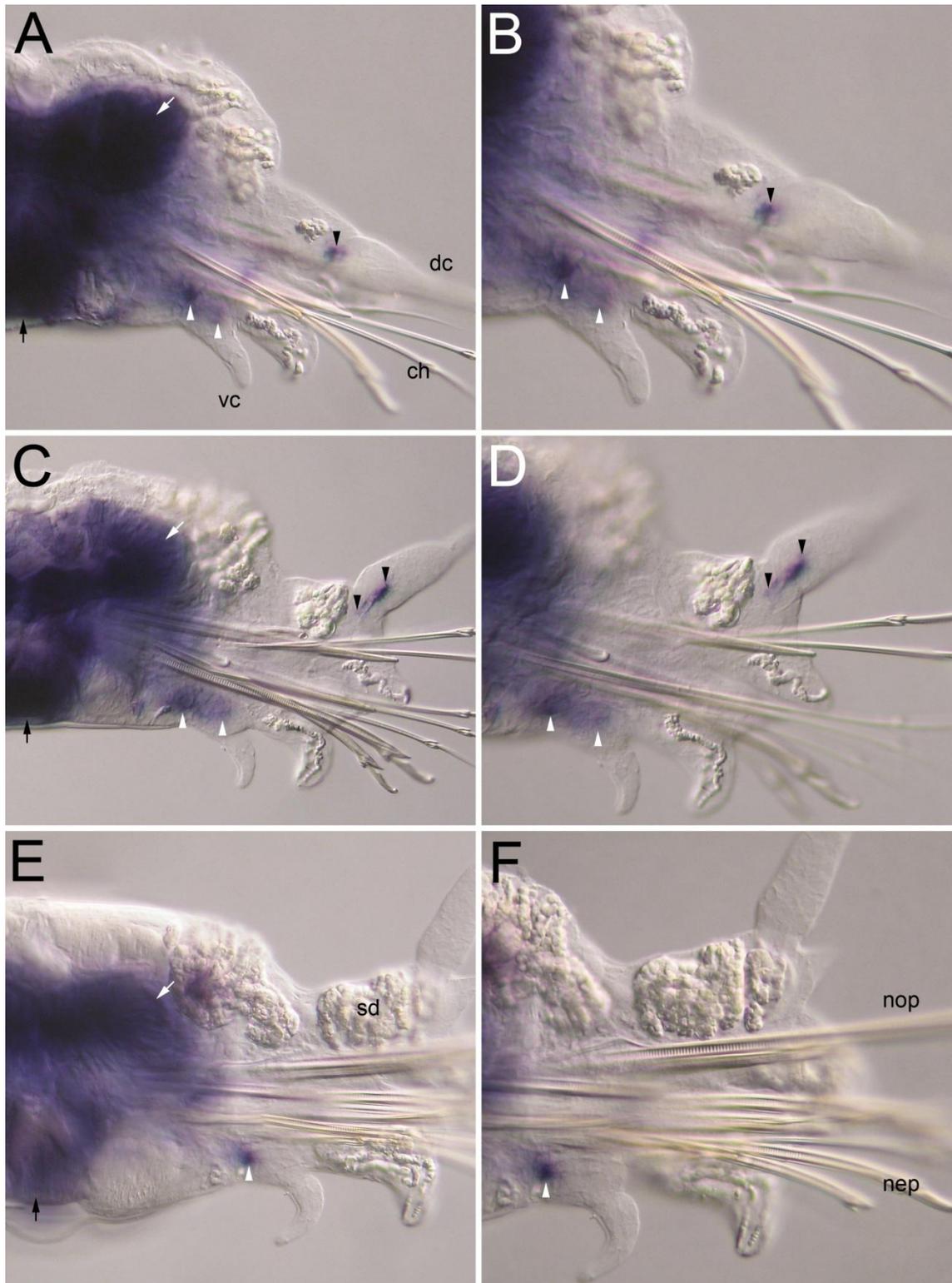


Abbildung 6: *Pdu-dac* Expression in 16 Tage alten Regeneraten (Querschnitte). *Whole mount in situ*-Hybridisierung.

Querschnitt eines (A) jungen, (C) mittelalten und (E) alten Segmentes des Regenerates, (B,D,F) Vergrößerung des jeweiligen Querschnitts mit Fokus auf das Parapodium.

(ch) Chaeten, (dc) Dorsalcirrus, (nep) Neuropodium, (nop) Notopodium, (sd) Spinndrüse, (vc) Ventralcirrus, schwarze Pfeilköpfe - Expression im Notopodium, weiße Pfeilköpfe - Expression im Neuropodium, schwarze Pfeile - Expression im Bereich des Nervensystems, weiße Pfeile - Expression im Bereich des Darms.

4.4. *Pdu-Dll* Expression

Pdu-Dll wird bei Larven sowohl im Kopf- als auch im Rumpfbereich exprimiert. Die Expression im Kopf ist sehr stark und in fast allen Bereichen aller untersuchten Larvenstadien zu finden. Im Rumpf gibt es wie auch bei *Pdu-dac* paarig angeordnete Expressionsdomänen links und rechts der Mittellinie. Diese liegen hier aber, anders als bei *Pdu-dac*, mehr lateral als zentral. Bei den 48-Stunden alten Larven sind in der Ventralansicht deutlich vier hintereinander liegende Domänen auf beiden Seiten der Larve zu erkennen (Abb. 7 A). Die erste liegt direkt hinter dem Prototroch, gefolgt von den drei anderen, wobei jede Domäne einem Segment zuzuordnen ist. Die Expression im ersten Segment ist im Gegensatz zu den anderen nur sehr schwach ausgeprägt (Abb. 7 B). Schaut man sich die 48-Stunden alte Larve in der Lateralansicht an, erkennt man, dass es sich bei allen vier Domänen um Paare handelt. Ein Teil der Expression liegt dabei mehr dorsal und der andere Teil mehr ventral (Abb. 7 C). Bei den 72- und 96-Stunden alten Larven ist die Expression im ersten Segment nicht mehr nachzuweisen. Die Expression der drei übrigen Domänen direkt hinter dem Prototroch und im zweiten und dritten Segment sind hingegen noch deutlich zu erkennen (Abb. 7 D,E,G,H). Die Expression direkt hinter dem Prototroch liegt genau an der Basis des Peristomialcirrus, der sich allerdings erst bei den 96-Stunden alten Larven sichtbar entwickelt hat (Abb. 7 H). Bei den 72- Stunden alten Larven lässt sich auch noch schwache Expression im Nervensystem feststellen (Abb. 7 E). Zudem wird auch noch eine weitere Expressionsdomäne im Pygidium der Larve sichtbar, die in den Basen der Analcirren liegt, die sich bei den 96-Stunden alten Larven zu bilden beginnen (Abb. 7 G). Schaut man sich die 72- und 96-Stunden alten Larven in der Lateralansicht an, ist die deutliche Trennung der Expression in paarige Domänen pro Segmentseite, wie sie bei den 48-Stunden alten Larven zu sehen ist, nicht mehr erkennbar. Es handelt sich nun mehr um eine größere Domäne, die allerdings nur im ventralen Teil des Parapodiums, also im Neuropodium nachzuweisen ist. Das Notopodium ist komplett klar und ungefärbt (Abb. 7 F,I).

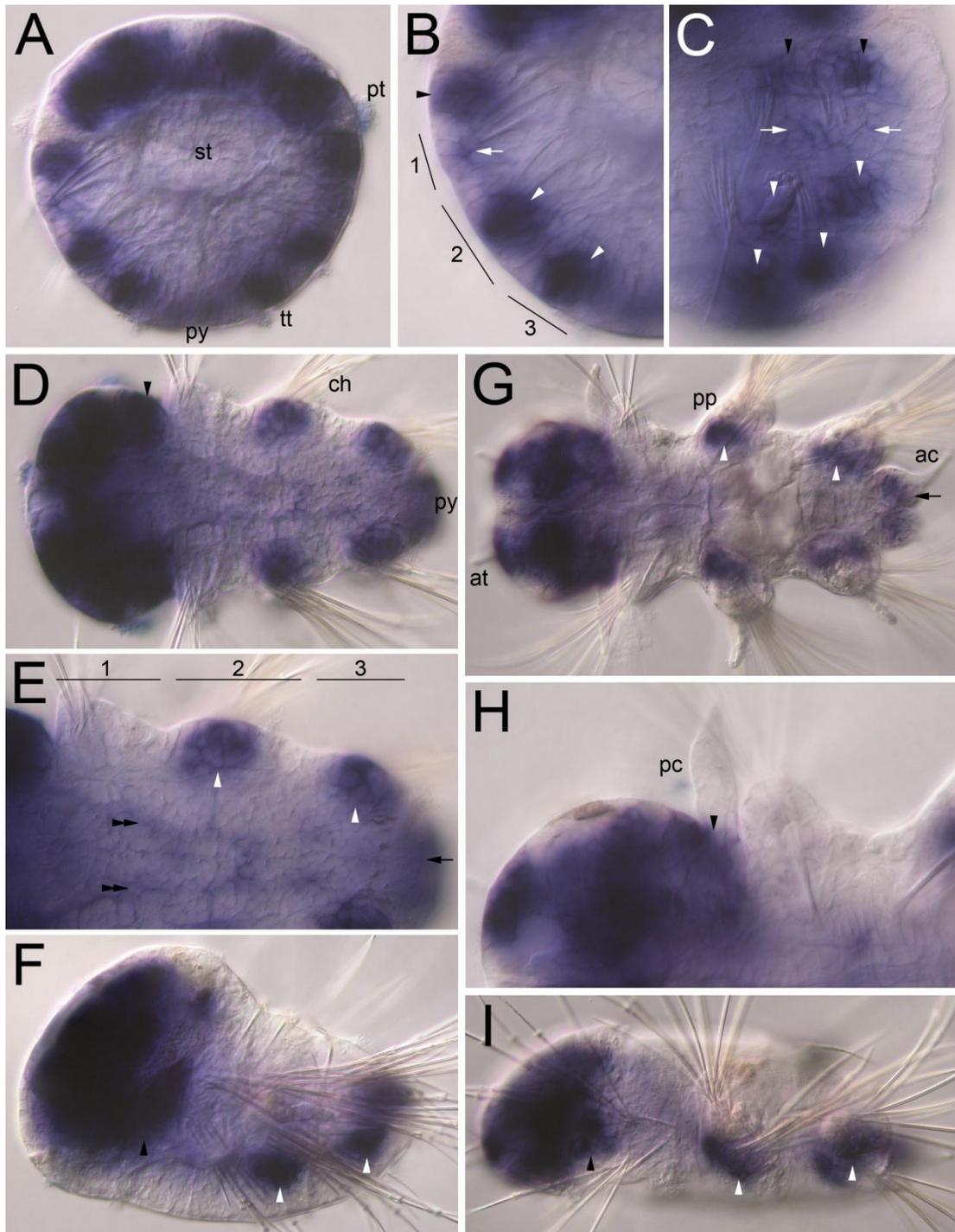


Abbildung 7: *Pdu-Dll* Expression in 48-, 72- und 96-Stunden alten Larven. *Whole mount in situ*-Hybridisierung.

(A) Ventralansicht mit (B) Detailvergrößerung der zukünftigen drei Segmente und (C) Lateralansicht (ventral ist rechts) einer 48-Stunden alten Larve, (D) Ventralansicht mit (E) Detailvergrößerung der drei Segmente und des Nervensystems und (F) Lateralansicht (ventral ist unten) einer 72-Stunden alten Larve, (G) Dorsalansicht mit (H) Detailvergrößerung des anterioren Dorsalcirrus und (I) Lateralansicht (ventral ist unten) einer 96-Stunden alten Larve. (ac) Analcirrus, (at) Antenne (ch) Chaeten, (pc) Peristomialcirrus, (pp) Parapodium, (pt) Prototroch, (py) Pygidium, (st) Stomodeum, (tt) Telotroch, (1,2,3) Segmente 1-3, schwarze Pfeilköpfe - Expression an der Basis des Peristomialcirrus, weiße Pfeilköpfe - Expression an der Basis beziehungsweise in den Parapodien des zweiten und dritten Segmentes, schwarze Pfeile - Expression im Pygidium, weiße Pfeile - Expression an der Basis der Parapodien des ersten Segmentes, schwarze Doppelpfeilköpfe - schwache Expression im Nervensystem.

Die Expression von *Pdu-Dll* in den Körperanhängen der Regenerate ist sehr gut zu erkennen, da es relativ wenig unspezifische Hintergrundfärbung und auch keine spezifischen Färbungen im Rumpf des Regenerates gibt. So kann man bereits in der Übersicht des Regenerates sehen, dass *Pdu-Dll* sowohl in den Parapodien als auch in den Analcirren exprimiert wird (Abb. 8 A). Schaut man sich die Expression in den Parapodien genauer an, so kann man unterschiedliche Domänen je nach Fokusebene differenzieren. Im Notopodium, dem dorsalen Teil des Parapodiums, ist in sehr jungen Parapodien die Expression sehr großflächig vertreten. Bereits nach wenigen Entwicklungsschritten verlagert sich diese Expression in den distalen Teil und den Dorsalcirrus. Dort verbleibt die Expression und ist in allen weiteren Entwicklungsstadien des Parapodiums nachzuweisen, lediglich die Ausdehnung und Intensität der Expression im Dorsalcirrus variiert etwas (Abb. 8 C,D). Im Neuropodium, dem ventralen Teil des Parapodiums, ist etwas Interessantes zu beobachten. In sehr jungen Parapodien ist zunächst nur eine großflächige Expressionsdomäne zu erkennen. Mit fortschreitender Entwicklung und zunehmendem Wachstum des Parapodiums teilt sich diese in zwei Domänen auf, wobei die eine im proximalen Teil verbleibt und die andere sich an die Basis des Ventralcirrus verlagert (Abb. 8 E,F). Neben den Parapodien zeigen auch die Analcirren und deren Basen starke *Pdu-Dll* Expression. Selbst in distalen Regionen der Analcirren ist noch leichte Expression nachzuweisen (Abb. 8 B). In den Querschnitten kann man die Verlagerungen der einzelnen Expressionsdomänen noch einmal aus einem anderen Blickwinkel betrachten. Auch hier sieht man wieder die großflächige Expression im Noto- und Neuropodium des jungen Parapodiums (Abb. 9 A,B). Mit fortlaufender Entwicklung und zunehmendem Wachstum verschiebt sich die Expression im Notopodium in den distalen Teil und in den Dorsalcirrus. Im Neuropodium beginnt sich die eine große in zwei kleinere Domänen zu teilen, wobei die eine im proximalen Teil an der Basis des Parapodiums verbleibt und die andere an die Basis des Ventralcirrus verlagert wird (Abb. 9 C,D). Die Expression im Notopodium verbleibt auch in alten Segmenten im distalen Teil und im Dorsalcirrus. Im Neuropodium haben sich die beiden Domänen vollständig getrennt. Dabei liegt die eine immer noch im proximalen Teil an der Basis des Parapodiums und die andere an der Basis des Ventralcirrus (Abb. 9 E,F).

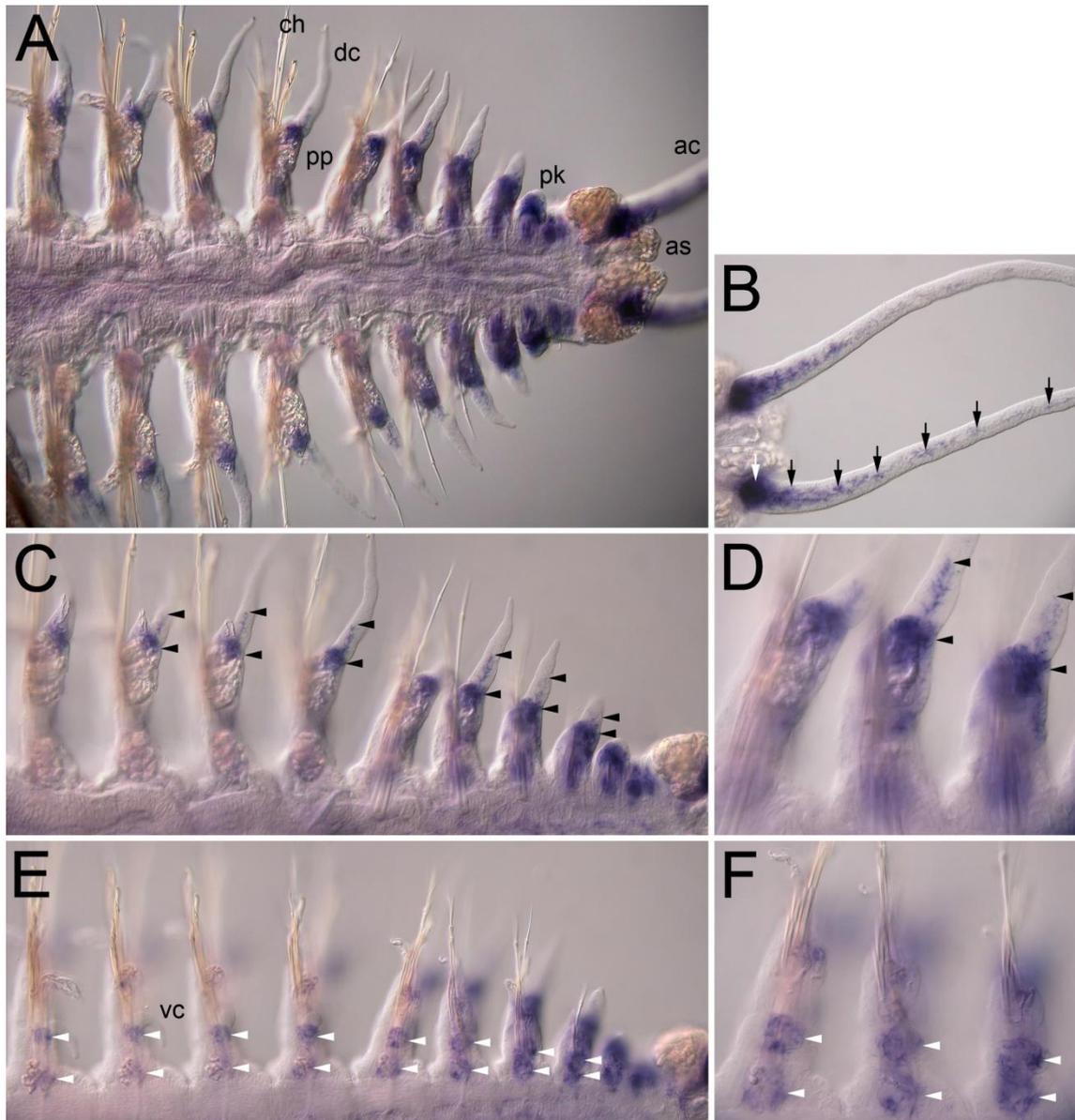


Abbildung 8: *Pdu-Dll* Expression in 16 Tage alten Regeneraten (Ventralansicht). *Whole mount in situ*-Hybridisierung.

(A) Übersicht des Regenerates, (B) Expression in den Analcirren, (C) Ventralansicht und (D) Detailvergrößerung der Parapodien mit dorsaler Fokusebene, (E) Ventralansicht und (F) Detailvergrößerung der Parapodien mit ventraler Fokusebene.

(ac) Analcirrus, (as) anale Spinndrüsen, (ch) Chaeten, (dc) Dorsalcirrus, (pk) Parapodienknospe, (pp) Parapodium, (vc) Ventralcirrus, schwarze Pfeilköpfe - Expression im Notopodium, weiße Pfeilköpfe - Expression im Neuropodium, schwarze Pfeile - Expression in den Analcirren, weißer Pfeil - Expression in der Basis der Analcirren.

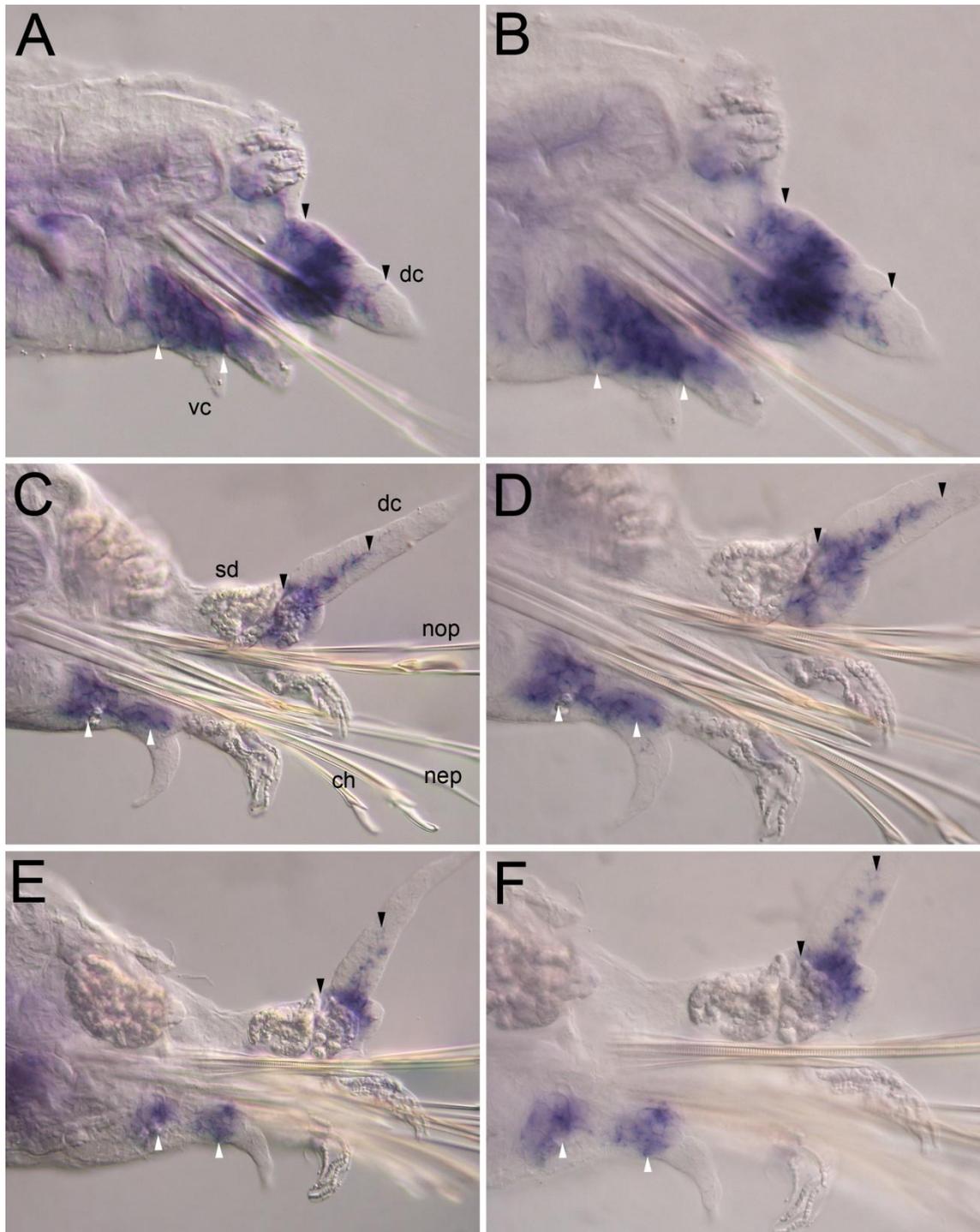


Abbildung 9: *Pdu-Dll* Expression in 16 Tage alten Regeneraten (Querschnitte). *Whole mount in situ*-Hybridisierung.

Querschnitt eines (A) jungen, (C) mittelalten und (E) alten Segmentes des Regenerates, (B,D,F) Vergrößerung des jeweiligen Querschnitts mit Fokus auf das Parapodium.

(ch) Chaeten, (dc) Dorsalcirrus, (nep) Neuropodium, (nop) Notopodium, (sd) Spinndrüse, (vc) Ventralcirrus, schwarze Pfeilköpfe - Expression im Notopodium, weiße Pfeilköpfe - Expression im Neuropodium.

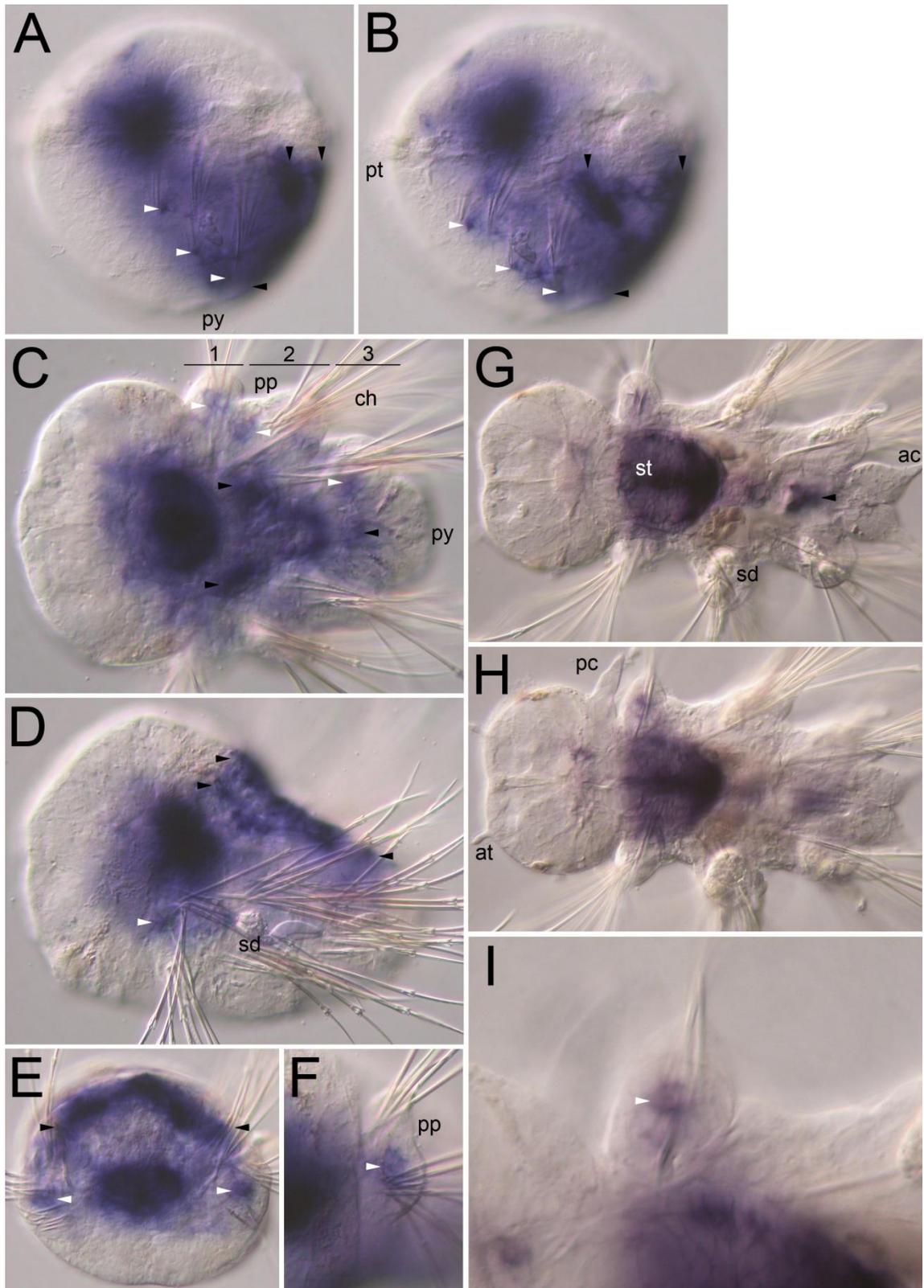
4.5. *Pdu-dpp* Expression

Die Expression von *Pdu-dpp* ist bei *Platynereis dumerilii* sowohl bei den Larven als auch in den Regeneraten im Vergleich zu den anderen untersuchten Genen deutlich schwächer ausgeprägt. Bei den 48-Stunden alten Larven kann man auch bei diesem Gen sowohl Expression im Kopf- als auch im Rumpfbereich erkennen. Allerdings ist die Expressionsdomäne im Kopf deutlich zentraler, im Bereich des Stomodeums zu finden. Die Expression im Rumpf besteht aus einer V-förmigen Domäne auf der Dorsalseite direkt unterhalb der Epidermis und weiteren Domänen beidseitig in jedem Segment im Bereich der Parapodien beziehungsweise deren Knospen (Abb. 10 A,B). Bei den 72-Stunden alten Larven ist die Expression auf der Dorsalseite besonders gut zu beobachten (Abb. 10 C,D,E). Die Expression in den Parapodien ist auch hier in der Dorsalansicht noch in jedem Segment gut erkennbar (Abb. 10 C). In der Lateral- und Frontalansicht kann man zusätzlich erkennen, dass die Expression in den Parapodien eher im dorsal liegenden Notopodium als im Neuropodium lokalisiert ist (Abb. 10 D,E,F). Die 96-Stunden alten Larven zeigen in der dorsalen subepidermalen Region und in den Parapodien fast keine Expression mehr. Die V-förmige Expression auf der Dorsalseite ist nur noch in der Nähe des Pygidiums zu erkennen (Abb. 10 G) und die in den Parapodien beschränkt sich auf eine sehr schwache Expression im ersten Parapodienpaar (Abb. 10 H,I). In den anderen Parapodienpaaren ist sie komplett verschwunden. Lediglich die Expression im Bereich des Stomodeums ist in allen drei Stadien gut zu erkennen.

Abbildung 10, nachfolgende Seite: *Pdu-dpp* Expression in 48-, 72- und 96-Stunden alten Larven. *Whole mount in situ*-Hybridisierung.

(A) Lateralansicht und (B) leicht gedrehte Lateralansicht (dorsal ist rechts) einer 48-Stunden alten Larve, (C) Dorsal-, (D) Lateral- und (E) Frontalansicht sowie eine (F) Detailvergrößerung des Parapodiums des ersten Segmentes einer 72-Stunden alten Larve (bei D und E - dorsal ist oben, bei F - dorsal ist unten), (G) Dorsalansicht mit dorsaler und (H) mittlere Fokusebene und (I) Detailvergrößerung des Parapodiums des ersten Segmentes.

(ac) Analcirrus, (at) Antenne, (ch) Chaeten, (pc) Peristomialcirrus, (pp) Parapodium, (pt) Prototroch, (py) Pygidium, (sd) Spinndrüse, (st) Stomodeum, (1,2,3) Segmente 1-3, schwarze Pfeilköpfe - V-förmige Expression unterhalb der Epidermis auf der Dorsalseite, weiße Pfeilköpfe - Expression an der Basis beziehungsweise in den Parapodien.

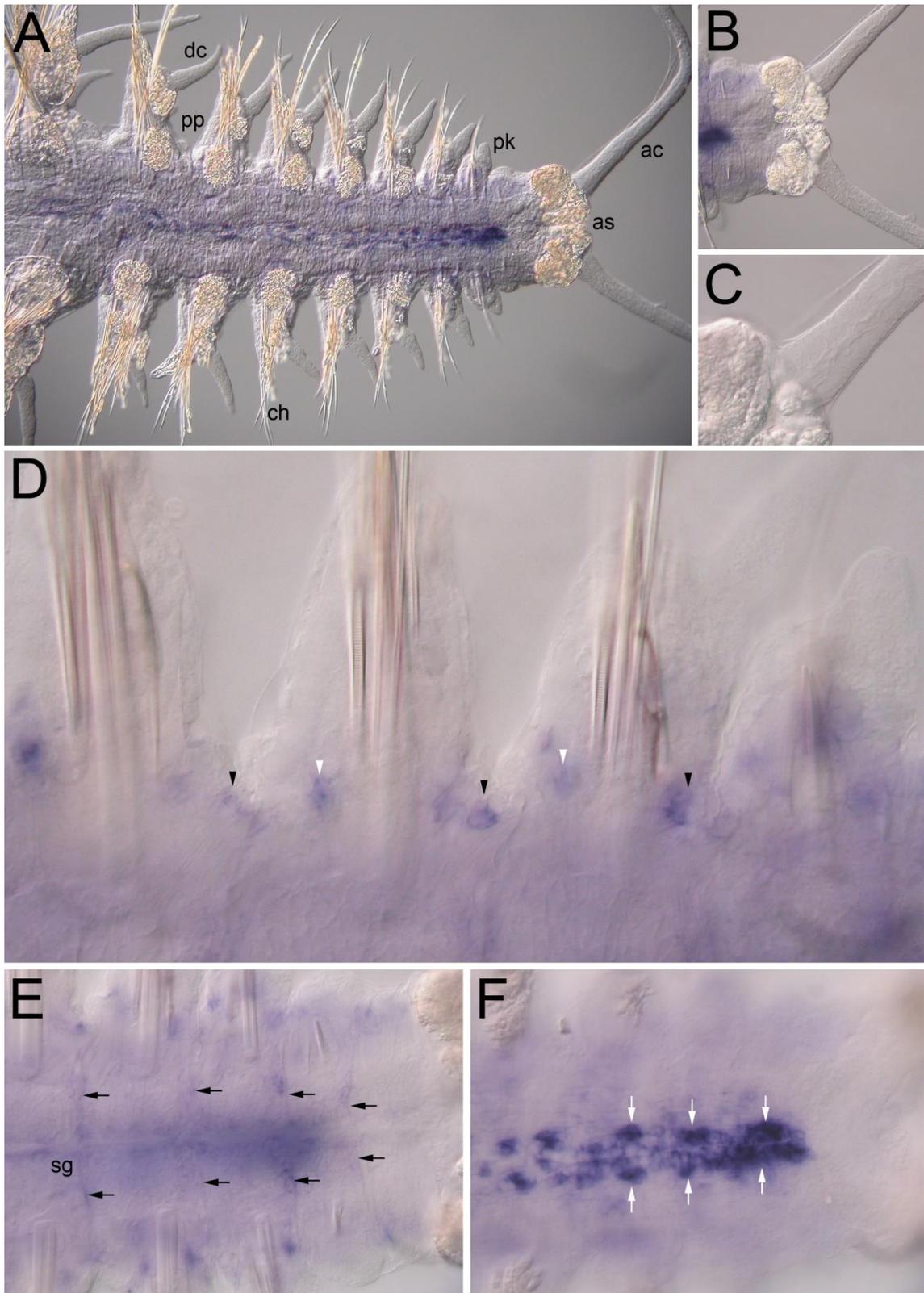


Die Expression von *Pdu-dpp* ist in den Regeneraten noch geringer ausgeprägt als in den Larven. In der Übersicht ist lediglich in der Mitte des Rumpfes Expression nachzuweisen, die mit fortschreitendem Entwicklungsgrad der Segmente schwächer wird (Abb. 11 A). Schaut man sich die Parapodien genauer an, so erkennt man jedoch zwei kleine Expressionsdomänen. Die eine liegt sehr nah an der Segmentgrenze und an der Basis des Parapodiums, während die andere eher im Zentrum und etwas weiter distal liegt (Abb. 11 D). Ob es sich hierbei um Expression im Noto- oder Neuropodium handelt, kann in dieser Ansicht noch nicht unterschieden werden. Die Analcirren zeigen keine *Pdu-dpp* Expression, weder an der Basis noch in den Cirren selbst (Abb. 11 B,C). Wie auch schon bei den Larven beobachtet, ist auch in den Regeneraten eine dorsal liegende Expression an der Mittellinie des Rumpfes wiederzufinden (Abb. 11 F). Des Weiteren gibt es auch noch schwache Expression im Rumpf in der Nähe der Segmentgrenzen (Abb. 11 E). Die Querschnitte beantworten die Frage nach der vertikalen Lage der Expression im Parapodium. Man kann hier gut erkennen, dass sich die Expression ausschließlich im Notopodium befindet und das Neuropodium komplett klar und ungefärbt ist (Abb. 12 B,D). Außerdem kann man beobachten, dass die Expression in den Parapodien nur über eine bestimmte Zeit nachzuweisen ist. In den älteren Segmenten ist sie komplett verschwunden (Abb. 12 E,F). Auch in den Querschnitten ist die dorsal liegende Expression in der Mitte des Rumpfes zu erkennen. Sie liegt horizontal zwischen den beiden dorsalen Muskelsträngen und vertikal zwischen dem Darm und der Epidermis (Abb. 12 A,C). Die schwache Färbung um den Darm herum ist wahrscheinlich auf die Expression im Bereich der Segmentgrenzen zurückzuführen, die in der Ventralansicht zu sehen ist (Abb. 12 A,C,D).

Abbildung 11, nachfolgende Seite: *Pdu-dpp* Expression in 16 Tage alten Regeneraten (Ventralansicht). *Whole mount in situ*-Hybridisierung.

(A) Übersicht des Regenerates, (B) Ventralansicht der Analcirren mit (C) Detailvergrößerung eines Analcirrus, (D) Ventralansicht der Parapodien mit Fokus auf die Expression im Notopodium, (E) Ventralansicht des Rumpfes mit einer mittleren Fokusebene, (F) Ventralansicht des Rumpfes mit dorsaler Fokusebene.

(ac) Analcirrus, (as) anale Spinndrüsen, (dc) Dorsalcirrus, (ch) Chaeten, (pk) Parapodienknospe, (pp) Parapodium, (sg) Segmentgrenze, schwarze Pfeilköpfe - Expression an der Basis des Parapodiums nahe der Segmentgrenze, weiße Pfeilköpfe - Expression im Zentrum des Notopodiums, schwarze Pfeile - Expression an den Segmentgrenzen, weiße Pfeile - dorsale Expression mit Nervensystemcharakteristik.



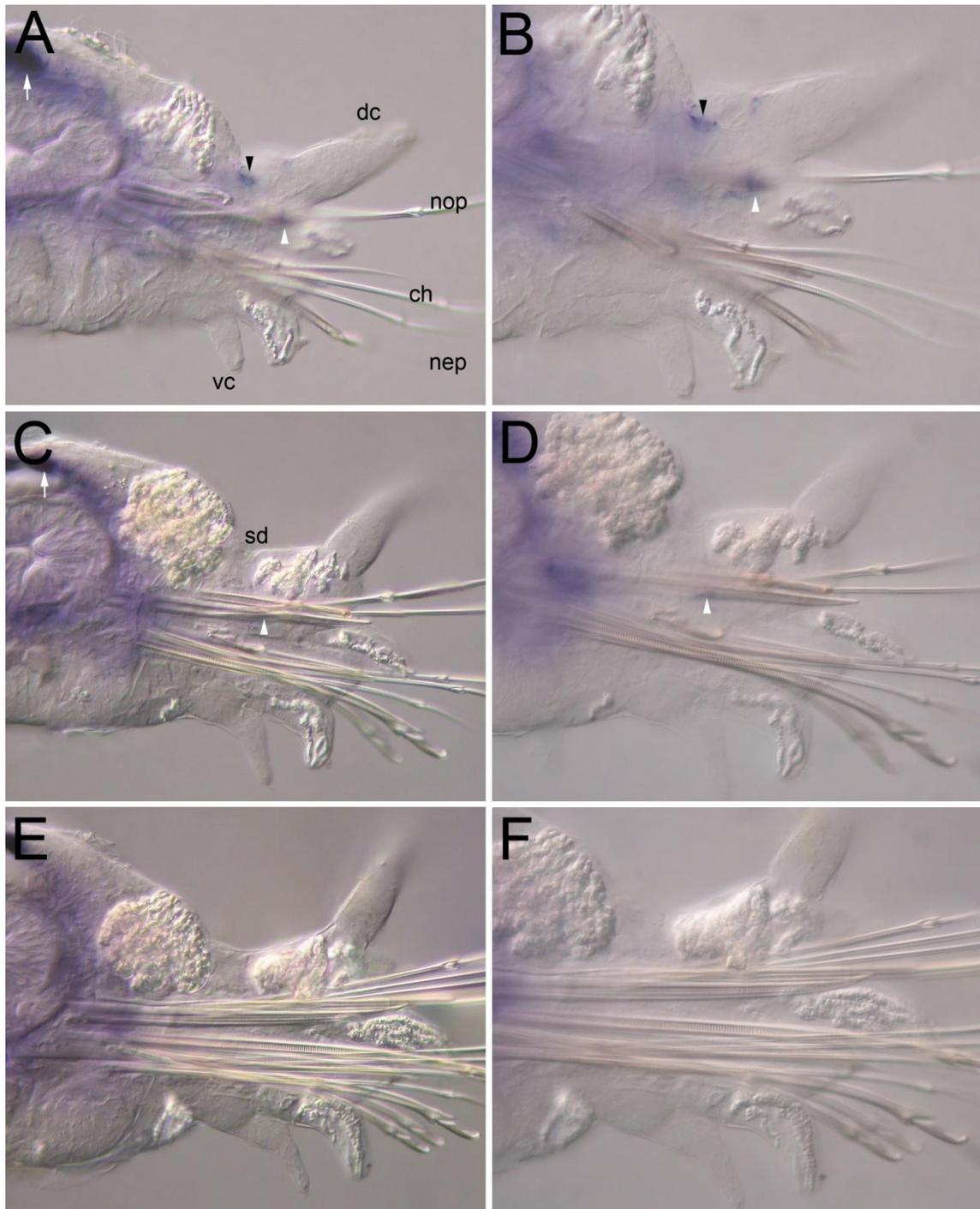


Abbildung 12: *Pdu-dpp* Expression in 16 Tage alten Regeneraten (Querschnitte). *Whole mount in situ*-Hybridisierung.

Querschnitt eines (A) jungen, (C) mittelalten und (E) alten Segmentes des Regenerates, (B,D,F) Vergrößerung des jeweiligen Querschnitts mit Fokus auf das Parapodium.

(ch) Chaeten, (dc) Dorsalcirrus, (nep) Neuropodium, (nop) Notopodium, (sd) Spinndrüse, (vc) Ventralcirrus, schwarze Pfeilköpfe - Expression an der Basis des oberen Notopodiums, weiße Pfeilköpfe - Expression im unteren Notopodium, weiße Pfeile - paarige Expression beidseitig neben der Mittellinie und oberhalb des Darms.

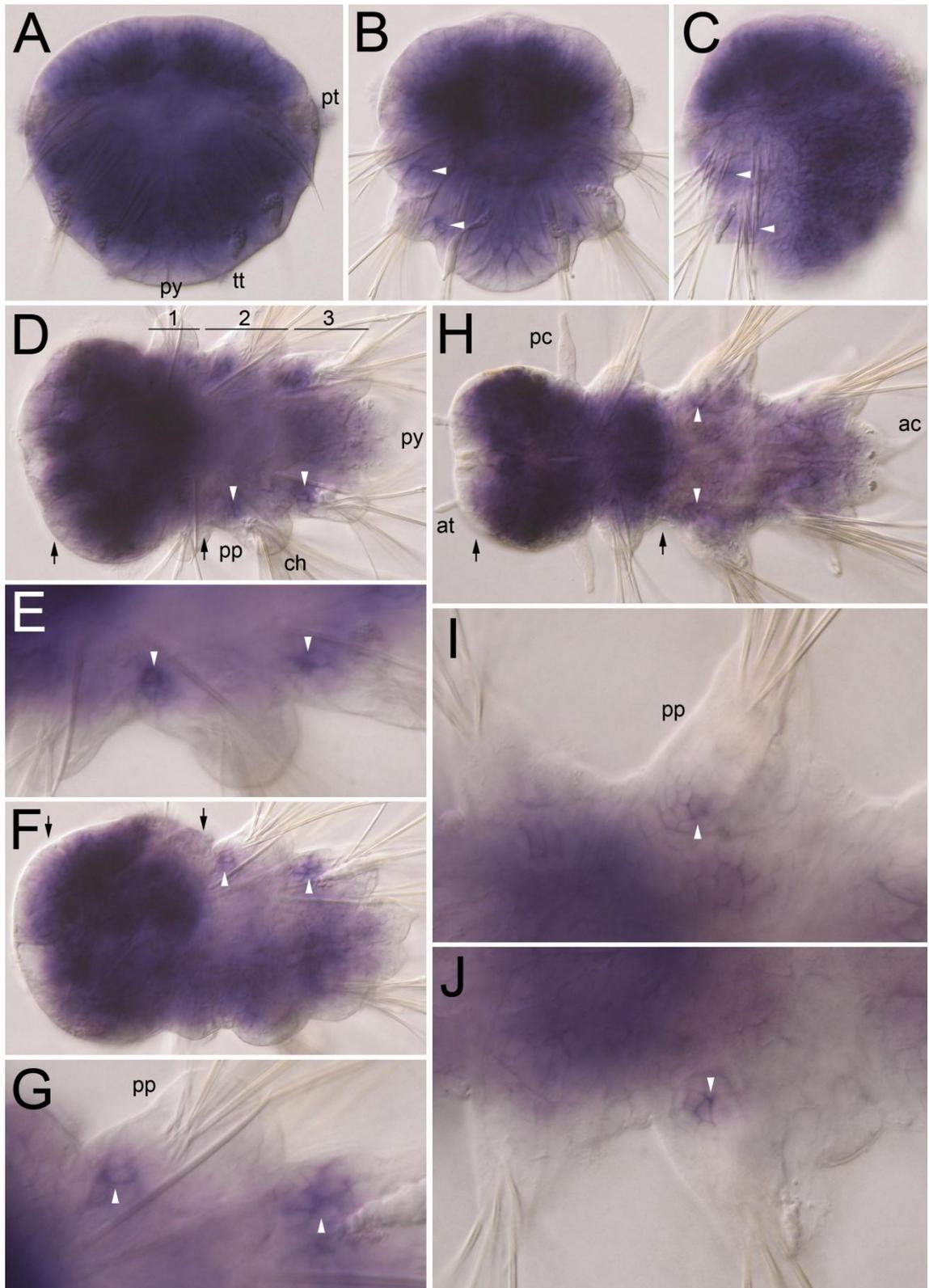
4.6. *Pdu-exd* Expression

Die Expression von *Pdu-exd* in Larven ist sehr großflächig, wodurch die Identifizierung von speziellen Expressionsdomänen erschwert wird. Da sich bei den 48-Stunden alten Larven keine genaue Aussage zu solchen Domänen treffen lässt (Abb. 13 A), wird ein Zwischenstadium von 58-Stunden alten Larven zur Beurteilung herangezogen. Bei diesen lässt sich das Expressionsmuster besser nachweisen. Im Kopfbereich aller Stadien ist nahezu überall Expression von *Pdu-exd* erkennbar (Abb. 13 B-D,F,H). In der Ventrolateralansicht der 58-Stunden alten Larve kann man auch noch sehen, dass die ventrale Seite fast komplett gefärbt ist (Abb. 13 C). Die Färbung, die den Kopfbereich ausfüllt, zieht sich bei den 72- und 96-Stunden alten Larven bis in das erste Segment hinein und endet dort abrupt (Abb. 13 D,H). Die Körperanhänge sind bei allen Stadien größtenteils ungefärbt. Lediglich die Parapodien weisen an der Basis nahe der anterioren Segmentgrenze eine Expressionsdomäne auf (Abb. 13 B,C,E-G,I,J).

Abbildung 13, nachfolgende Seite: *Pdu-exd* Expression in 48-, 58-, 72- und 96-Stunden alten Larven. *Whole mount in situ*-Hybridisierung.

(A) Ventralansicht einer 48-Stunden alten Larve, (B) Dorsal- und (C) Ventrolateralansicht (ventral ist rechts) einer 58-Stunden alten Larve, (D) Dorsalansicht mit (E) Detailvergrößerung der Parapodien und (F) Ventrolateralansicht (ventral ist unten) mit (G) Detailvergrößerung der Parapodien einer 72-Stunden alten Larve, (H) Ventralansicht einer 96-Stunden alten Larve, (I,J) ventrale Detailansicht der Parapodien einer 96-Stunden alten Larve.

(ac) Analcirrus, (at) Antenne, (ch) Chaeten, (pc) Peristomialcirrus, (pp) Parapodium, (pt) Prototroch, (py) Pygidium, (tt) Telotroch, (1,2,3) Segmente 1-3, weiße Pfeilköpfe - Expression an der Basis der Parapodiumsknospe beziehungsweise des Parapodiums nahe der anterioren Segmentgrenze, schwarze Pfeile - Expression im Kopfbereich und im ersten Segment,



In den Regeneraten ist wie bei den Larven eine relativ starke Expression vorhanden. Diese wird allerdings bereits nach wenigen Entwicklungsschritten schwächer, wie man im Übersichtsbild erkennen kann (Abb. 14 A). Im Gegensatz zu den Larven wird *Pdu-exd* hier auch in großen Teilen der Parapodien exprimiert. Im Notopodium reicht die Expression bis in den distalen Bereich hinein und lediglich die distale Spitze ist ungefärbt. Auch im Zentrum des Dorsalcirrus kann man Expression nachweisen, die aber wie auch der Rest der Expression mit fortschreitender Entwicklung abnimmt, bis sie schließlich komplett verschwunden ist (Abb. 14 C,D). Im Neuropodium ist etwas weniger Expression vorhanden, die zudem in der Ventralansicht meist durch die Expression im Notopodium verdeckt wird. In Segmenten, die in ihrer Entwicklung etwas weiter fortgeschritten sind, kann man aber auch in dieser Ansicht Expression erkennen. Sie liegt größtenteils zentral im proximalen Teil des Neuropodiums. Eine weitere kleine Expressionsdomäne findet sich direkt an der posterioren Segmentgrenze (Abb. 14 E). In den Analcirren zeigen einige wenige Zellen ebenfalls Expression. Dabei sind in der Nähe der Basis deutlich mehr exprimierende Zellen zu erkennen als in den distaleren Bereichen (Abb. 14 B). Des Weiteren kann man in der Ventralansicht noch die starke Expression im Rumpf beobachten, die allerdings aus dieser Ansicht keiner Struktur genau zugeordnet werden kann (Abb. 14 F). In den Querschnitten kann man die Abnahme der Expression während der Entwicklung gut beobachten. In den jungen Parapodien sieht man, dass die Zellen des Notopodiums fast alle *Pdu-exd* exprimieren. Eine Ausnahme stellen die Zellen der subepidermalen Zellschicht und die der distalen Spitze dar, in denen keinerlei Expression nachzuweisen ist. Im Neuropodium reicht die Expression hingegen nicht ganz so weit und ist eher auf den proximalen Teil beschränkt (Abb. 15 A,B). In den mittelalten Parapodien kann man nur noch schwache Expression im Notopodium nachweisen, die allerdings noch bis in den Dorsalcirrus reicht. Im Neuropodium ist die Expression nur noch sehr schwach an der Basis zu erkennen (Abb. 15 C,D). Betrachtet man die alten Parapodien, so lässt sich dort gar keine Expression mehr nachweisen (Abb. 15 E,F). In den Querschnitten kann man die Expression im Rumpf dem Bereich des Nervensystems zuordnen, die wie auch die restliche Expression mit zunehmendem Entwicklungsalter abnimmt (Abb. 15 A,C,E).

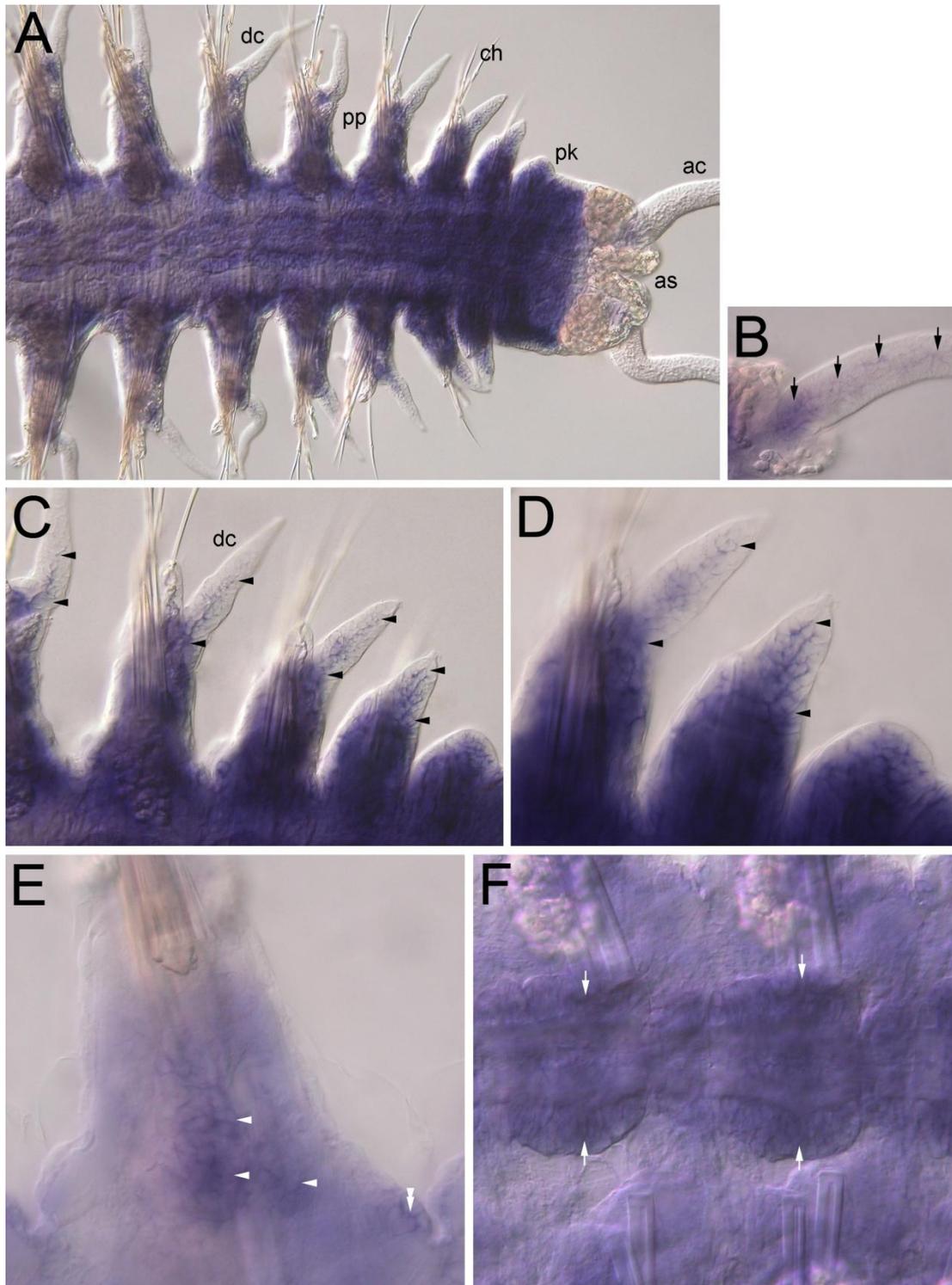


Abbildung 14: *Pdu-exd* Expression in 16 Tage alten Regeneraten (Ventralansicht). *Whole mount in situ*-Hybridisierung.

(A) Übersicht des Regenerates, (B) Ventralansicht einer der beiden Analcirren, (C) Ventralansicht und (D) Detailvergrößerung der Parapodien mit dorsaler Fokusebene, (E) ventrale Detailansicht eines Parapodiums mit ventraler Fokusebene, (F) Ventralansicht des Rumpfes mit einer mittleren Fokusebene.

(ac) Analcirrus, (as) anale Spinndrüsen, (ch) Chaeten, (dc) Dorsalcirrus, (pk) Parapodienknospe, (pp) Parapodium, schwarze Pfeilköpfe - Expression im Dorsalcirrus, weiße Pfeilköpfe - Expression im Neuropodium, schwarze Pfeile - Expression in den Analcirren, weiße Pfeile - Expression im zentralen Rumpfbereich, weißer Doppelpfeil - Expression im Neuropodium an der Segmentgrenze.

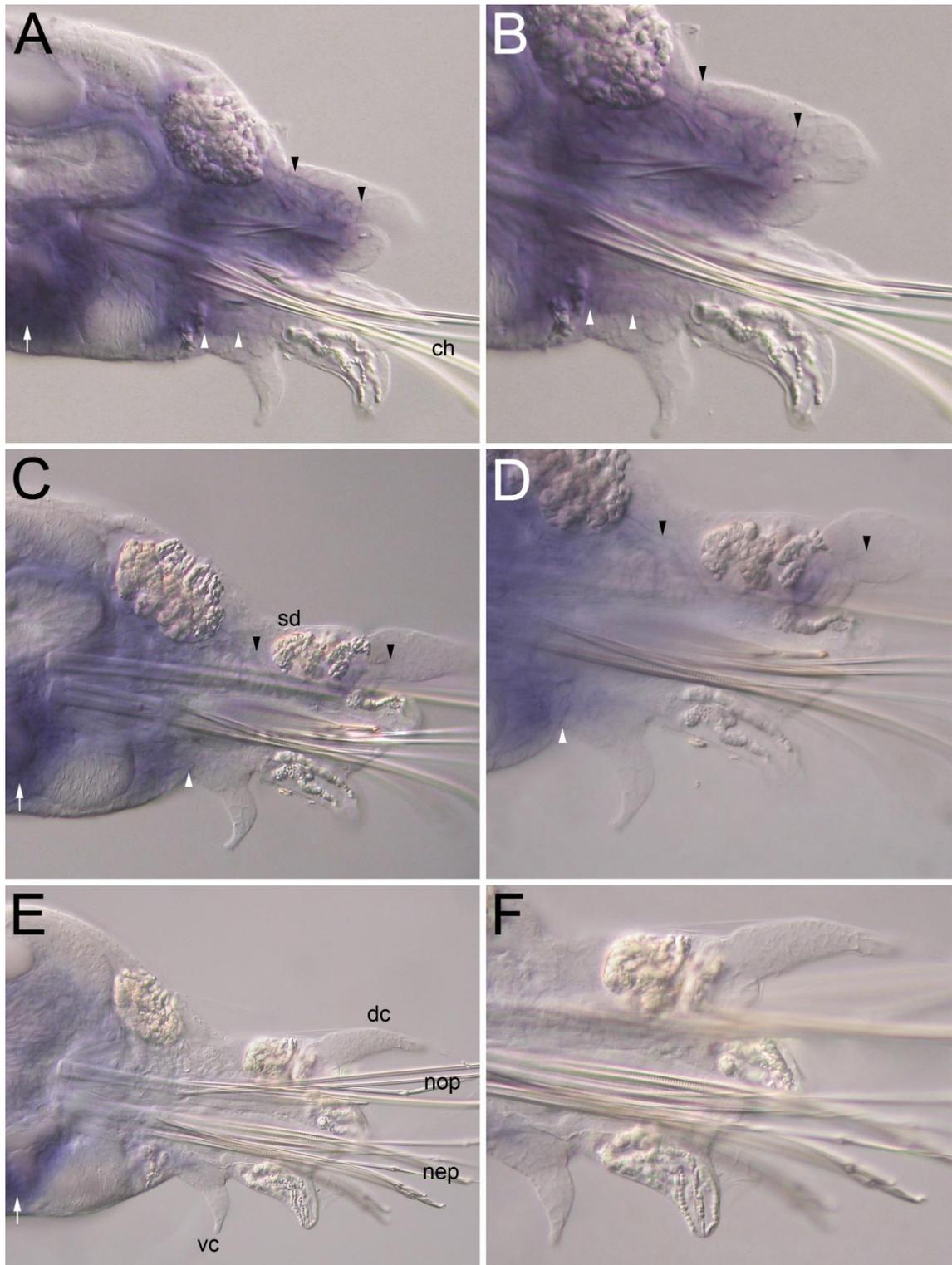


Abbildung 15: *Pdu-exd* Expression in 16 Tage alten Regeneraten (Querschnitte). Whole mount in situ-Hybridisierung.

Querschnitt eines (A) jungen, (C) mittelalten und (E) alten Segmentes des Regenerates, (B,D,F) Vergrößerung des jeweiligen Querschnitts mit Fokus auf das Parapodium.

(ch) Chaeten, (dc) Dorsalcirrus, (nep) Neuropodium, (nop) Notopodium, (sd) Spinndrüse, (vc) Ventralcirrus, schwarze Pfeilköpfe - Expression im Notopodium, weiße Pfeilköpfe - Expression im Neuropodium, weiße Pfeile - starke Expression im Bereich des Nervensystems.

4.7. *Pdu-hth* Expression

Wie bei *Pdu-exd* muss für *Pdu-hth* wieder ein Zwischenstadium der Larvenentwicklung zur Beurteilung herangezogen werden, da die Expression bei den 48-Stunden alten Larven wenig aussagekräftig ist (Abb. 16 C,D). Bei den 58-Stunden alten Larven kann man im Kopfbereich drei Expressionsdomänen erkennen. Eine davon liegt zentral und relativ nah unterhalb der Epidermis. Die beiden anderen liegen paarig links und rechts von der Mittellinie und etwas weiter in Richtung des Prototrochs. Im Rumpf zeigen sich ebenfalls mehrere Expressionsdomänen. Eine davon liegt im ersten Segment und zieht sich wie ein Band von der ventralen Mittellinie beidseitig bis knapp über die laterale Mittellinie. Auch in den anderen beiden Segmenten ist eine ventral liegende Expression zu erkennen, die allerdings auf die Ventralseite begrenzt ist. An der Basis der Parapodien der ersten beiden Segmente ist ebenfalls Expression nachzuweisen (Abb. 16 A,B). Das typische Muster der drei Domänen im Kopfbereich findet sich sowohl in den 72- als auch in den 96-Stunden alten Larven wieder (Abb. 16 E,H). Die auf das erste Segment beschränkte starke Expression kann in den 72-Stunden alten Larven noch gut beobachtet werden (Abb. 16 E,F). Außerdem sieht man, dass die Expression an der Basis der Parapodien sowohl im Noto- als auch im Neuropodium lokalisiert (Abb. 16 G) und ebenso im dritten Segment vorhanden ist (Abb. 16 E-G). In den 96-Stunden alten Larven ist die Expression im ersten Segment nicht mehr so klar als Band zu erkennen (Abb. 16 H) und auch die Expression an der Basis der Parapodien ist deutlich schwächer geworden (Abb. 16 I).

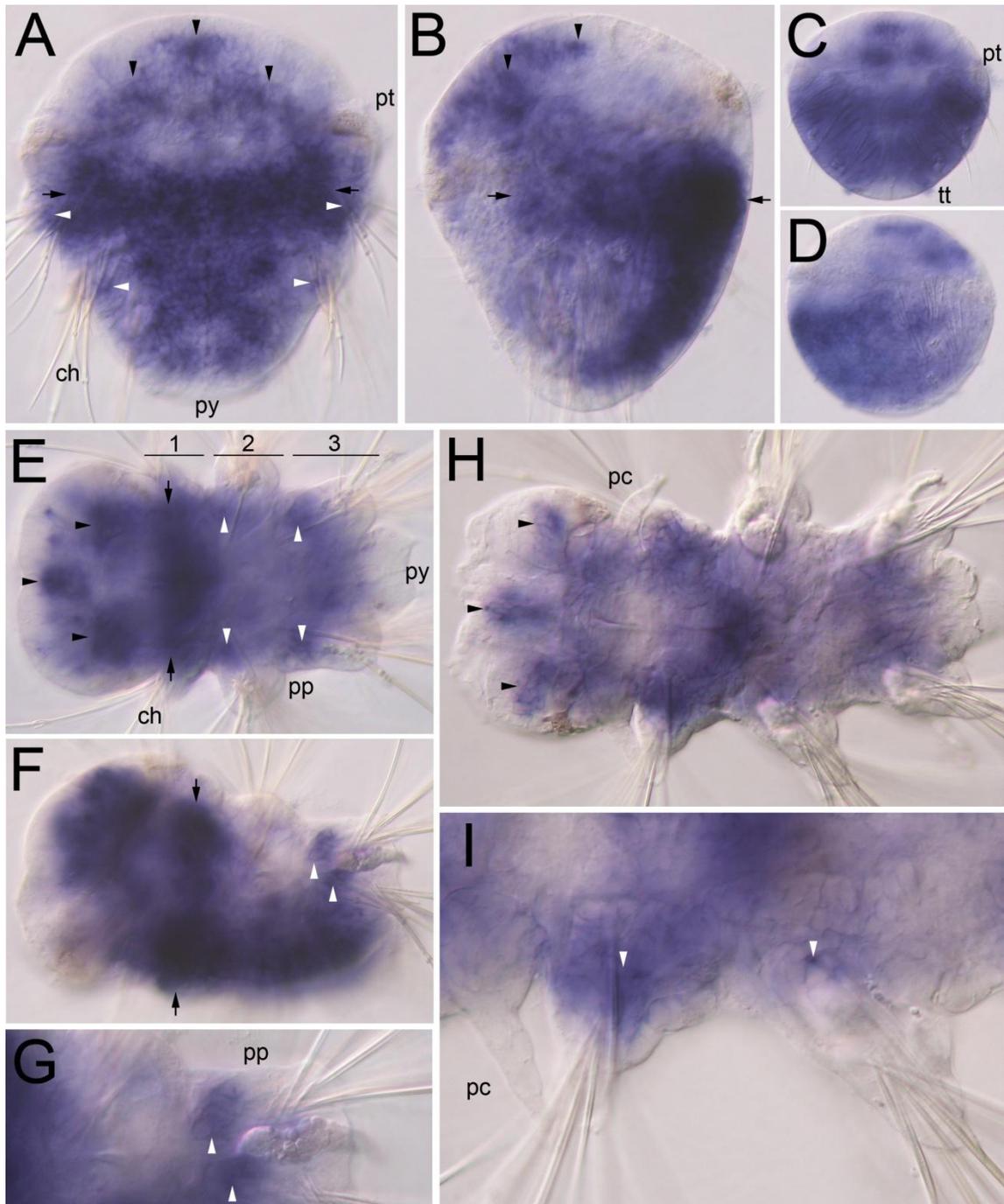


Abbildung 16: *Pdu-hth* Expression in 48-, 58-, 72- und 96-Stunden alten Larven. Whole mount *in situ*-Hybridisierung.

(A) Ventral- und (B) Lateralansicht (ventral ist rechts) einer 58-Stunden alten Larve, (C) Dorsal- und (D) Lateralansicht (ventral ist links) einer 48-Stunden alten Larve, (E) Dorsal- und (F) Ventrolateralansicht (ventral ist unten) mit (G) Detailvergrößerung des zweiten Parapodiums, (H) Ventralansicht mit (I) Detailvergrößerung der ersten beiden Parapodien.

(ch) Chaeten, (pc) Peristomialcirrus, (pp) Parapodium, (pt) Prototroch, (py) Pygidium, (tt) Telotroch, (1,2,3) Segmente 1-3, schwarze Pfeilköpfe - Expression im Kopfbereich, weiße Pfeilköpfe - Expression in den Parapodienknospen beziehungsweise Parapodien (sowohl im Noto- als auch im Neuropodium), schwarze Pfeile - starke Expression im ersten Segment.

Im Vergleich zu *Pdu-exd* ist das Expressionsmuster von *Pdu-hth* sehr ähnlich. In den Regeneraten ist *Pdu-hth* relativ großflächig exprimiert und auch hier nimmt die Intensität der Expression während der Entwicklung stetig ab (Abb. 17 A). Im Notopodium ist annähernd überall Expression nachzuweisen, wobei die Ausnahme auch hier wie bei *Pdu-exd* die distale Spitze darstellt. Im Zentrum des Dorsalcirrus ist ebenfalls Expression vorhanden, die allerdings erst mit voranschreitender Entwicklung des Parapodiums sichtbar wird und sich dann mit dem wachsenden Cirrus in distaler Richtung ausbreitet (Abb. 17 D,E). Die Expression im Neuropodium ist schwächer und auch nicht so großflächig wie im Notopodium. Sie reicht etwa bis zur Mitte des Parapodiums (Abb. 17 F). In den Analcirren sind jeweils nur zwei kleine Expressionsdomänen zu erkennen, die sich in der Nähe der Basis befinden (Abb. 17 B,C). Im Rumpf findet sich auch bei *Pdu-hth* eine starke Expression, die jedoch erst in den Querschnitten strukturell genauer zuzuordnen ist (Abb. 17 G). Die Querschnitte der einzelnen Segmente zeigen auch hier wieder gut, wie die Expression während der Entwicklung abnimmt. In den jungen Segmenten wird *Pdu-hth* im Notopodium mit Ausnahme der distalen Spitze und des Dorsalcirrus exprimiert (Abb. 18 A,B). Bei fortschreitender Entwicklung reicht die Expression auch bis in den Dorsalcirrus hinein, wobei allerdings deren Ausprägungsgrad im Parapodium insgesamt abnimmt (Abb. 18 C,D). In den ältesten Parapodien ist schließlich Expression weder im Noto- noch im Neuropodium sichtbar (Abb. 18 E,F). Die bereits in der Ventralansicht deutlich hervortretende Expression im Rumpf ist sowohl im Bereich des Nervensystems als auch um den Darm herum zu lokalisieren (Abb. 18 A,C,E).

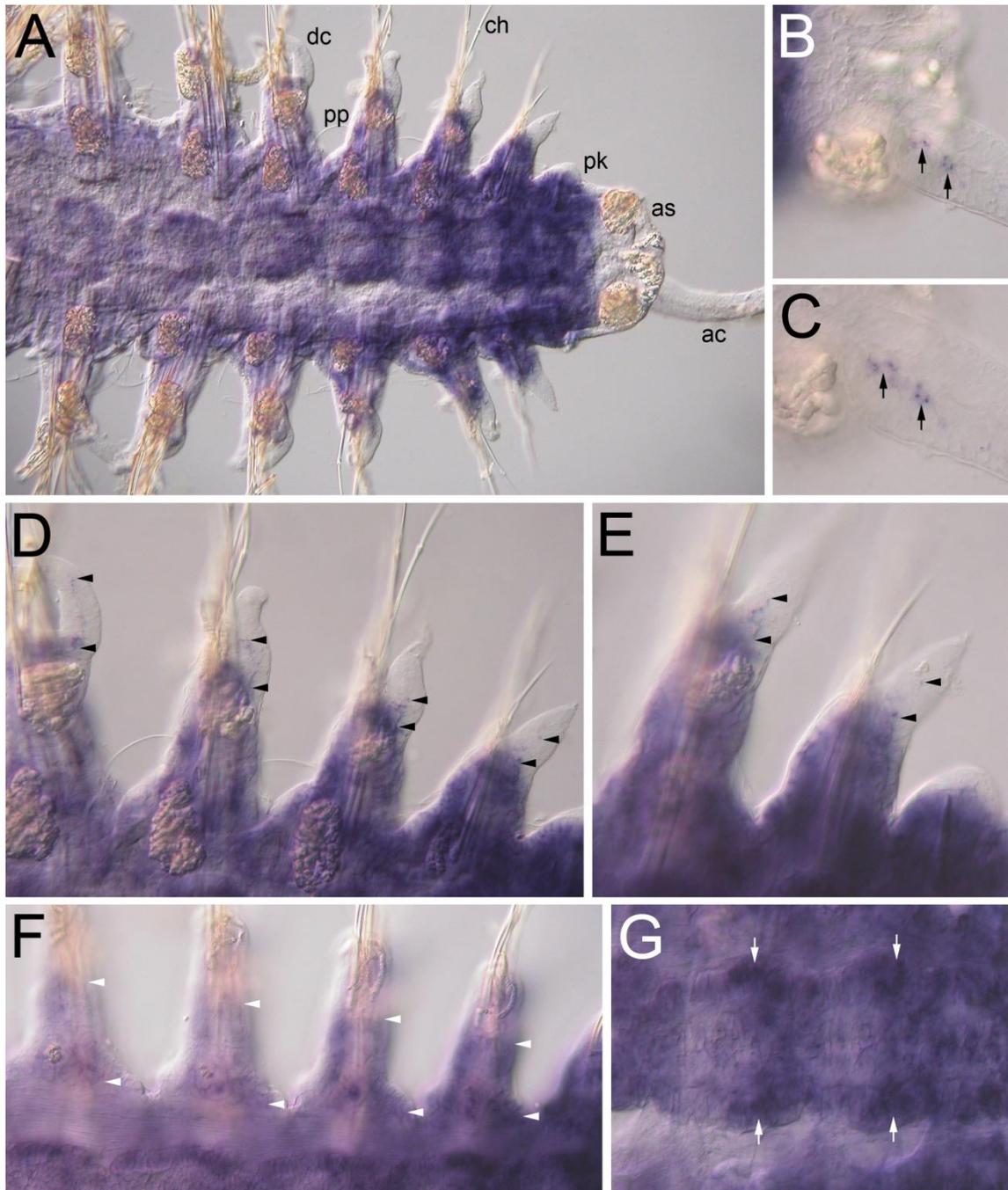


Abbildung 17: *Pdu-hth* Expression in 16 Tage alten Regeneraten (Ventralansicht). *Whole mount in situ*-Hybridisierung.

(A) Übersicht des Regenerates, (B) Ventralansicht mit (C) Detailvergrößerung einer der beiden Analcirren, (D) Ventralansicht und (E) Detailvergrößerung der Parapodien mit dorsaler Fokusebene, (F) Ventralansicht der Parapodien mit ventraler Fokusebene, (G) Ventralansicht des Rumpfes mit einer mittleren Fokusebene.

(ac) Analcirrus, (as) anale Spinndrüsen, (ch) Chaeten, (dc) Dorsalcirrus, (pk) Parapodienknospe, (pp) Parapodium, schwarze Pfeilköpfe - Expression im Dorsalcirrus, weiße Pfeilköpfe - Expression im Neuropodium, schwarze Pfeile - Expression in den Analcirren, weiße Pfeile - Expression im zentralen Rumpfbereich.

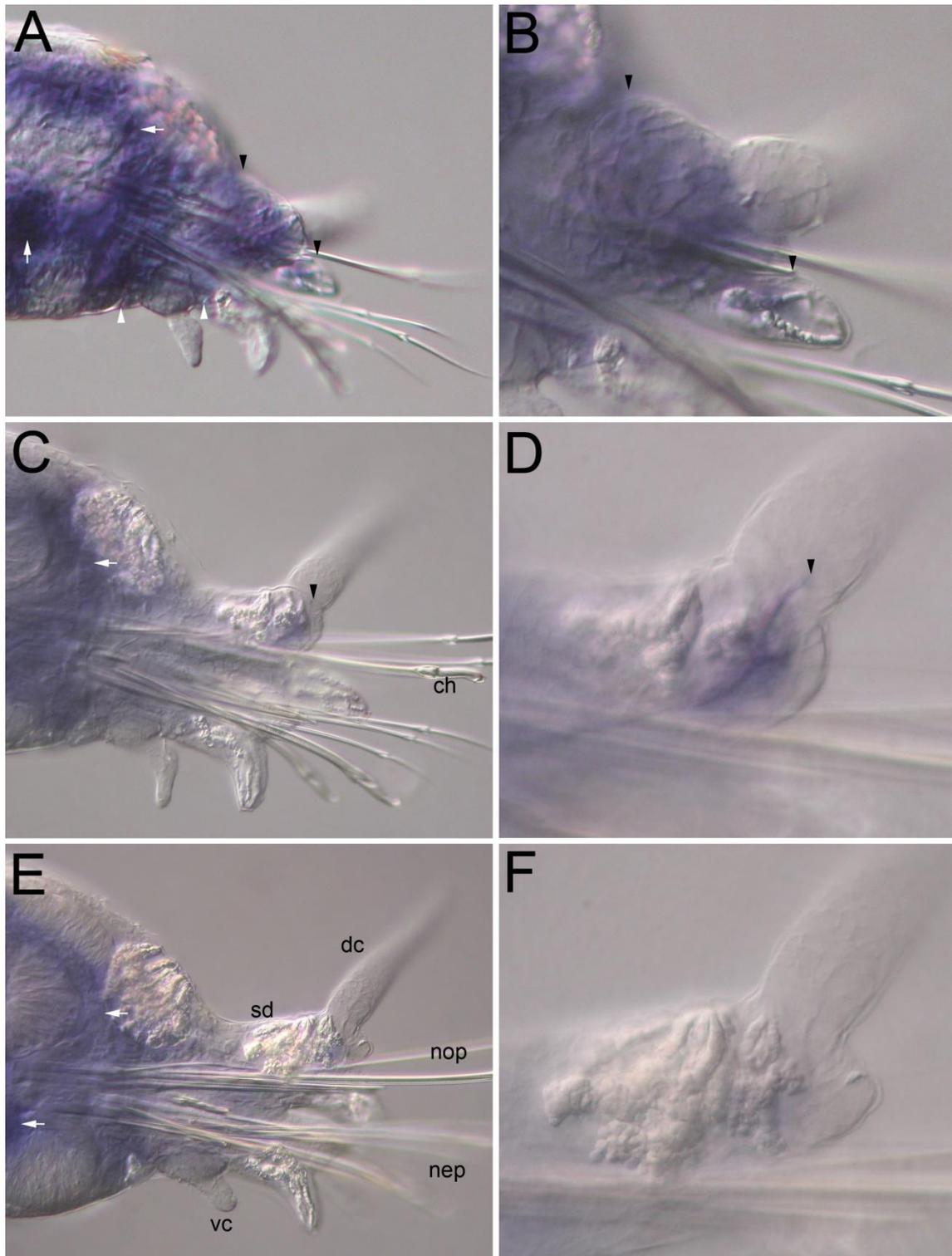


Abbildung 18: *Pdu-hth* Expression in 16 Tage alten Regeneraten (Querschnitte). *Whole mount in situ*-Hybridisierung.

Querschnitt eines (A) jungen, (C) mittelalten und (E) alten Segmentes des Regenerates, (B,D,F) Vergrößerung des jeweiligen Querschnitts mit Fokus auf das Parapodium beziehungsweise den Dorsalcirrus.

(ch) Chaeten, (dc) Dorsalcirrus, (nep) Neuropodium, (nop) Notopodium, (sd) Spinndrüse, (vc) Ventralcirrus, schwarze Pfeilköpfe - Expression im Notopodium, weiße Pfeilköpfe - Expression im Neuropodium, weiße Pfeile - Expression im Bereich des Nervensystems und des Darms.

4.8. *Pdu-sp/btd* Expression

Die Expression von *Pdu-sp/btd* ist in den Larven sehr gut zu beobachten. Im Kopfbereich befinden sich vier Expressionsdomänen, zwei im anterioren und zwei im lateralen Bereich des Kopfes. Diese sind in allen untersuchten Stadien sichtbar, werden mit fortschreitender Entwicklung aber deutlich schwächer (Abb. 19 A,C,E). Sie liegen alle in der dorsoventralen Achse relativ mittig (Abb. 19 B). Auch im Stomodeum wird *Pdu-sp/btd* exprimiert. Im Rumpfbereich sind in der Ventralansicht der 48-Stunden alten Larven auf jeder Seite vier Expressionsdomänen erkennbar. Eine liegt direkt posterior des Prototrochs und die anderen sind in den drei Segmenten lokalisiert, wo sich später die Parapodien bilden. Um die ventrale Mittellinie herum liegt eine weitere großflächige Expressionsdomäne, von der zu jeder der seitlich liegenden Domänen ein Ausläufer entspringt (Abb. 19 A). In der Lateralansicht erkennt man, dass es sich bei den hinteren drei seitlich liegenden Expressionsdomänen um Paare handelt, wobei eine ventral und die andere dorsal der lateralen Mittellinie liegt. Außerdem sieht man, dass die Expressionsdomäne direkt posterior des Prototrochs deutlich stärker in der Ausbreitung beschränkt ist als die übrigen drei Domänen und auch nicht paarig vertreten ist (Abb. 19 B). In den 72-Stunden alten Larven kann man ebenfalls Expression in den drei Segmenten im Bereich der Parapodien nachweisen. Das Gen wird sowohl im posterioren Teil als auch an der Basis des Parapodiums exprimiert. Des Weiteren ist die Expression um die ventrale Mittellinie deutlich schwächer geworden und die zuvor sichtbaren Ausläufer zu den seitlich liegenden Domänen sind verschwunden. (Abb. 19 C,D). Bei den 96-Stunden alten Larven sieht man, dass die Expression direkt posterior des Prototrochs in der Basis der sich nun bildenden Peristomialcirren liegt. Die Expression im posterioren Teil der Parapodien wird schwächer und ist an deren Basis gar nicht mehr nachzuweisen (Abb. 19 E). In der Lateralansicht sieht man jedoch immer noch, dass in beiden Teilen, sowohl im Noto- als auch im Neuropodium, Expression zu finden ist (Abb. 19 F).

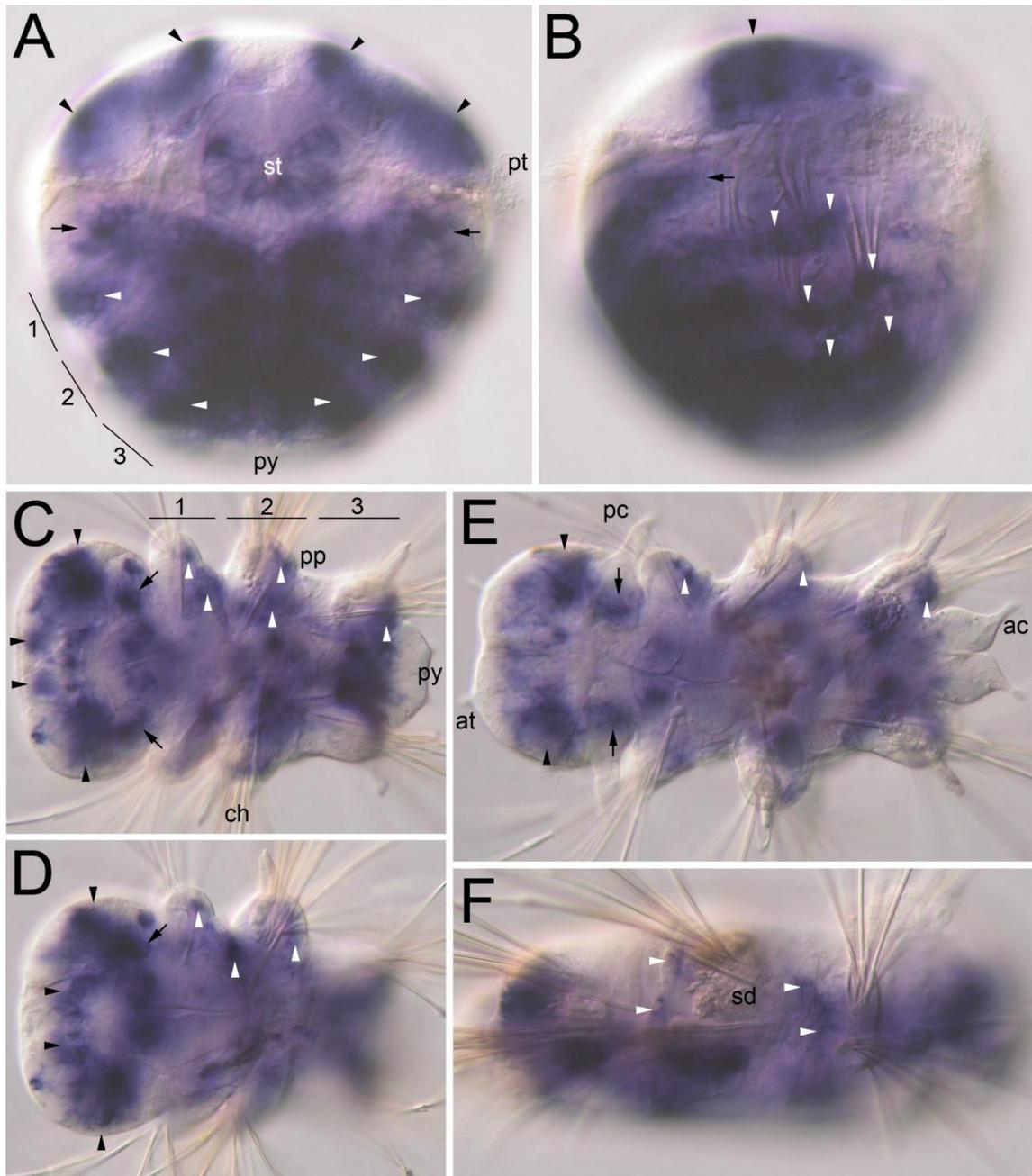


Abbildung 19: *Pdu-sp/btd* Expression in 48-, 72- und 96-Stunden alten Larven. *Whole mount in situ*-Hybridisierung.

(A) Ventral- und (B) Lateralansicht (ventral ist links) einer 48-Stunden alten Larve, (C) Ventral- und (D) leicht nach anterior gekippte Ventralansicht einer 72-Stunden alten Larve, (E) Dorsal- und (F) Lateralansicht (anterior ist rechts und ventral ist unten) einer 96-Stunden alten Larve.

(ac) Analcirrus, (at) Antenne, (ch) Chaeten, (pc) Peristomialcirrus, (pp) Parapodium, (pt) Prototroch, (py) Pygidium, (sd) Spinndrüse, (1,2,3) Segmente 1-3, schwarze Pfeilköpfe - Expression im Kopfbereich, weiße Pfeilköpfe - Expression in den Parapodienknospen beziehungsweise Parapodien (sowohl im Noto- als auch im Neuropodium), schwarze Pfeile - Expression an der Basis des anterioren Dorsalcirrus.

Die Expression von *Pdu-sp/btd* ist in den Regeneraten sowohl im Rumpf als auch in den Körperanhängen nachzuweisen (Abb. 20 A). In den jungen Parapodien kann man vor allem im Notopodium Expression erkennen, die sich während der Entwicklung in die eher distalen Bereiche verlagert und dabei an Intensität verliert (Abb. 20 D,E). Im Neuropodium ist die Expression generell schwächer und verbleibt in der proximalen Region (Abb. 20 F). In den Dorsal- und Ventralcirren der Parapodien ist hingegen keine Expression zu beobachten. Die Analcirren zeigen nur sehr wenig Expression in der Nähe der Basis, die von wenigen Zellen hervorgerufen wird (Abb. 20 B,C). Im Rumpf ist kurz vor der posterioren Segmentgrenze relativ zentral eine paarig, links und rechts der Mittellinie auftretende Expression zu erkennen. Eine weitere Expressionsdomäne liegt etwas versetzt und mehr lateral als die zuvor genannte (Abb. 20 F). Die Querschnitte belegen wie bei den anderen untersuchten Genen die nur transiente Aktivität von *Pdu-sp/btd*. So ist die Expression in den jungen Segmenten am stärksten vertreten. Hier sieht man auch, dass die Expression im Notopodium im Gegensatz zu der im Neuropodium relativ großflächig ist (Abb. 21 A,B). Im mittelalten und ältesten Segment kann man schließlich erkennen, dass sich die Expression im Notopodium leicht in distaler Richtung verschiebt und dabei auch an Intensität verliert. Die Expression im Neuropodium ist in den ältesten Segmenten fast gar nicht mehr nachzuweisen (Abb. 21 D,F). Die Expression im Rumpf kann anhand der Querschnitte dem Bereich des Nervensystems und dem Bereich ventrolateral des Darms zugeordnet werden. Auch diese Expression wird bei fortschreitender Entwicklung schwächer (Abb. 21 A,C,E).

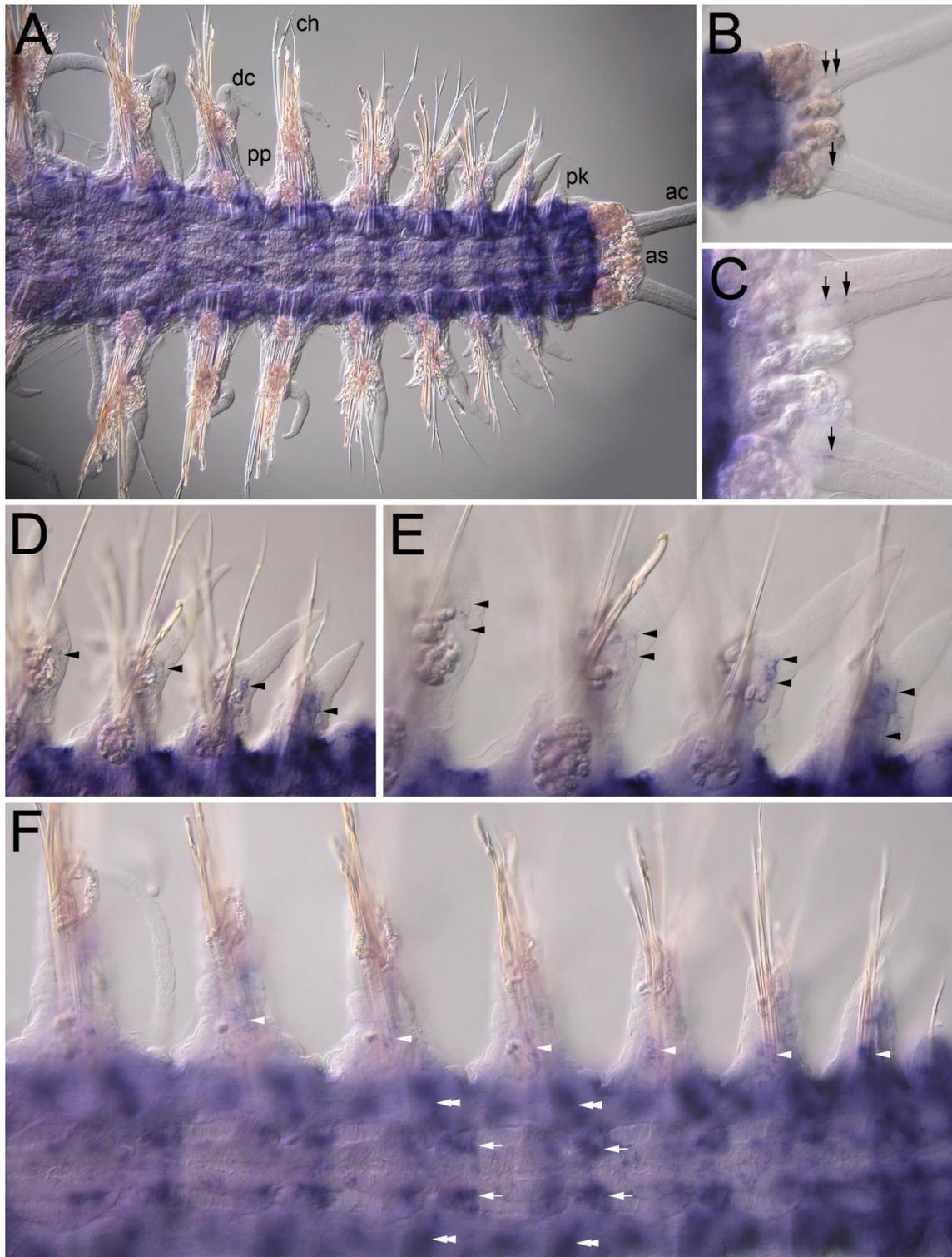


Abbildung 20: *Pdu-sp/btd* Expression in 16 Tage alten Regeneraten (Ventralansicht). *Whole mount in situ*-Hybridisierung.

(A) Übersicht des Regenerates, (B) Ventralansicht mit (C) Detailvergrößerung der beiden Analcirren, (D) Ventralansicht mit (E) Detailvergrößerung der Parapodien mit dorsaler Fokusebene, (F) Ventralansicht der Parapodien und des Rumpfes mit ventraler Fokusebene.

(ac) Analcirrus, (as) anale Spinndrüsen, (ch) Chaeten, (dc) Dorsalcirrus, (pk) Parapodienknospe, (pp) Parapodium, schwarze Pfeilköpfe - Expression im Notopodium, weiße Pfeilköpfe - Expression im Neuropodium, schwarze Pfeile - Expression in den Analcirren, weiße Pfeile - Expression im Bereich des Nervensystems, weiße Doppelpfeilköpfe - Expression schräg unterhalb des Darms.

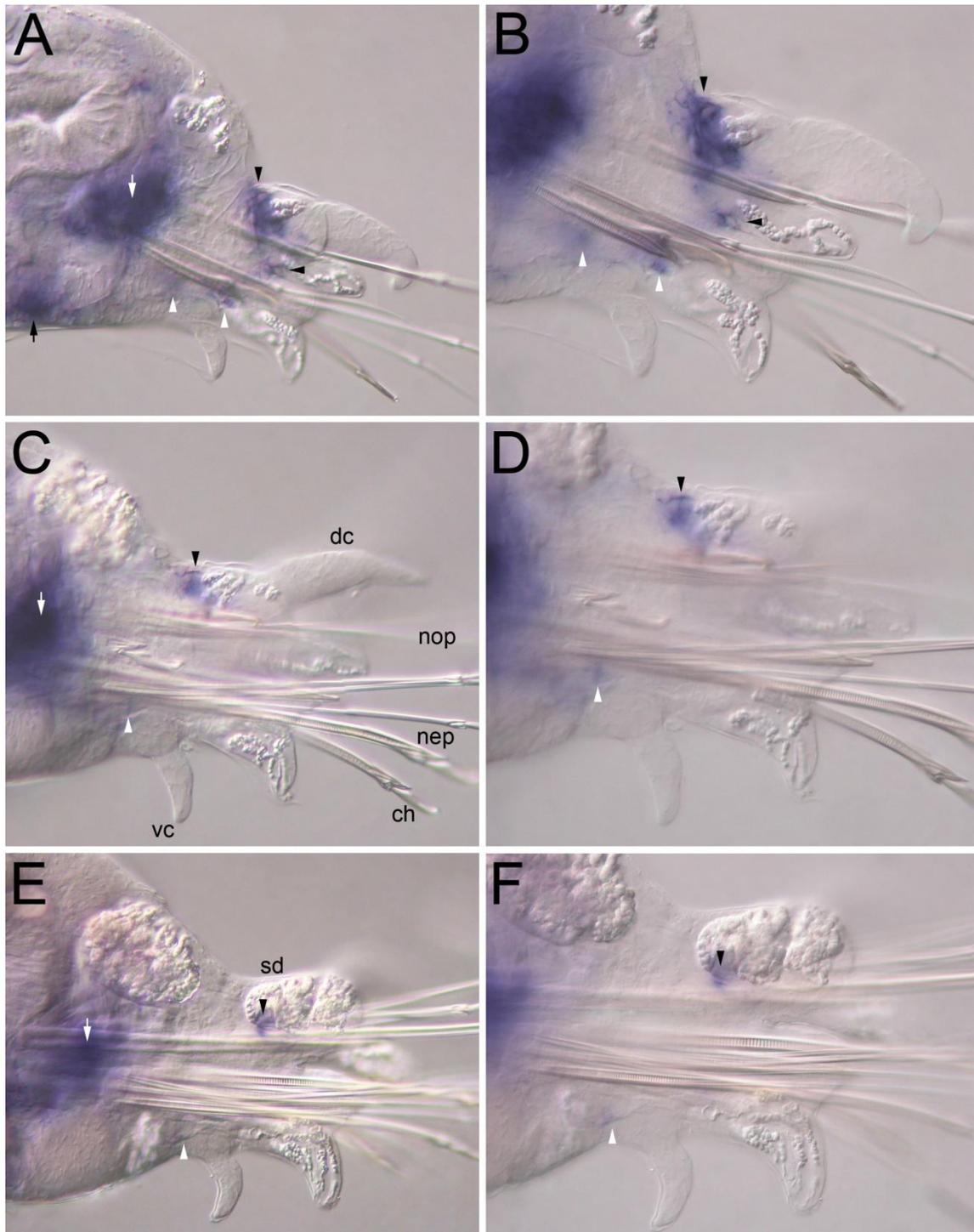


Abbildung 21: *Pdu-sp/btd* Expression in 16 Tage alten Regeneraten (Querschnitte). *Whole mount in situ*-Hybridisierung.

Querschnitt eines (A) jungen, (C) mittelalten und (E) alten Segmentes des Regenerates, (B,D,F) Vergrößerung des jeweiligen Querschnitts mit Fokus auf das Parapodium.

(ch) Chaeten, (dc) Dorsalcirrus, (nep) Neuropodium, (nop) Notopodium, (sd) Spinndrüse, (vc) Ventralcirrus, schwarze Pfeilköpfe - Expression im Notopodium, weiße Pfeilköpfe - Expression im Neuropodium, schwarzer Pfeil - Expression im Bereich des Nervensystems, weiße Pfeile - Expression schräg unterhalb des Darms.

5. Diskussion

Bevor die eigentlichen Ergebnisse diskutiert werden können, müssen einige grundlegende Fragen angesprochen werden. In mehreren Veröffentlichungen wird über die evolutionäre Verwandtschaft zwischen Polychaeten und Arthropoden sowie deren Körperanhänge diskutiert (Giribet 2003). Dabei spielt der Begriff Homologie eine große Rolle. Shubin (2009) hat die klassische Definition von Homologie als „eine historische Kontinuität, in der die morphologischen Eigenschaften und Merkmale in verwandten Spezies in Muster und Form gleich sind, da sie sich aus einer vergleichbaren Struktur eines gemeinsamen Vorfahren entwickelt haben“, beschrieben. Zusätzlich existiert seit Kurzem der neue Begriff der „tiefen Homologie“, um Homologien zu beschreiben, in denen die Kontinuität nicht unmittelbar ersichtlich ist (Shubin 2009). Dazu zählen beispielsweise auch vergleichbare regulatorische Mechanismen in der Entwicklungsphase von Körperanhängen. So zeigen Parapodien und Beine von Arthropoden auf den ersten Blick keine strukturellen Gemeinsamkeiten außer der Tatsache, dass sie sich aus ventrolateralen Knospen entwickeln (Schmidt-Rhaesa et al. 1998). Pripic (2008) beschreibt, dass die frühe Entwicklung inklusive der Gliedmaßenvorläufer des Salzkrebsses *Artemia franciscana* mit dem Ablauf der frühen Entwicklung bei *Platynereis dumerilii* identisch ist (Prud'homme et al 2003, Saudemont et al. 2008). Letztlich folgert er daraus, dass beide Strukturen homolog zueinander sind (Pripic 2008).

In dieser Arbeit sollen die molekularen Abläufe während der Entwicklung der Parapodien genauer betrachtet werden. Allerdings können die hier gewonnenen Erkenntnisse die Schlussfolgerungen, die zu der Homologie-Hypothese von Pripic führen, weder bestätigen noch widerlegen. Es sind sowohl Gemeinsamkeiten als auch Unterschiede in den Expressionsmustern einiger beteiligter Gene bei *Platynereis dumerilii*, Arthropoden und Vertebraten erkennbar, die dazu führen, dass die zuvor beschriebene „tiefe Homologie“ in diesem Zusammenhang nicht umfassend unterstützt werden kann. Allerdings muss erwähnt werden, dass sich diese Arbeit nur auf sechs Gene und eine Spezies bezieht.

In der vorliegenden Arbeit wird die Bildung von Körperanhängen sowohl bei larvalen Stadien als auch während der Regeneration von *Platynereis dumerilii* untersucht. Der entwicklungsprozessuale Ablauf und die Aktivität verschiedener Gruppen von Genen zur Entwicklung von Körperanhängen müssen bei den oben genannten unterschiedlichen Entwicklungsvorgängen nicht zwangsläufig gleich sein. Die Normalentwicklung von *Platynereis* wird von Fisher et al. (2010) im Detail beschrieben. Die Entwicklung beginnt mit der Spiralfurchung des Eies und führt nach mehreren Furchungsphasen zum ersten larvalen Stadium, der Trochophoralarve. Die Trochophoralarve und die darauf folgende Metatrochophoralarve besitzen den für diese Larven typischen Prototroch, der für die Bewegung zuständig ist. Am Rumpf sind schon die Anlagen der ersten Borstensegmente, sogenannte Borstentaschen, vorhanden, die in drei Paaren angelegt werden (Wilson 1892, Dorresteyn 1990). Sie können als Imaginalscheiben der Parapodien betrachtet werden. Nachdem diese Anlagen ausgewachsen sind, befindet sich die Entwicklung im Nectocheaten-Stadium, dem typischen, aus drei Segmenten bestehenden jungen Wurm, der die neu gebildeten Parapodien zu den ersten Schwimmbewegungen benutzt. Die drei frühen larvalen Segmente entwickeln sich gleichzeitig und werden Deutomeren genannt. Alle folgenden Segmente bilden sich nach und nach aus einer posterioren Wachstumszone und werden als Tritomeren bezeichnet.

Platynereis dumerilii ist in der Lage, seine caudalen Segmente bei Verlust komplett zu regenerieren (Hauenschild und Fisher 1969, Bely 2006). Während der Regeneration wird zunächst die Wunde verschlossen und ein Blastem gebildet. Mit Ausnahme des Nervensystems wird das neue Gewebe komplett aus diesen Blastemzellen entstehen. Das Nervensystem wächst aus dem bestehenden Nervenstrang der noch vorhandenen Segmente in das Regenerat aus (Müller et al. 2003, Pfeifer et al. 2012). Das Auswachsen des Nervensystems wurde von Wattez-Combaz (1995) als treibende Kraft für die dorsoventrale Morphogenese der regenerierenden Segmente beschrieben. Die Entwicklungsprozesse, die für die Morphogenese der Parapodien zuständig sind, variieren in Deutomeren, Tritomeren und in sich regenerierenden Segmenten. Diese Arbeit zeigt die Unterschiede für eine typische Gruppe von Genen, die in die Entwicklung von Körperanhängen von *Platynereis*, anderen Anneliden, Arthropoden und Vertebraten involviert sind.

Dachshund (dac) wird in den Körperanhängen sowohl von Arthropoden als auch von Vertebraten in einer intermediären Domäne, die zwischen *Distal-less (Dll)* und *homothorax/extradenticle (hth/exd)* lokalisiert ist, exprimiert (Angelini und Kaufman 2005, Prpic 2003, Prpic und Tautz 2003, Inoue et al. 2002, Prpic 2001, Mardon et al. 1994). Bei *Platynereis dumerilii* ist diese Restriktion auf eine mittig liegende Domäne nicht erkennbar. In Larven ist darüber hinaus gar keine Expression in den Körperanhängen oder deren Vorläufern nachweisbar. Die Expression beschränkt sich hier wohl hauptsächlich auf Strukturen des Nervensystems. Dieses Ergebnis deckt sich mit denen von Winchell et al. (2010) bei *Neanthes arenaceodentata*. Auch Mardon et al. (1994) haben die Aktivität von *dac* im ventralen Nervensystem von Arthropoden beschrieben; sie konnten aber keine eindeutige Aussage zu seiner Funktion in dieser Struktur treffen. Die beiden großen Expressionsdomänen im Kopfbereich der Larven von *Platynereis* deuten auf sich entwickelnde Gehirnstrukturen hin, während die Expression im Rumpf wahrscheinlich von den Ganglien der jeweiligen Segmente ausgeht. Die in der ventralen Mittellinie liegende Expression ist vermutlich auf neuronale Zellen zurückzuführen, die sich während der Bildung der Neuralplatte nach innen verlagert haben. Die Bildung der Neuralplatte wurde von Steinmetz (2006) genauer beschrieben. In der vorliegenden Arbeit wird *Pdu-dac* bei den Regeneraten sowohl in den Körperanhängen als auch in neuronalen Strukturen nachgewiesen. Jedoch ist auch hier die Restriktion auf eine mittig liegende Domäne in den Körperanhängen wie bei Arthropoden und Vertebraten nicht gegeben. Im Notopodium wird *Pdu-dac* im Bereich des dorsalen Cirrus exprimiert, der eher distal lokalisiert ist und im Neuropodium beschränkt sich die Expression auf die proximalen Bereiche. Diese Ergebnisse zeigen ein komplett anderes Expressionsmuster von *Pdu-dac* in den Körperanhängen von *Platynereis* im Vergleich zu *dac*-Expression bei Arthropoden und Vertebraten. Lediglich bei der Expression in den neuronalen Bereichen lassen sich Parallelen zu anderen Taxa ziehen.

Distal-less (Dll) ist, wie der Name schon vermuten lässt, besonders in den distalen Bereichen der Körperanhänge vertreten. Bei den Arthropoden variiert die Ausprägung der *Dll*-Expression, beschränkt sich aber in den meisten Fällen auf die distalen Bereiche (Angelini und Kaufman 2005). Es fällt auf, dass bei der Gruppe der Insekten immer eine zusätzliche ringförmige Expression, proximal

der Hauptdomäne gelegen, vorhanden ist (Jockusch et al. 2000, Abzhanov und Kaufman 2000, Inoue et al. 2002, Rogers et al. 2002, Beermann et al. 2001, Gonzalez-Crespo und Morata 1996). Diese zusätzliche Domäne lässt sich in dieser Form bei den anderen Arthropoden nicht nachweisen (Schoppmeier und Damen 2001, Abzhanov und Kaufman 2000, Prpic und Tautz 2003). Bei den Vertebraten ist die Expression von *Dll* ebenfalls nur im distalen Bereich zu finden (Pueyo und Couso 2005, Kraus und Lufkin 2006). *Platynereis dumerilii* zeigt in dieser Untersuchung sowohl im Larvenstadium als auch bei der Regeneration starke Expression von *Pdu-Dll* im Bereich der Körperanhänge und des Nervensystems. Die Beobachtungen während der larvalen Entwicklungsphase bei *Platynereis* decken sich mit denen von Winchell et al. (2010) bei *Neanthes*. Bei beiden Arten können paarige kreis- beziehungsweise ringförmige Expressionsdomänen an der Basis der zukünftigen Körperanhänge beobachtet werden. Vergleichbare Expressionsmuster wurden schon zuvor bei Trochophora-Larven von *Platynereis* nachgewiesen (Denes et al. 2007, Saudemont et al. 2008). Die Expression lässt sich während der ersten vier Tage der larvalen Entwicklung jedoch weder dem proximalen noch dem distalen Bereich eindeutig zuordnen. Aber auch Beobachtungen bei Arthropoden zeigen, dass die *Dll*-Expression anfangs noch sehr umfassend ist und sich erst mit fortschreitender Entwicklung auf den distalen Bereich begrenzt (Angelini und Kaufman 2005). Eine Besonderheit bei der Larvenentwicklung von *Platynereis* ist die anfangs schwache, später fehlende Expression in den Parapodien des ersten Segments. Dieses Phänomen kann möglicherweise durch den anderen Entwicklungsverlauf des ersten Segments erklärt werden, das sich später im Rahmen der Cephalisation, die von Fisher et al. (2010) genauer beschrieben wird, zu einem Kopfsegment umwandelt, die Parapodien verliert und stattdessen Cirren ausbildet.

Während der Regeneration verschieben sich die *Pdu-Dll*-Domänen mit dem Auswachsen des Parapodiums größtenteils in den jeweiligen distalen Bereich der beiden Parapodienteile. Eine Ausnahme hiervon stellt eine der beiden Domänen im Neuropodium dar, die im proximalen Bereich des Parapodiums verbleibt. Hier könnte man eine Parallele zu der ringförmigen Expression bei den Insekten vermuten, die sich, wie zuvor beschrieben, auch in einem eher proximalen Bereich im Vergleich zu der Hauptexpressionsdomäne befindet. Ein

deutlicher Unterschied zur Expression bei Arthropoden und Vertebraten ist jedoch, dass die *Pdu-Dll*-Expression bei *Platynereis* nicht in den distalen Spitzen der Körperanhänge nachzuweisen ist. Bei allen anderen Taxa ist das stets der Fall. Bei den Analcirren hingegen findet die Verschiebung der *Pdu-Dll*-Expression wohl nicht statt, denn sie ist sowohl in der Basis als auch in großen Bereichen der Cirren selbst zu finden. Die Expression, die in der vorliegenden Untersuchung bei *Platynereis* in den Gehirnregionen und im ventralen Nervensystem erkennbar ist, kann auch bei Arthropoden nachgewiesen werden, wo *Dll* an der Entwicklung von sensorischen Organen und Strukturen beteiligt ist (Sunkel und Whittle 1987, Cohen und Jürgens 1989, Gorfinkiel et al. 1997, Panganiban 2000). In *Neanthes* kann in den untersuchten Stadien ebenfalls Expression im Bereich des Gehirns, nicht jedoch im ventralen Nervensystem beobachtet werden (Winchell et al. 2010).

Die Expression von *decapentaplegic (dpp)* zeigt bei Arthropoden kein einheitliches Muster in den sich entwickelnden Körperanhängen (Prpic et al. 2003, Prpic 2004, Jockusch et al 2000, Niwa et al 2000, Angelini und Kaufmann 2005 [2], Sanchez-Salazar et al. 1996, Abu-Shaar und Mann 1998). Dadurch wird ein Vergleich mit der Expression bei *Platynereis dumerilii* schwierig. Allerdings kann man festhalten, dass Expression von *Pdu-dpp* in den Notopodien vorhanden ist, die allerdings sowohl bei der larvalen Entwicklung als auch bei der Regeneration lokal und zeitlich stark begrenzt auftritt. Durch diese deutlich unterschiedlichen Expressionsmuster könnte man hier zu der Annahme gelangen, dass *dpp* nicht für die Ausbildung der grundlegenden Strukturen und der proximodistalen Achse in den Körperanhängen mitverantwortlich ist, sondern eher eine Sonderstellung einnimmt und für spezielle taxonspezifische Anpassungen bei den Körperanhängen zuständig ist. Die sehr ungewöhnliche Expressionsdomäne auf der Dorsalseite bei Larven und Regeneraten von *Platynereis* kann bisher keiner Struktur genau zugeordnet werden. Bei den Larven ist in der vorliegenden Untersuchung die charakteristische V-förmige Ausprägung zu sehen, die an die Entwicklung des ventralen Nervensystems erinnert, jedoch dafür neurotopographisch auf der falschen Seite der Larve liegt. Bei den Regeneraten sind ebenfalls Strukturähnlichkeiten zum ventralen Nervensystem in Form von Ganglien und Nervenbahnen erkennbar, die aber auch hier auf der falschen Seite lokalisiert

sind. Man kann vermuten, dass es sich hierbei um Nerven und Ganglien handelt, die natürlich auch dorsal vorkommen. Allerdings stellt sich die Frage, warum *Pdu-dpp* nur die neuronalen Strukturen der dorsalen Seite und nicht auch das Hauptnervensystem auf der ventralen Seite markiert. Bei *Drosophila* wurden die Expression und Funktion von *dpp* bei der Bildung der Körperachsen genauer erforscht. *Dpp* scheint in *Drosophila* für die Determination der anterior-posterioren Grenze (Basler und Struhl 1994, Diaz-Benjumea et al. 1994), der dorsalen und ventralen Regionen der Imaginalscheiben (Theisen et al. 1996) und der proximodistalen Achse mitverantwortlich zu sein (Abu-Shaar und Mann 1998, Diaz-Benjumea et al. 1994, Lecuit und Cohen 1997). Da bei anderen Insekten ebenfalls *dpp*-Expression nachgewiesen werden kann, diese allerdings nicht vergleichbar mit der bei *Drosophila* ist, wird vermutet, dass *dpp* möglicherweise bei diesen Insekten auch nicht die gleiche Funktion besitzt. Angelini und Kaufmann (2005) stellen die Vermutung auf, dass die durch *dpp* hervorgerufene Bildung der anterior-posterioren Achse konserviert ist, die Bildung der dorsoventralen und proximodistalen Achsen bei anderen Insekten wahrscheinlich nicht ursprünglich auf *dpp* zurückzuführen ist. Da bei *Pdu-dpp* hauptsächlich Expression im Notopodium, also im dorsalen Teil des Parapodiums, und auch das nervensystemähnliche Expressionsmuster auf der Dorsalseite zu finden ist, könnte man einen Vergleich zu den Ergebnissen von Basler und Struhl (1994) ziehen. Sie beschreiben bei Arthropoden, dass ein Signal von *hedgehog* dazu führt, dass anterior der anterior-posterioren Grenze *wingless* auf der ventralen und *decapentaplegic* auf der dorsalen Seite exprimiert werden. Möglicherweise ist dies ein Indiz dafür, dass *Pdu-dpp* ebenfalls für die Determination der anterior-posterioren Achse in *Platynereis dumerilii* zuständig ist. Um diese Hypothese zu unterstützen oder zu widerlegen, müssen zunächst die Gene, die für die Bildung der anterior-posterioren Achse bei *Platynereis* zuständig sind, untersucht werden.

Die beiden Gene *homothorax (hth)* und *extradenticle (exd)* sowie ihre beiden Vertreter *Meis* und *Pbx* bei den Vertebraten werden in vielen Taxa typischerweise in den proximalen Regionen der Körperanhänge co-exprimiert (Angelini und Kaufman 2005, Capdevilla et al. 1999, Pueyo und Couso 2005). Eine Ausnahme bildet hier die bereits von Prpic et al. (2003) beschriebene Umkehrung der Expression bezüglich der Insekten im Vergleich zu den

restlichen Arthropoden (Angelini und Kaufman 2004, 2005, Inoue et al. 2002, Jockusch et al. 2000, Prpic et al. 2003, Prpic und Tautz 2003, Rauskolb et al. 1995, Rieckhof et al. 1997). Bei Larven von *Platynereis dumerilii* ist *Pdu-exd* und *Pdu-hth* vor allem auf der Ventralseite sehr großflächig exprimiert, was in der vorliegenden Untersuchung die Lokalisierung einzelner kleiner Domänen im Bereich der Körperanhänge erschwert. Dennoch kann Expression beider Gene an der Basis der Parapodien, also im proximalen Bereich des Körperanhangs, nahe der anterioren Segmentgrenze nachgewiesen werden. Außerdem scheinen beide Gene, in besonderem Maße jedoch *Pdu-exd*, Kopfmarker für *Platynereis* zu sein. Sowohl in großen Bereichen des Kopfes als auch im ersten Segment, das sich im späteren Verlauf der Entwicklung im Rahmen der Cephalisation (Fisher et al. 2010) zu einem Kopfsegment umwandelt, ist eine starke Expression nachzuweisen.

Während der Regeneration bei *Platynereis dumerilii* ist *Pdu-hth* und *Pdu-exd* fast im gesamten Körperanhang wiederzufinden und nicht auf die proximalen Bereiche beschränkt. Lediglich in der distalen Spitze des Notopodiums und den distalen Bereichen des Neuropodiums ist keine Expression von *Pdu-exd* und *Pdu-hth* zu beobachten. Unter Berücksichtigung der Expression dieser Gene bei Insekten im Vergleich zu den anderen Arthropoden könnte man folgende Hypothese aufstellen. Möglicherweise handelt es sich bei *Platynereis* um eine ursprünglichere Form der Expression, in der beide Gene in großen Teilen des Körperanhangs Expression zeigen. Dieses Expressionsmuster könnte im weiteren evolutionären Verlauf zu Verschiebungen bezüglich *hth* und *exd* geführt haben, indem sich bei den Insekten die *hth*-Expression und bei den restlichen Arthropoden die *exd*-Expression zurückgebildet hat. Eine andere mögliche Erklärung könnte sein, dass *Pdu-hth* und *Pdu-exd* eine völlig andere Funktion in der Entwicklung der Körperanhänge bei *Platynereis* im Vergleich zu Arthropoden und Vertebraten besitzen. Die Funktion dieser beiden Gene in Bezug auf die Entwicklung von Körperanhängen bei Anneliden kann in dieser Arbeit nicht abschließend geklärt werden. Dafür sind weiterführende Experimente erforderlich.

Da die Expression von *Dll* die beiden Gene *specific protein 1 (sp1)* und *buttonhead (btd)* bei Arthropoden beziehungsweise deren Vertreter *sp8* und *sp9* bei Vertebraten benötigt, sind diese beiden Gene ebenfalls primär in den distalen Bereichen der Körperanhänge zu finden (Kawakami et al. 2004, Estella et al. 2003, Estella und Mann 2010). In der vorliegenden Untersuchung können sowohl in den Larven als auch während der Regeneration bei *Platynereis* Zusammenhänge in der Expression von *Pdu-sp/btd* und *Pdu-Dll* festgestellt werden. Bei den Larven sind bei beiden Genen zwei Domänen pro Segment erkennbar, die auch an den gleichen Stellen auftreten, jedoch ist bei *Pdu-sp/btd*, anders als bei *Pdu-Dll*, kein Unterschied in der Intensität zwischen erstem und zweitem Segment sichtbar. Im weiteren Verlauf der Entwicklung erkennt man, dass die Expression von *Pdu-sp/btd* auch nach 72 Stunden sowohl im Noto- als auch im Neuropodium zu finden ist. Im Gegensatz dazu ist Expression von *Pdu-Dll* nach 72 Stunden nur noch im Neuropodium erkennbar. Gemeinsam ist sowohl bei *Pdu-sp/btd* als auch bei *Pdu-Dll* die starke Expression an der Basis des Peristomialcirrus. In den Regeneraten sind die Gemeinsamkeiten etwas deutlicher. In den jungen Segmenten ist die Expression von *Pdu-sp/btd* vorwiegend im proximalen Bereich zu finden, genau wie bei *Pdu-Dll*. Während der weiteren Entwicklung wird die Expression von *Pdu-sp/btd* im Notopodium in vergleichbarer Weise wie bei *Pdu-Dll* in distaler Richtung verschoben, wobei jedoch die Intensität und die endgültige Position der jeweiligen Expressionsdomänen voneinander abweichen. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre die Funktion von *Pdu-sp/btd* als *Dll*-Aktivator, die, wie bereits oben beschrieben, auch bei den Arthropoden und Vertebraten bekannt ist. Nachdem *Pdu-Dll* aktiviert wurde, wird die Expression von *Pdu-sp/btd* herunter reguliert und schließlich komplett abgeschaltet. Dadurch ist in späteren Entwicklungsstadien eine deutlich reduzierte Expression erkennbar. Im Neuropodium kann hingegen während der Entwicklung keine sichtbare Verschiebung der Expressionsdomänen beobachtet werden. Allerdings sind in den jungen Segmenten zwei Expressionsdomänen erkennbar, von der die distale im Laufe der weiteren Entwicklung verschwindet, die proximale ebenfalls schwächer wird, jedoch auch in den älteren Segmenten nachweisbar bleibt. Das führt dazu, dass im proximalen Neuropodium sowohl bei *Pdu-Dll* als auch bei *Pdu-sp/btd* eine Expressionsdomäne verbleibt. Die vorliegenden Ergebnisse

zeigen einige Gemeinsamkeiten in der Expression von *Pdu-sp/btd* und *Pdu-Dll*, jedoch kann damit noch keine sichere Aussage über eine funktionelle Abhängigkeit zwischen den beiden Genen getroffen werden. Weitere Experimente, wie z.B. knock-outs, sind notwendig, um die Rolle von *Pdu-sp/btd* während der Bildung von Körperanhängen bei *Platynereis dumerilii* zu klären.

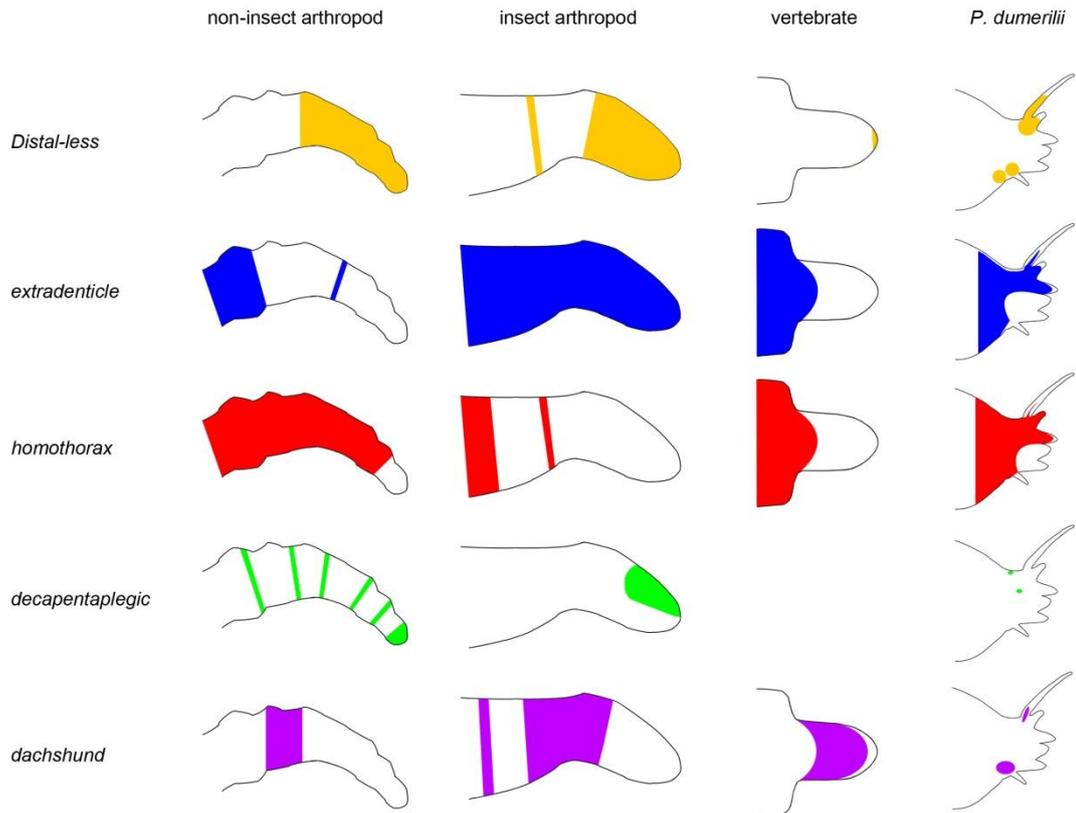


Abbildung 22: Schematische Darstellung der Genexpression von *Distal-less*, *extradenticle*, *homothorax*, *decapentaplegic* und *dachshund* während der Entwicklung von Körperanhängen bei verschiedenen Taxa. Die dynamischen Veränderungen der Genexpression während der Entwicklung werden ignoriert (Angelini und Kaufman 2005, Kraus und Lufkin 2006, Pueyo und Couso 2005).

Die Gene, die in dieser Arbeit analysiert werden, zeigen deutliche Expression in den sich entwickelnden Parapodien von *Platynereis dumerilii* sowohl während der Larvalentwicklung als auch bei der caudalen Regeneration. Das führt zu der Annahme, dass sie, ähnlich wie bei Arthropoden und Vertebraten, auch bei Anneliden in die Entwicklung von Körperanhängen involviert sind. Im Vergleich mit den schon existierenden Daten, die zum Großteil von Arthropoden stammen, sind mehrere Gemeinsamkeiten, aber auch Unterschiede zu beobachten (Abb. 22). Diese können jedoch eine Homologie bezüglich der

Körperanhänge beziehungsweise eine ‚tiefe Homologie‘ hinsichtlich der Entwicklungsprozesse innerhalb der mittlerweile veralteten Gruppe der Articulata weder bestätigen noch widerlegen. Die Gene scheinen einem „Bausatz“ anzugehören, der grundlegend für die Bildung von Körperanhängen und die damit zusammenhängenden Körperachsen zuständig ist, jedoch während der Evolution durch weitere Gene und Funktionen erweitert wurde. Durch die hohe Variabilität dieses „Bausatzes“ kommt es bei verschiedenen Bauplänen zu zeitlichen und lokalen Unterschieden bei den Expressionsmustern, aus denen man nicht zwingend eine phylogenetische Verwandtschaft ableiten kann.

6. Literaturverzeichnis

- Abu-Shaar M, Mann RS (1998) "Generation of multiple antagonistic domains along the proximodistal axis during *Drosophila* leg development." *Development*. 125(19):3821–3830.
- Abzhanov A, Kaufman TC (2000) "Homologs of *Drosophila* appendage genes in the patterning of arthropod limbs." *Dev Biol*. 227(2):673–689.
- Aguinaldo AMA, Turbeville JM, Linford LS, Rivera MC, Garey JR, Raff RA, Lake JA (1997) "Evidence for a clade of nematodes, arthropods and other moulting animals." *Nature*. 387:489–493
- Alvarado AS, Tsonis PA (2006) "Bridging the regeneration gap: genetic insights from diverse animal models." *Nat Rev Genet*. 7(11):873–884.
- Angelini DR, Kaufman TC (2004) "Functional analyses in the hemipteran *Oncopeltus fasciatus* reveal conserved and derived aspects of appendage patterning in insects." *Dev Biol*. 271(2):306–321.
- Angelini DR, Kaufman TC (2005) "Insect appendages and comparative ontogenetics." *Dev Biol*. 286(1):57–77.
- Angelini DR, Kaufman TC (2005) [2] "Functional analyses in the milkweed bug *Oncopeltus fasciatus* (Hemiptera) support a role for *Wnt* signaling in body segmentation but not appendage development." *Dev Biol*. 283(2):409–423.
- Basler K, Struhl G (1994) "Compartment boundaries and the control of *Drosophila* limb pattern by *hedgehog* protein." *Nature*. 368(6468):208–214.
- Beermann A, Jay DG, Beeman RW, Hülkamp M, Tautz D, Jürgens G (2001) "The Short antennae gene of *Tribolium* is required for limb development and encodes the orthologue of the *Drosophila* Distal-less protein." *Development*. 128(2):287–297.
- Bely AE (2006) "Distribution of segment regeneration ability in the Annelida." *Integr Comp Biol*. 46(4):508–18.

- Capdevila J, Tsukui T, Rodríguez Esteban C, Zappavigna V, Izpisua Belmonte JC (1999) "Control of vertebrate limb outgrowth by the proximal factor *Meis2* and distal antagonism of BMPs by Gremlin." *Molecular cell*. 4(5):839–849.
- Cohen SM, Jürgens G (1989) „Proximal-distal pattern formation in *Drosophila*: cell autonomous requirement for *Distal-less* gene activity in limb development." *EMBO J*. 8(7):2045–2055.
- Denes AS, Jékely G, Steinmetz PRH, Raible F, Snyman H, Prud'homme B, Ferrier DEK, Balavoine G, Arendt D (2007) "Molecular architecture of annelid nerve cord supports common origin of nervous system centralization in bilateria." *Cell*. 129(2):277–288
- Diaz-Benjumea FJ, Cohen B, Cohen SM (1994) "Cell interaction between compartments establishes the proximal-distal axis of *Drosophila* legs." *Nature*. 372(6502):175–179.
- Dorresteyn AWC (1990) "Quantitative-analysis of cellular-differentiation during early embryogenesis of *Platynereis dumerilii*." *Roux Arch Dev Biol*. 199(1):14–30.
- Estella C, Rieckhof G, Calleja M, Morata G (2003) "The role of *buttonhead* and *Sp1* in the development of the ventral imaginal discs of *Drosophila*." *Development*. 130(24):5929–5941.
- Estella C, Mann RS (2010) "Non-redundant selector and growth-promoting functions of two sister genes, *buttonhead* and *Sp1*, in *Drosophila* leg development." *PLoS Genet*. 6(6):e1001001.
- Fischer AH, Henrich T, Arendt D (2010) „The normal development of *Platynereis dumerilii* (Nereididae, Annelida). *Front Zool*. 7:31.
- Giribet G (2003) "Molecules, development and fossils in the study of metazoan evolution; Articulata versus Ecdysozoa revisited." *Zoology*. 106(4):303–326.
- González-Crespo S, Morata G (1996) "Genetic evidence for the subdivision of the arthropod limb into coxopodite and telopodite." *Development*. 122(12):3921–3928.

- Gorfinkiel N, Morata G, Guerrero I (1997) "The homeobox gene *Distalless* induces ventral appendage development in *Drosophila*." *Genes Dev.* 11:2259–2271.
- Halanych KM (2004) „The New View of Animal Phylogeny.” *Annu Rev Ecol Evol Syst.* 35:229–256
- Hauenschild C, Fischer A (1969) „*Platynereis dumerilii*. Mikroskopische Anatomie, Fortpflanzung, Entwicklung.“ *Grosses Zoologisches Praktikum Heft 10b*, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart; pp. 1–55.
- Inoue Y, Mito T, Miyawaki K, Matsushima K, Shinmyo Y, Heanue TA, Mardon G, Ohuchi H, Noji S. (2002) "Correlation of expression patterns of *homothorax*, *dachshund*, and *Distal-less* with the proximodistal segmentation of the cricket leg bud." *Mech Dev.* 113(2):141–148.
- Jaw TJ, You LR, Knoepfler PS, Yao LC, Pai CY, Tang CY, Chang LP, Berthelsen J, Blasi F, Kamps MP, Sun YH (2000) "Direct interaction of two homeoproteins, *Homothorax* and *Extradenticle*, is essential for *EXD* nuclear localization and function." *Mech Dev.* 91(1–2):279–291.
- Jockusch EL, Nulsen C, Newfeld SJ, Nagy LM (2000) "Leg development in flies versus grasshoppers: differences in *dpp* expression do not lead to differences in the expression of downstream components of the leg patterning pathway." *Development.* 127(8):1617–1626.
- Kawakami Y, Esteban CR, Matsui T, Rodríguez-León J, Kato S. Izpisúa Belmonte JC (2004) "*Sp8* and *Sp9*, two closely related *buttonhead*-like transcription factors, regulate *Fgf8* expression and limb outgrowth in vertebrate embryos." *Development.* 131(19):4763–4774.
- Kida Y, Maeda Y, Shiraishi T, Suzuki T, Ogura T (2004) "Chick *Dach1* interacts with the Smad complex and *Sin3a* to control AER formation and limb development along the proximodistal axis. *Development.* 131(17):4179–4187.
- Kojima T (2004) "The mechanism of *Drosophila* leg development along the proximodistal axis." *Dev Growth Differ.* 46(2):115–129.

- Kraus P, Lufkin T (2006) “*Dlx* homeobox gene control of mammalian limb and craniofacial development.” *Am J Med Genet Part A*. 140(13):1366–1374.
- Lecuit T, Cohen SM (1997) “Proximal-distal axis formation in the *Drosophila* leg.” *Nature*. 388(6638):139–145.
- Mardon G, Solomon NM, Rubin GM (1994) “*Dachshund* encodes a nuclear protein required for normal eye and leg development in *Drosophila*.” *Development*. 120(12):3473–3486.
- Mercader N, Leonardo E, Piedra ME, Martínez AC, Ros MA, Torres M (2000) “Opposing RA and FGF signals control proximodistal vertebrate limb development through regulation of *Meis* genes.” *Development*. 127(18):3961–3970.
- Müller MCM, Berenzen A, Westheide W (2003) “Experiments on anterior regeneration in *Eurythoe complanata* (“Polychaeta”, Amphinomidae): reconfiguration of the nervous system and its function for regeneration. *Zoomorphology*. 122(2):95–103.
- Niwa N, Inoue Y, Nozawa A, Saito M, Misumi Y, Ohuchi H, Yoshioka H, Noji S (2000) “Correlation of diversity of leg morphology in *Gryllus bimaculatus* (cricket) with divergence in *dpp* expression pattern during leg development.” *Development*. 127(20):4373–4381.
- Panganiban G, Irvine SM, Lowe C, Roehl H, Corley LS, Sherbon B, Grenier JK, Fallon JF, Kimble J, Walker M, Wray GA, Swalla BJ, Martindale MQ, Carroll SB (1997) “The origin and evolution of animal appendages.” *Proc Natl Acad Sci USA*. 94(10):5162–5166.
- Panganiban G (2000) “*Distal-less* function during *Drosophila* appendage and sense organ development.” *Dev Dyn*. 218(4):554–562.
- Pfeifer K, Dorresteyn AWC, Fröbisch AC (2012) “Activation of *Hox* genes during caudal regeneration of the polychaete annelid *Platynereis dumerilii*.” *Dev Genes Evol*. 222(3):165–179.
- Prpic NM, Wigand B, Damen WG, Klingler M (2001) “Expression of *dachshund* in wild-type and *Distal-less* mutant *Tribolium* corroborates serial homologies in insect appendages.” *Dev Genes Evol*. 211(10):467–477.

- Prpic NM, Tautz D (2003) "The expression of the proximodistal axis patterning genes *Distal-less* and *dachshund* in the appendages of *Glomeris marginata* (Myriapoda: Diplopoda) suggests a special role of these genes in patterning the head appendages." *Dev Biol.* 260(1):97–112.
- Prpic NM, Janssen R, Wigand B, Klingler M, Damen WG (2003) "Gene expression in spider appendages reveals reversal of *exd/hth* spatial specificity, altered leg gap gene dynamics, and suggests divergent distal morphogen signaling." *Dev Biol.* 264(1):119–140.
- Prpic NM (2004) "Homologs of *wingless* and *decapentaplegic* display a complex and dynamic expression profile during appendage development in the millipede *Glomeris marginata* (Myriapoda: Diplopoda)." *Front Zool.* 1(1):6.
- Prpic NM (2008) "Parasegmental appendage allocation in annelids and arthropods and the homology of parapodia and arthropodia." *Front Zool.* 5:17.
- Prud'homme B, de Rosa R, Arendt D, Julien JF, Pajaziti R, Dorresteyn AW, Adoutte A, Wittbrodt J, Balavoine G (2003) "Arthropod-like expression patterns of *engrailed* and *wingless* in the annelid *Platynereis dumerilii* suggest a role in segment formation." *Curr Biol.* 13(21):1876–1881.
- Pueyo JI, Couso JP (2005) "Parallels between the proximal–distal development of vertebrate and arthropod appendages: homology without an ancestor?" *Curr Opin Genet Dev.* 15(4):439–446.
- Rauskolb C, Smith KM, Peifer M, Wieschaus E (1995) "*extradenticle* determines segmental identities throughout *Drosophila* development. *Development.* 121(11):3663–3673
- Rieckhof GE, Casares F, Ryoo HD, Abu-Shaar M, Mann RS (1997) "Nuclear translocation of Extradenticle requires Homothorax, which encodes an Extradenticle-related homeodomain protein." *Cell.* 91(2):171–183.
- Rogers BT, Peterson MD, Kaufman TC (2002) "The development and evolution of insect mouthparts as revealed by the expression patterns of gnathocephalic genes." *Evol Dev.* 4(2):96–110.

- Sanchez-Salazar J, Pletcher MT, Bennett RL, Brown SJ, Dandamudi TJ, Denell RE, Doctor JS (1996) "The *Tribolium decapentaplegic* gene is similar in sequence, structure, and expression to the *Drosophila dpp* gene." *Dev Genes Evol.* 206(4):237–246.
- Saudemont A, Dray N, Hudry B, Le Gouar M, Vervoort M, Balavoine G (2008) "Complementary striped expression patterns of *NK* homeobox genes during segment formation in the annelid *Platynereis*." *Dev Biol.* 317(2):430–443.
- Schmidt-Rhaesa A, Bartolomaeus T, Lemburg C, Ehlers U, Garey JR (1998) "The position of the Arthropoda in the phylogenetic system." *J Morphol.* 238(3):263–285.
- Schoppmeier M, Damen WG (2001) "Double-stranded RNA interference in the spider *Cupiennius salei*: the role of *Distal-less* is evolutionarily conserved in arthropod appendage formation." *Dev Genes Evol.* 211(2):76–82
- Seaver EC, Kaneshige LM (2006) "Expression of 'segmentation' genes during larval and juvenile development in the polychaetes *Capitella* sp. I and *H. elegans*." *Dev Biol.* 289(1):179–194.
- Shubin N, Tabin C, Carroll S (2009) "Deep homology and the origins of evolutionary novelty." *Nature.* 457(7231):818–823.
- Steinmetz P (2006) "Comparative molecular and morphogenetic characterisation of larval body regions in the polychaete annelid *Platynereis dumerilii*." Dissertation
- Sunkel CS, Whittle JRS (1987) "Brista: a gene involved in the specification and differentiation of distal cephalic and thoracic structures in *Drosophila melanogaster*." *Roux's Arch Dev Biol.* 196:124–132.
- Theisen H, Haerry TE, O'Connor MB, Marsh JL (1996) "Developmental territories created by mutual antagonism between *Wingless* and *Decapentaplegic*." *Development.* 122(12):3939–3948.
- Tickle C (2003) "Patterning systems - from one end of the limb to the other." *Dev Cell.* 4(4):449–458.

- Wattez-Combaz A (1995) "Chaîne nerveuse et polarité dorso-ventrale de régénérats postérieurs chez l'Annélide Polychète *Nereis pelagica*." Ann Sci Nat Zool. 16:97–103.
- Wilson E (1892) "The cell-lineage of *Nereis*. A contribution to the cytogeny of the annelid body." J Morphol. 6:361–480.
- Winchell CJ, Valencia JE, Jacobs DK (2010) "Expression of *Distal-less*, *dachshund*, and *optomotor blind* in *Neanthes arenaceodentata* (Annelida, Nereididae) does not support homology of appendage-forming mechanisms across the Bilateria." Dev Genes Evol. 220(9–10):275–295.

7. Versicherung

„Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Ich stimme einer evtl. Überprüfung meiner Dissertation durch eine Antiplagiat-Software zu. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.“

Gießen, den _____

Jan Grimmel

8. Danksagung

Bedanken möchte ich mich ...

... bei Prof. Dr. Adriaan Dorresteyn für die Betreuung des Promotionsverfahrens, die Durchsicht des Manuskripts unserer gemeinsamen Veröffentlichung und die Beantwortung aller aufkommenden Fragen.

... bei Prof Dr. Tina E. Trenczek für die Begutachtung dieser Arbeit.

... bei Dr. Andreas Fröbius für die sehr gute Betreuung, die täglichen Diskussionen bei unseren gemeinsamen Pausen und für die ganze zusätzliche Arbeit an unserer gemeinsamen Veröffentlichung.

... bei Lilli Schmidt für alle organisatorischen Angelegenheiten, die im Vorfeld und Zusammenhang mit dieser Arbeit angefallen sind.

... bei allen anderen Mitarbeitern des Instituts für die schöne Zeit, als da wären...

Dr. Anne Holz, Ina Dahlitz, Renate Plass, Susanne Vasoldt-Kröckel, Brigitte Fronk und Jörg Schmandt.

... ganz besonders bei meinen Eltern und bei Carolin Dombrowski für die kritische Durchsicht dieser Arbeit und die mentale Unterstützung, die vor allem während der Schreibphase wichtig gewesen ist.

9. Appendix

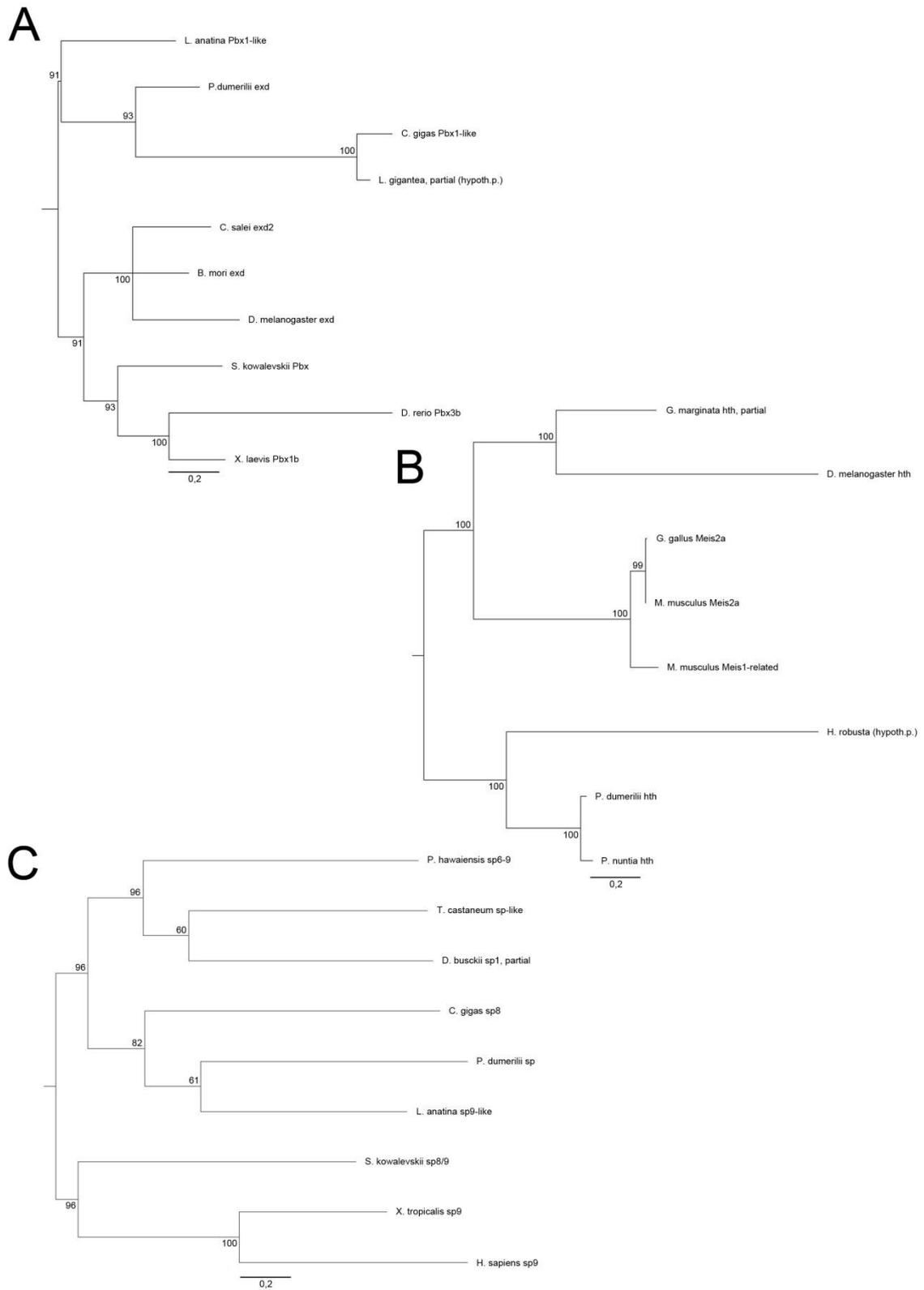


Abbildung A1, vorherige Seite: Baumberechnung für die drei neuen *P. dumerilii* Sequenzen und vergleichbare Gensequenzen aus GenBank.

Für die bayesische Berechnung wird „MrBayes“ verwendet. Zuvor wird für jeden Datensatz mit Hilfe von „Prottest“ das passendste Proteinevolutionsmodell ermittelt (JTT+G für *exd*, JTT+G+F für *hth* und JTT+I+G+F für *sp*). (A) Nicht gerooteter Baum für *exd*-Sequenzen. Vollständige wissenschaftliche Namen und GenBank Zugangsnummern in Reihenfolge von oben nach unten: *Lingula anatina* / XP_013405202, *Platynereis dumerilii* / neue Sequenz, *Crassostrea gigas* / XP_011452234, *Lottia gigantea* / XP_009044535, *Cupiennius salei* / CAD57738, *Bombyx mori* / NP_001296565, *Drosophila melanogaster* / NP_523360, *Saccoglossus kowalevskii* / NP_001158431, *Danio rerio* / AAI62483, *Xenopus laevis* / AAI06423, (B) Nicht gerooteter Baum für *hth*-Sequenzen. Vollständige wissenschaftliche Namen und GenBank Zugangsnummern in Reihenfolge von oben nach unten: *Glomeris marginata* / CAD82908, *Drosophila melanogaster* / NP_476576, *Gallus gallus* / AED02523, *Mus musculus* / CAA04138, *Mus musculus* / AAB19194, *Helobdella robusta* / XP_009032038, *Platynereis dumerilii* / neue Sequenz, *Perinereis nuntia* / BAM74492, (C) Nicht gerooteter Baum für *sp*-Sequenzen. Vollständige wissenschaftliche Namen und GenBank Zugangsnummern in Reihenfolge von oben nach unten: *Parhyale hawaiiensis* / CBH30981, *Tribolium castaneum* / NP_001034509, *Drosophila busckii* / ALC48334, *Crassostrea gigas* / EKC30539, *Platynereis dumerilii* / neue Sequenz, *Lingula anatina* / XP_013395523, *Saccoglossus kowalevskii* / NP_001161661, *Xenopus tropicalis* / NP_001072269, *Homo sapiens* / NP_001138722