

**Molekulare Mechanismen der
Mesodermbildung in *Platynereis dumerilii*
(Annelida, Polychaeta)**

Dissertation

zur Erlangung des Grades „Doktor der Naturwissenschaften“
(Dr. rer. nat.)

am Fachbereich Biologie und Chemie
der Justus-Liebig-Universität Giessen

vorgelegt von

Christoph Schaub

geboren in Freiburg im Breisgau

Giessen, November 2007

Diese Arbeit wurde am Institut für Allgemeine und Spezielle Zoologie,
Abteilung Entwicklungsbiologie,
der Justus-Liebig-Universität Giessen durchgeführt

Dekan:	Prof. Dr. Peter R. Schreiner
Erster Gutachter:	Prof. Dr. Adriaan W.C. Dorresteijn
Zweite Gutachterin:	Prof. Dr. Renate Renkawitz-Pohl

Tag der mündlichen Prüfung:

FÜR ROLAND UND MARIA SCHAUB

*„Für einen Menschen ohne Scheuklappen gibt es kein schöneres Schauspiel als die
Intelligenz im Kampf mit einer ihr überlegenen Wirklichkeit.“*

ALBERT CAMUS, DER MYTHOS VON SISYPHOS

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS.....	4
1 EINLEITUNG	11
1.1 ZELLSCHICKSAL UND GASTRULATION	12
1.2 DAS MODELLSYSTEM <i>PLATYNEREIS DUMERILII</i>	17
1.3 <i>TWIST</i> UND <i>SNAIL</i> ALS KANDIDATENGENE FÜR MÖGLICHE MESODERMDETERMINANTEN IN <i>PLATYNEREIS</i>	22
1.3.1 <i>Twist</i> und die Funktion seiner Homologen in anderen Spezies.....	23
1.3.2 <i>Snail</i> und die Funktion seiner Homologen in anderen Spezies.....	25
1.3.3 <i>Platynereis twist</i> und <i>snail</i>	27
2 MATERIAL & METHODEN.....	29
2.1 GERÄTE.....	29
2.2 CHEMIKALIEN & NÄHRMEDIEN	31
2.3 REAGENZSÄTZE	31
2.4 ANTIKÖRPER UND SEREN.....	32
2.5 VEKTOREN	33
2.6 STAMMHALTUNG UND KULTIVIERUNG VON <i>ESCHERICHIA COLI</i>	34
2.7 HALTUNG UND ZUCHT VON <i>PLATYNEREIS DUMERILII</i>	36
2.7.1 <i>Präparation von Platynereis Entwicklungsstadien für die RNA- und Proteinextraktion.....</i>	36
2.8 HALTUNG UND ZUCHT VON <i>DROSOPHILA MELANOGASTER</i>	37
2.8.1 <i>Präparation von Drosophila-Entwicklungsstadien für die RNA- und Proteinextraktion.....</i>	38
2.9 SYNTHETISCHE OLIGONUKLEOTIDE	39
2.10 PRÄPARATION UND ANALYSE VON DNA.....	42
2.10.1 <i>Herstellung chemisch kompetenter Bakterien</i>	42
2.10.2 <i>Transformation chemisch kompetenter Bakterien</i>	42
2.10.3 <i>Selektion rekombinanter bakterieller Kolonien.....</i>	43
2.10.3.1 <i>Blau/Weiss-Selektion</i>	43

2.10.3.2	Restriktionsverdau von isolierter Plasmid-DNA.....	44
2.10.3.3	Kolonie-Polymerase-Kettenreaktion (Kolonie-PCR) mit plasmidspezifischen Primern.....	45
2.10.4	<i>Präparation von Plasmid-DNA aus E. coli</i>	45
2.10.4.1	Plasmidpräparation durch alkalische Lyse	45
2.10.4.2	FastPlasmid™-Präparation.....	47
2.10.4.3	„Midi“-Präparation mit dem JETSTAR Midi Plasmid Kit 2.0.....	48
2.10.5	<i>Präparation von DNA aus wässrigen Lösungen</i>	48
2.10.5.1	Fällung von DNA aus wässriger Lösung.....	48
2.10.5.2	Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol Extraktion	49
2.10.6	<i>Präparation von genomischer Platynereis dumerilii DNA</i>	49
2.10.7	<i>Elektrophorese und Detektion von DNA in Agarosegelen</i>	50
2.10.8	<i>Isolation von DNA aus Agarosegelen</i>	51
2.10.9	<i>Quantifizierung von Nukleinsäurekonzentrationen</i>	51
2.10.10	<i>Southern Blot Analyse</i>	52
2.10.10.1	Southern Blot durch nach oben gerichteten Kapillartransfer.....	52
2.10.10.2	Hybridisierung einer nicht radioaktiv markierten Sonde an der Membran..	53
2.10.10.3	Detektion der nicht radioaktiv markierten Sonde	54
2.11	PRÄPARATION UND ANALYSE VON RNA	56
2.11.1	<i>Herstellung von RNase-freien Lösungen, Materialien und Geräten</i>	56
2.11.2	<i>Extraktion von Gesamt-RNA aus Platynereis und Drosophila Entwicklungsstadien</i>	57
2.11.2.1	Extraktion mit GTC-Puffer.....	57
2.11.2.2	Extraktion mit CTAB-Puffer	58
2.11.2.3	Extraktion mit RNeasy™protect Mini Kit	59
2.11.3	<i>Elektrophorese und Detektion von RNA in denaturierenden Agarosegelen</i>	60
2.11.4	<i>Northern Blot Analyse</i>	61
2.11.4.1	Northern Blot durch nach oben gerichteten Kapillartransfer	62
2.11.4.2	Färbung von Northern-Blots mit Methyleneblau.....	63
2.11.4.3	Hybridisierung einer nicht radioaktiv markierten Sonde an der Membran.....	63
2.11.4.4	Detektion der nichtradioaktiv markierten Sonde	64
2.12	ENZYMATISCHE MANIPULATION VON NUKLEINSÄUREN	66
2.12.1	<i>Reverse Transkription</i>	66

2.12.2	<i>Sequenzspezifisches Schneiden von DNA-Molekülen mit Restriktionsendonukleasen</i>	66
2.12.3	<i>Dephosphorylierung von freien 5'-Enden</i>	67
2.12.4	<i>Ligation von DNA</i>	67
2.12.4.1	Ligation von PCR-Fragmenten in T-Überhang Vektoren.....	67
2.12.4.2	Ligation von DNA-Fragmenten mit „Sticky Ends“ (kohesiven Enden).....	68
2.12.5	<i>Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction, PCR)</i>	69
2.12.5.1	Standard-PCR	69
2.12.5.2	Reverse Transkription (RT)-PCR	70
2.12.5.3	Rapid Amplifikation of cDNA Ends (RACE)-PCR.....	72
2.12.5.4	Fusions-PCR.....	73
2.12.6	<i>Sequenzierung von DNA-Molekülen</i>	75
2.12.7	<i>Nichtradioaktive Markierung von DNA- und RNA-Molekülen</i>	75
2.12.7.1	Random Labeling mit Hexanukleotiden.....	75
2.12.7.2	Polymerase-Kettenreaktion mit Digoxigenin-11-dUTP	76
2.12.7.3	Nichtradioaktive Markierung von RNA durch <i>in vitro</i> Transkription	76
2.12.8	<i>Dot-Test zur Überprüfung der Markierungseffizienz der Sondensynthese</i>	77
2.12.9	<i>Herstellung von doppelsträngiger RNA (dsRNA)</i>	78
2.13	PRÄPARATION UND ANALYSE VON PROTEINEN	79
2.13.1	<i>Expression von His-Fusionsproteinen in E. coli</i>	79
2.13.2	<i>Aufreinigung von E. coli Einschlusskörpern</i>	80
2.13.3	<i>Denaturierende affinitätschromatographische Aufreinigung von His-Fusionsproteinen aus E. coli Einschlusskörpern</i>	82
2.13.4	<i>Dialyse und Konzentration von Proteinen</i>	83
2.13.5	<i>Immunisierung von Kaninchen und Gewinnung von polyklonalen Antikörpern</i>	84
2.13.6	<i>Präparation von Gesamt-Protein aus Platynereis und Drosophila Entwicklungsstadien</i>	84
2.13.7	<i>Isolation von Proteinen aus wässrigen Lösungen</i>	85
2.13.8	<i>Bestimmung des Proteingehalts</i>	86
2.13.9	<i>SDS Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) von Proteinen</i>	86
2.13.10	<i>Western Blot Analyse</i>	88
2.13.10.1	Amidoschwarzfärbung von Membranen.....	91
2.13.10.2	Ponceau-S Färbung von Membranen	91

2.14	ARBEITEN MIT <i>PLATYNEREIS DUMERILII</i>	92
2.14.1	<i>Fixierung von Entwicklungsstadien und subadulten Platynereis dumerilii</i>	92
2.14.2	<i>Cytochalasinbehandlung von Embryonalstadien</i>	92
2.14.3	<i>Kernfärbung mit dem DNA-spezifischen Fluoreszenzfarbstoff Hoechst 33342</i>	93
2.14.4	<i>Aktinfärbung mit einem Phalloidin-TRITC Konjugat</i>	93
2.14.5	<i>Parentale RNA Interferenz (pRNAi) bei Platynereis dumerilii</i>	94
2.14.6	<i>Antikörperfärbung an Embryonen und subadulten Platynereis dumerilii</i>	95
2.14.7	<i>Einfache und doppelte in situ Hybridisierung an Entwicklungsstadien und subadulten Platynereis dumerilii mit markierten RNA-Sonden</i>	97
2.14.7.1	<i>Prähybridisierung und Hybridisierung</i>	97
2.14.7.2	<i>Detektion der nicht radioaktiv markierten Sonde</i>	99
2.14.8	<i>Histologische Untersuchungen an Entwicklungsstadien von Platynereis</i>	102
2.14.8.1	<i>Einbettung von Entwicklungsstadien in Araldit und Seriendünnschnitte</i>	102
2.14.8.2	<i>Safraninfärbung</i>	103
2.15	ARBEITEN MIT <i>DROSOPHILA MELANOGASTER</i>	104
2.15.1	<i>P-Element Keimbahntransformation von Drosophila</i>	104
2.15.1.1	<i>Vorbereitung der Embryonen</i>	104
2.15.1.2	<i>Mikroinjektion der Embryonen</i>	105
2.15.1.3	<i>Selektion transformierter Fliegen</i>	105
2.15.2	<i>Ektopische Expression mit dem GAL4/UAS-System</i>	106
2.15.3	<i>Fixierung von Embryonen und larvaler Organe für die Antikörperfärbung und in situ Hybridisierung</i>	106
2.15.3.1	<i>Sammeln und Fixieren von Fliegenembryonen</i>	106
2.15.3.2	<i>Präparation und Fixierung von Speicheldrüsen aus Larven</i>	107
2.15.4	<i>Antikörperfärbung an Embryonen und larvalen Geweben von Drosophila</i>	108
2.15.5	<i>Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH) und in situ Hybridisierung (ISH) an Embryonen und Larven von Drosophila mit DIG-markierten RNA-Sonden</i>	110
2.15.5.1	<i>Prähybridisierung und Hybridisierung</i>	110
2.15.5.2	<i>Detektion der nicht radioaktiv markierten Sonde</i>	111
2.15.6	<i>Kutikulapräparate</i>	112

2.15.7	<i>Histochemische X-Gal-Blaufärbung an Drosophila Embryonen</i>	113
2.16	SEQUENZANALYTISCHE UND PHYLOGENETISCHE METHODEN	114
2.16.1	<i>Sequenzanalyse</i>	114
2.16.2	<i>Phylogenetische Analyse</i>	115
3	ERGEBNISSE	116
3.1	KLONIERUNG UND CHARAKTERISIERUNG EINES <i>PLATYNEREIS DUMERILII TWIST</i> HOMOLOGS	117
3.1.1	<i>Amplifizierung und Klonierung einer Platynereis twist cDNA</i>	117
3.1.2	<i>Platynereis Twist ist ein Mitglied der Twist Familie von bHLH- Transkriptionsfaktoren</i>	117
3.1.3	<i>Die Platynereis twist mRNA ist schon in unbefruchteten Eizellen nachzuweisen und wird in allen Entwicklungsstadien exprimiert</i>	121
3.1.4	<i>Die Mesodermanlagen sich entwickelnder Platynereis Larven zeigen Pdu- twist Expression</i>	122
3.1.5	<i>Eine Cell-lineage-Analyse ergibt einen Zusammenhang zwischen mesodermaler Zellspezifizierung und Pdu-twist Expression</i>	125
3.1.6	<i>Platynereis twist wird in späteren Entwicklungsstadien in der posterioren mesodermalen Wachstumszone und im Mesoderm sich differenzierender Segmente exprimiert</i>	126
3.1.7	<i>In Regeneraten wird Platynereis twist im Mesoderm sich differenzierender Segmente exprimiert</i>	127
3.1.8	<i>Eine über parentale RNAi vermittelte funktionelle Analyse von Pdu-twist zeigt Phänotypen mit Gastrulationsdefekten</i>	128
3.2	HETEROLOGE EXPRESSION VON <i>PLATYNEREIS TWIST</i> (PDU-TWIST) UND HERSTELLUNG POLYKLONALER ANTISEREN GEGEN PDU-TWIST	132
3.2.1	<i>Herstellung des Expressionsvektors pQE30-PduTwist</i>	132
3.2.2	<i>Heterologe Expression von His-PduTwist</i>	135
3.2.3	<i>Affinitätschromatographische Aufreinigung von His-PduTwist</i>	138
3.2.4	<i>Herstellung polyklonaler Antiseren gegen Pdu-Twist</i>	139
3.2.5	<i>Western Blot Analyse der Immunsereen Anti-Pdu-Twist-6067 und Anti- Pdu-Twist-6068</i>	140

3.2.5.1	Anti-Pdu-Twist-6067 und Anti-Pdu-Twist-6068 detektieren rekombinant exprimiertes Pdu-Twist.....	140
3.2.5.2	Anti-Pdu-Twist-6067 und Anti-Pdu-Twist-6068 detektieren in <i>Drosophila</i> ektopisch überexprimiertes Pdu-Twist.....	140
3.2.5.3	Anti-Pdu-Twist-6067 und Anti-Pdu-Twist-6068 detektieren kein Pdu-Twist in Gesamtproteinextrakten aus <i>Platynereis</i> Entwicklungsstadien.....	141
3.2.6	<i>Immunhistochemische Färbungen mit Anti-Pdu-Twist-6067 und Anti-Pdu-Twist-6068 detektieren kein Pdu-Twist in Platynereis Entwicklungsstadien.....</i>	141
3.3	EKTOPISCHE EXPRESSION VON <i>PLATYNEREIS TWIST</i> IN <i>DROSOPHILA MELANOGASTER</i>	143
3.3.1	<i>Herstellung und Klonierung von pUAST-Pdu-twist.....</i>	143
3.3.2	<i>Herstellung keimbahntransformierter Drosophila und Etablierung transgener Stämme.....</i>	145
3.3.3	<i>Ektopische Expression von Pdu-twist in den Speicheldrüsen des ersten Larvenstadiums und den Gründerzellen der Muskulatur von Drosophila melanogaster.....</i>	146
3.3.4	<i>Ektopische Expression von Pdu-twist in twist und twist snail mutanten Stämmen von Drosophila melanogaster und Analyse der resultierenden Phänotypen.....</i>	148
3.4	KLONIERUNG UND CHARAKTERISIERUNG EINES <i>PLATYNEREIS DUMERILII SNAIL</i> HOMOLOGS.....	153
3.4.1	<i>Amplifizierung und Klonierung einer Platynereis snail cDNA.....</i>	153
3.4.2	<i>Platynereis Snail ist ein Mitglied der Snail-Familie von Zink-Finger Transkriptionsfaktoren.....</i>	154
3.4.3	<i>Die Platynereis snail mRNA ist schon in unbefruchteten Eizellen nachzuweisen und wird in allen Entwicklungsstadien bis zum subadulten Jungwurm exprimiert.....</i>	157
3.4.4	<i>Die Mesodermanlagen sich entwickelnder Platynereis Larven zeigen Pdu-snail Expression.....</i>	159
3.5	<i>PDU-TWIST UND PDU-SNAIL WERDEN WÄHREND DER EMBRYONALENTWICKLUNG VON PLATYNEREIS DUMERILII KOEXPRIMIERT.....</i>	161

3.5.1	<i>Die mRNAs von Pdu-twist und Pdu-snail sind schon in unbefruchteten Eizellen hinterlegt und können in allen Entwicklungsstadien der Embryonalentwicklung nachgewiesen werden</i>	161
3.5.2	<i>Pdu-twist und Pdu-snail besitzen in den Mesodermanlagen der sich entwickelnden Trochophora gemeinsame Expressionsdomänen</i>	162
4	DISKUSSION.....	164
4.1	EINE EVOLUTIVE ANALYSE VON <i>PLATYNEREIS DUMERILII</i> TWIST UND SNAIL. 164	
4.1.1	<i>Struktur und Funktion von Platynereis dumerilii Twist</i>	164
4.1.2	<i>Struktur und Funktion von Platynereis dumerilii Snail</i>	168
4.2	DIE ROLLE VON <i>PLATYNEREIS DUMERILII</i> TWIST UND SNAIL WÄHREND DER FRÜHEN EMBRYONALENTWICKLUNG	170
4.2.1	<i>Pdu-twist und Pdu-snail sind maternal in Platynereis Eizellen hinterlegt</i>	170
4.2.2	<i>Pdu-twist wird während der Furchungsteilungen asymmetrisch in die Zellen der D-Zelllinie und den Mesoblasten 4d verteilt.....</i>	172
4.2.3	<i>Pdu-snail kann in allen Furchungsstadien nachgewiesen werden</i>	176
4.2.4	<i>Platynereis twist Expression wird für die embryonale Achsenbildung benötigt.....</i>	177
4.2.5	<i>Die Etablierung des embryonalen Organisators ist von Platynereis twist abhängig</i>	181
4.3	DIE ROLLE VON <i>PLATYNEREIS TWIST</i> UND <i>SNAIL</i> BEI DER MESODERMDETERMINATION UND GASTRULATION.....	184
4.4	<i>PLATYNEREIS DUMERILII TWIST</i> UND <i>SNAIL</i> SIND BEI DER MESODERMDIFFERENZIERUNG INVOLVIERT	190
4.5	<i>PLATYNEREIS DUMERILII TWIST</i> SPIELT AUCH BEI DER POSTLARVALEN MESODERMENTWICKLUNG UND REGENERATION EINE ROLLE.....	197
4.6	<i>PLATYNEREIS DUMERILII TWIST</i> KANN FEHLENDES <i>DROSOPHILA MELANOGASTER TWIST</i> NICHT ERSETZEN	199
4.7	<i>PLATYNEREIS TWIST</i> STELLT EINEN „MASTER REGULATOR“ FÜR MESODERMALES SCHICKSAL IN <i>PLATYNEREIS DAR</i>	201
5	LITERATUR	205

6	ZUSAMMENFASSUNG	224
7	APPENDIX.....	226
7.1	VERÖFFENTLICHUNGEN UND TAGUNGSBEITRÄGE	226
7.2	EINBUCHSTABENCODE FÜR DIE AMINOSÄUREN	227
7.3	PLASMIDKARTE pCRII-TOPO	228
7.4	PLASMIDKARTE PCR4-TOPO.....	229
7.5	PLASMIDKARTE pGEM-T EASY.....	230
7.6	PLASMIDKARTE PQE-30.....	231
7.7	PLASMIDKARTE PUASt	232
7.8	PLASMIDKARTEN Pd48.3 UND PdRACE7.1	233
7.8.1	<i>Pd48.3 pCRII-TOPO</i>	233
7.8.2	<i>PdRACE7.1 pCR4-TOPO</i>	233
7.9	INSERTSEQUENZ VON Pd48.3	234
7.10	INSERTSEQUENZ VON PdRACE7.1	234
7.11	KOMPLETTES ALIGNMENT VON PDU-TWIST	235
7.12	GENBANK ACCESSIONNUMBERS DER TWIST HOMOLOGEN	239
7.13	PLASMIDKARTEN Sna5_1200 UND Sna3_1200.....	240
7.13.1	<i>Sna5_1200 pGEM-T easy</i>	240
7.13.2	<i>Sna3_1200 pGEM-T easy</i>	240
7.14	INSERTSEQUENZ VON Sna5_1200	241
7.15	INSERTSEQUENZ VON Sna3_1200	241
7.16	KOMPLETTES ALIGNMENT VON PDU-SNAIL	242
7.17	GENBANK ACCESSIONNUMBERS DER SNAIL HOMOLOGEN	249
8	DANKSAGUNG.....	250
	EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG	251

1 Einleitung

Die Erforschung der Prozesse und Mechanismen, die die Entwicklung multizellulärer Organismen steuern, ist eines der Hauptaugenmerke der Entwicklungsbiologie. Durch die Untersuchung der molekularen Grundlagen dieser Prozesse und der ihnen zugrundeliegenden genetischen Netzwerke in unterschiedlichen Modellsystemen, lassen sich sowohl Einblicke in grundsätzliche Entwicklungsprinzipien, deren Vielfältigkeit, als auch in die Evolution dieser Entwicklungsprinzipien werfen.

1.1 Zellschicksal und Gastrulation

Alle bilateralsymmetrischen Tiere (Bilateria) sind durch den Besitz dreier Keimblätter, die während ihrer Embryonalentwicklung entstehen, gekennzeichnet. Ein Keimblatt ist hierbei als eine Zellschicht definiert, die während der Frühentwicklung spezifiziert wird und aus der bei der weiteren Entwicklung bestimmte Organe und Gewebe entstehen. Die Spezifizierung der Keimblätter und deren Trennung durch den Gastrulationsprozess ist einer der grundlegendsten Schritte während der Embryonalentwicklung bilateralsymmetrischer Tiere und ein bekanntes Zitat spiegelt die Bedeutung dieses Prozesses wieder: „It is not birth, marriage, or death, but gastrulation, which is truly the most important time in your life“ (Lewis Wolpert, 1987).

Nach dem Abschluss der Gastrulation besteht der Embryo aus drei Zellschichten, dem äußeren Ektoderm sowie dem Mesoderm und Endoderm, die sich beide im Inneren der Gastrula befinden. Obwohl der Besitz von drei Keimblättern (Triploblastie) ein charakteristisches Merkmal der Bilateria darstellt, sind die Mechanismen, die zur Spezifizierung und die Art und Weise, die zur Trennung der Keimblätter führen, in den verschiedenen Phyla augenscheinlich unterschiedlich. Diese Vielfalt hat sich während der Evolution als Reaktion auf Änderungen der Lebensweise und der Eizellarchitektur entwickelt, führt in ihrem Endergebnis aber immer zu den drei Keimblättern, aus denen sich dann die keimblattspezifischen Gewebe differenzieren.

Das Grundprinzip der Gastrulation besteht darin, dass verschiedene Zellen, durch unterschiedliche Mechanismen vermittelt, sich in verschiedene Richtungen bewegen. Eine Voraussetzung hierfür ist, dass unterschiedlichen Zellen verschiedene Zellschicksale zugewiesen werden, welche ihr Verhalten während der Gastrulation beeinflussen. Die Festlegung von Zellschicksal stellt somit einen der ersten wichtigen Spezifizierungsprozesse in der Embryonalentwicklung dar und äußert sich vor allem darin, dass die Zellen beginnen bestimmte Transkriptionsfaktoren zu exprimieren, die dann die weitere Entwicklung des Keimblattes steuern. Diese molekularen Mechanismen der Zellspezifizierung der Keimblätter sind in den klassischen Modellsystemen sehr gut untersucht (Abbildung 1.1).

In *Drosophila* wird das mesodermale Primordium durch eine ventrale Region im Embryo definiert, die die Expressionsdomäne der Transkriptionsfaktoren Twist und Snail darstellt (Kosman *et al.*, 1991; Leptin, 1991), während der GATA-Transkriptionsfaktor Serpent das Endoderm spezifiziert (Reuter, 1994). Brachyury wird in einem Ring um das prospektive Endoderm exprimiert und ist für die Zellen spezifisch, die im Verlauf der weiteren Entwicklung den ektodermalen Hinterdarm bilden werden (Kispert *et al.*, 1994).

In Vertebraten wird das mesodermale Primordium durch die Expressionsdomäne von Brachyury, das unter der Kontrolle von Nodal steht, etabliert (Wilkinson *et al.*, 1990; Smith *et al.*, 1991; Schulte-Merker *et al.*, 1992). Eine Population von mesodermalen Zellen, die später den embryonalen Organisator etablieren werden, wird durch die Expression von Goosecoid (Cho *et al.*, 1991), dessen Transkription durch Nodal und nukleäres β -Catenin aktiviert wird, charakterisiert. Twist und Snail, die die mesodermalen Determinanten in *Drosophila* darstellen, spielen im Mesoderm der Vertebraten nur während der späteren Entwicklung eine wichtige Rolle und das präsumptive Endoderm kann während der frühen Entwicklung nicht eindeutig vom Mesoderm getrennt werden.

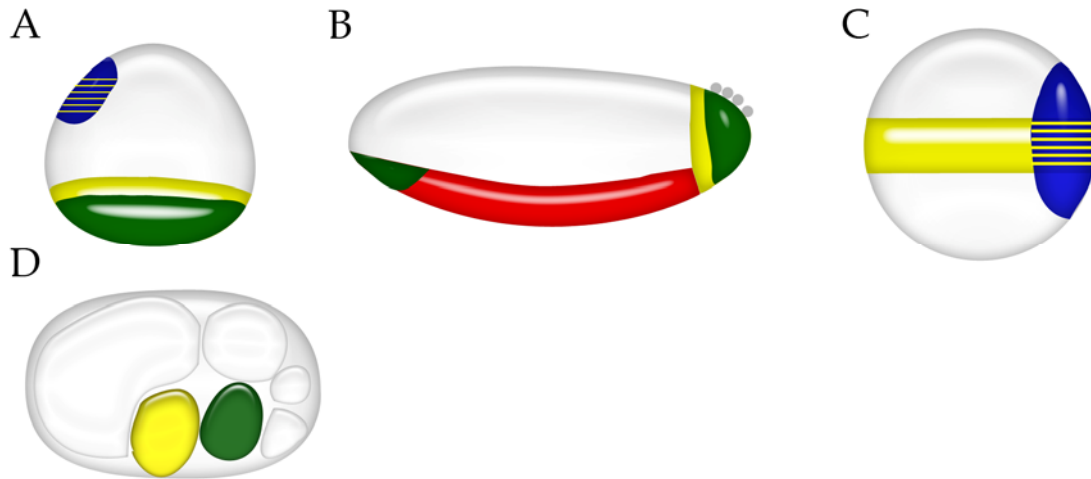


Abbildung 1.1: Keimblatt-determinanten in der Blastula des Seeigels, bei *Drosophila*, *Xenopus* und *Caenorhabditis*. (A) Beim Seeigel exprimiert das prospektive Endoderm GATAe (**grün**), das orale Ektoderm exprimiert Goosecoid (**blau**) und Brachyury (**gelb**). Ähnlich wie bei *Drosophila* findet sich ein Ring von Brachyury Expression um das Endoderm. (B) Bei *Drosophila* exprimiert das präsumptive Mesoderm Twist und Snail (**rot**) und die Endodermanlagen sind durch Serpent Expression charakterisiert (**grün**). Das Brachyury Homolog Brachyenteron spezifiziert den ektodermalen Hinterdarm (**gelb**). (C) Bei *Xenopus* exprimiert das prospektive Mesoderm Brachyury (**gelb**). Nodal und β -Catenin etablieren die Spemann-Mangold Organisatorregion, die Goosecoid, Siamois und andere Gene (**blau**) exprimiert. (D) In *Caenorhabditis* exprimiert die MS-Zelle, die die Gründerzelle des primären Mesoderm darstellt den T-Box-Transkriptionsfaktor TBX-35 (**gelb**) und die E-Zelle aus der das komplette Endoderm hervorgeht die paraloge GATA-Transkriptionsfaktoren END-1 und END-3 (**grün**). Abbildung verändert nach Leptin (Leptin, 2005).

Beim Seeigel stellt sich die Situation wieder anders da. Die Homologen der mesodermalen Determinanten Goosecoid und Brachyury werden im oralen Ektoderm exprimiert (Angerer *et al.*, 2001; Gross und McClay, 2001; Croce *et al.*, 2003), das wohl ähnlich dem Organisator der Vertebraten ein Signalzentrum darstellt, aber für die Spezifizierung und Musterbildung im Ektoderm zuständig ist. Das Brachyury Homolog zeigt außerdem eine ringförmige Expressionsdomäne an der Grenze des präsumptiven Archenteron im Endoderm, was sich analog zum Expressionsmuster von Brachyury in *Drosophila* darstellt, und die Zellen des präsumptiven Endoderm exprimieren, vergleichbar der Situation in *Drosophila*, einen GATA-Transkriptionsfaktor. Alle diese Transkriptionsfaktoren nehmen an der Steuerung des morphogenetischen Verhaltens der Regionen, in denen sie im Seeigelkeim exprimiert werden, teil (Gross und McClay, 2001). In *Caenorhabditis* exprimiert die MS-Zelle, die die Gründerzelle des primären Mesoderm darstellt, den T-Box-Transkriptionsfaktor TBX-35 (Robertson *et al.*, 2004; Broitman-Maduro

et al., 2006) und die E-Zelle, aus der das komplette Endoderm entsteht, die paraloge GATA-Transkriptionsfaktoren END-1 und END-3 (Maduro *et al.*, 2005).

Die Analyse der molekularen Mechanismen, die zur Festlegung von Zellschicksal und der Etablierung von Keimblättern führen, beschränkte sich bis vor kurzem vor allem auf die Vertreter der Deuterostomia und der Ecdysozoa, denen die klassischen Modellsysteme angehören. Über die molekularen Grundlagen der Determination der Blastomeren in der Frühentwicklung der Lophotrochozoa, dem dritten und größten Überstamm der bilateralsymmetrischen Tiere (Halanych *et al.*, 1995; Tessmar-Raible und Arendt, 2003; Philippe *et al.*, 2005) war nur wenig bekannt. Einen großen Teil der Lophotrochozoa machen die Spiralia aus, welche die Annelida, Molluska, Nemertini, polycladen Turbellaria und einige andere marine Invertebraten umfassen. Charakteristisch für alle diese Phyla ist der Entwicklungsmodus der Spiralfurchung, der in der frühen Embryonalentwicklung eine bemerkenswerte Ähnlichkeit in der Symmetrie der ersten Furchungsteilungen und dem stereotypen Muster von Zellschicksalen in der Blastula, das durch diese Furchungen entsteht, aufweist (Abbildung 1.2). Die Regelmäßigkeit der Furchungsmuster in den Embryonen der Spiralia erlaubt die Identifizierung individueller Blastomeren und vergleichende Untersuchungen zwischen entfernt verwandten Taxa der Spiralia können auf der Einzelzellebene durchgeführt werden (Dorresteyn, 2005; Lambert, 2007).

Durch Zellstammbaumanalysen, sind für viele Spiraler die Zellschicksale der einzelnen Blastomeren in der weiteren Entwicklung bekannt (Whitman, 1878; Wilson, 1892; Dorresteyn, 1990; Dictus und Damen, 1997; Render, 1997; Huang *et al.*, 2002; Ackermann *et al.*, 2005). So entsteht der größte Teil des Mesoderms der Spiralia aus einer einzelnen Zelle, die während der frühen Furchungen ihre molekulare Identität erhält und als Mesoblast oder Mesentoblast 4d determiniert wird (Abbildung 1.2). Über den Mechanismus, der diesen Determinationsvorgang vermittelt und seine molekularen Komponenten, sind allerdings bisher nur vereinzelt Analysen durchgeführt worden.

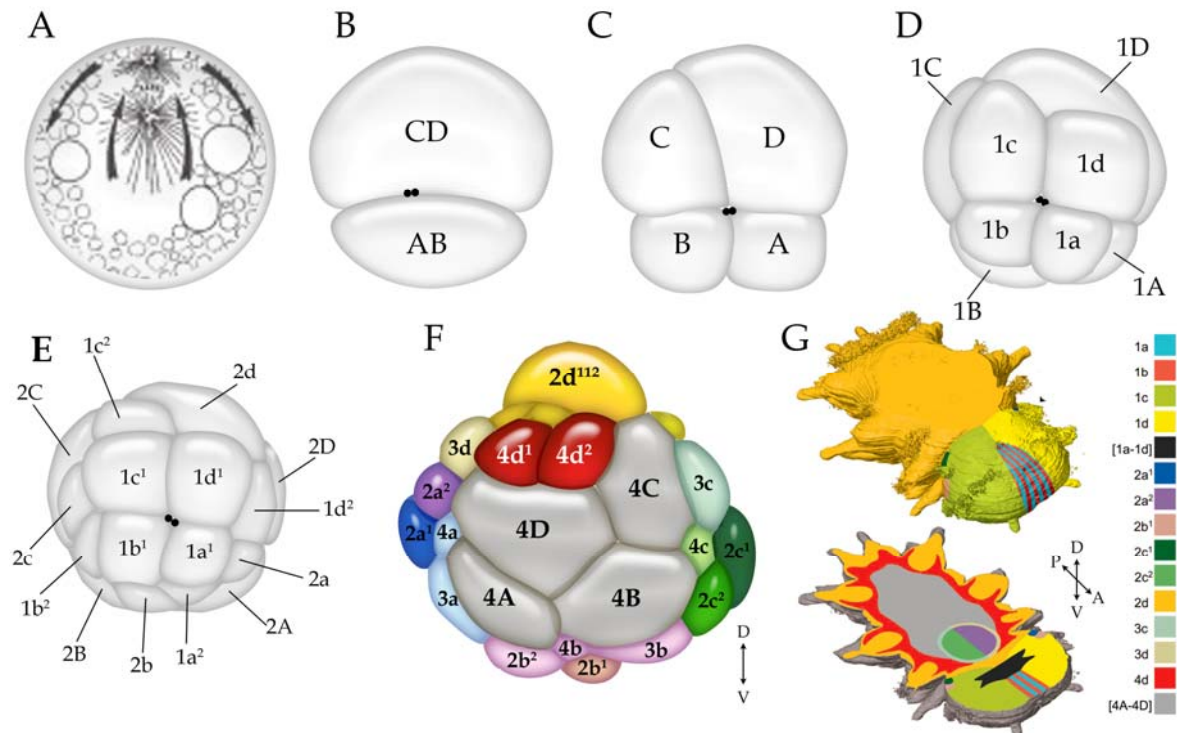


Abbildung 1.2: Die inäquale Spiralfurchung am Beispiel von *Platynereis dumerilii*. (A) Die ooplasmatische Segregation polarisiert die aktivierte Oozyte animal/vegetal. (B-C) Die ersten beiden inäqualen Furchungen unterteilen den Keim in die qualitativ und quantitativ unterschiedlichen embryonalen Quadranten A, B, C und D. Der D-Quadrant stellt die präsumptive dorsale Seite dar. (D-E) Die Blastomeren furchen sich in animale Mikromeren und vegetale Makromeren. 2d stellt den Somatoblasten dar, die Gründerzelle des kompletten Ektoderms (animale Ansichten). (F) Stereoblastula von *Platynereis* (posteriore Ansicht, dorsal oben). Die Farben der Blastomeren entsprechen der Farbe der Strukturen, die sie im Jungwurm (G) bilden. Die Tochterzellen von 4d, 4d¹ und 4d², stellen die Gründerzellen des Rumpfmesoderms dar (G) Postlarvale klonale Domänen in *Platynereis dumerilii*. Abbildungen A-E nach Fischer und Dorresteyn (Fischer und Dorresteyn, 2004), Abbildungen F, G nach Ackermann (Ackermann *et al.*, 2005) verändert. Abkürzungen: A anterior, P posterior, D dorsal, V ventral.

In dem marinen Mollusken *Ilyanassa* kann sowohl in 3D, der Mutterzelle von 4d, als auch in dieser selbst MAPK-Aktivität nachgewiesen werden. Inhibiert man diese, so wird die molekulare Identität von 4d aufgehoben und es wird kein Mesoderm gebildet. Gleiches geschieht auch bei dem Polychaeten *Hydroides* (Lambert und Nagy, 2001, 2003). Der Faktor, der für die Aktivierung des MAPK-Signalwegs verantwortlich ist und welche genetischen Elemente sein Ziel sind, ist jedoch nicht bekannt.

Inzwischen sind auch einige der Vertreter der Spiralia für die molekularen Methoden der modernen Entwicklungsbiologie zugänglich. Bei den marinen Schnecken *Patella* (Lartillot *et al.*, 2002; Lespinet *et al.*, 2002; Nederbragt *et al.*, 2002; Prud'homme *et al.*, 2002) und *Ilyanassa* (Lambert und Nagy, 2001, 2002, 2003),

sowie den Anneliden *Capitella capitata* (Dill *et al.*, 2007; Thamm, 2007), *Helobdella robusta* (Soto *et al.*, 1997; Goldstein *et al.*, 2001; Song *et al.*, 2004; Agee *et al.*, 2006; Gonsalves und Weisblat, 2007) und *Platynereis dumerilii* (Arendt *et al.*, 2001; de Rosa *et al.*, 2005; Kerner *et al.*, 2006; Gillis *et al.*, 2007; Schneider und Bowerman, 2007; Steinmetz *et al.*, 2007; Thamm, 2007) sind die Zusammenhänge zwischen der Spezifizierung der Keimblätter und der Festlegung molekularer Zellidentität analysiert worden. Obwohl der Wissenszuwachs durch diese Analysen enorme Fortschritte bei dem Verständnis der molekularen Prozesse, die während der Spiralisierung ablaufen, gebracht hat, sind bis heute keine molekularen Determinanten identifiziert worden, die das Schicksal von 4d als mesodermale Mutterzelle festlegen oder die die Tochterzellen als mesodermale Zellen determinieren. Über die Mechanismen, die für die Spezifizierung des mesodermalen Keimblatts der Spiralisierung zuständig sind, sind keine Daten vorhanden. Die bisher gewonnenen Ergebnisse weisen lediglich auf einen Mechanismus hin, der durch eine Aktivierung des MAPK-Signalwegs bedingt ist und dessen Störung sowohl Einfluss auf die Spezifizierung der Keimblätter als auch die morphogenetischen Gastrulationsbewegungen nimmt (Lartillot *et al.*, 2002; Gonsalves und Weisblat, 2007; Lambert, 2007).

1.2 Das Modellsystem *Platynereis dumerilii*

Der Polychaet *Platynereis dumerilii* (Nereididae) besitzt durch seinen amphistomen Gastrulationsmodus und seine bewimperten Primärlarve Entwicklungsmerkmale, die zumindest für die Protostomia als ursprünglich vermutet (Nielsen, 2001) und sogar als ursprünglich für die Bilateria vorgeschlagen wurden (Arendt *et al.*, 2001). Die Genomstruktur von *Platynereis* weist mehr Gemeinsamkeiten mit den Genomen der Vertebraten, als mit den Genomen anderer bisher untersuchten Protostomiern auf. Dies weist darauf hin, dass sich die Genomarchitektur von *Platynereis* seit der phylogenetischen Trennung der Protostomia und Deuterostomia nur unwesentlich verändert hat und als ursprünglich angesehen werden kann (Raible *et al.*, 2005).

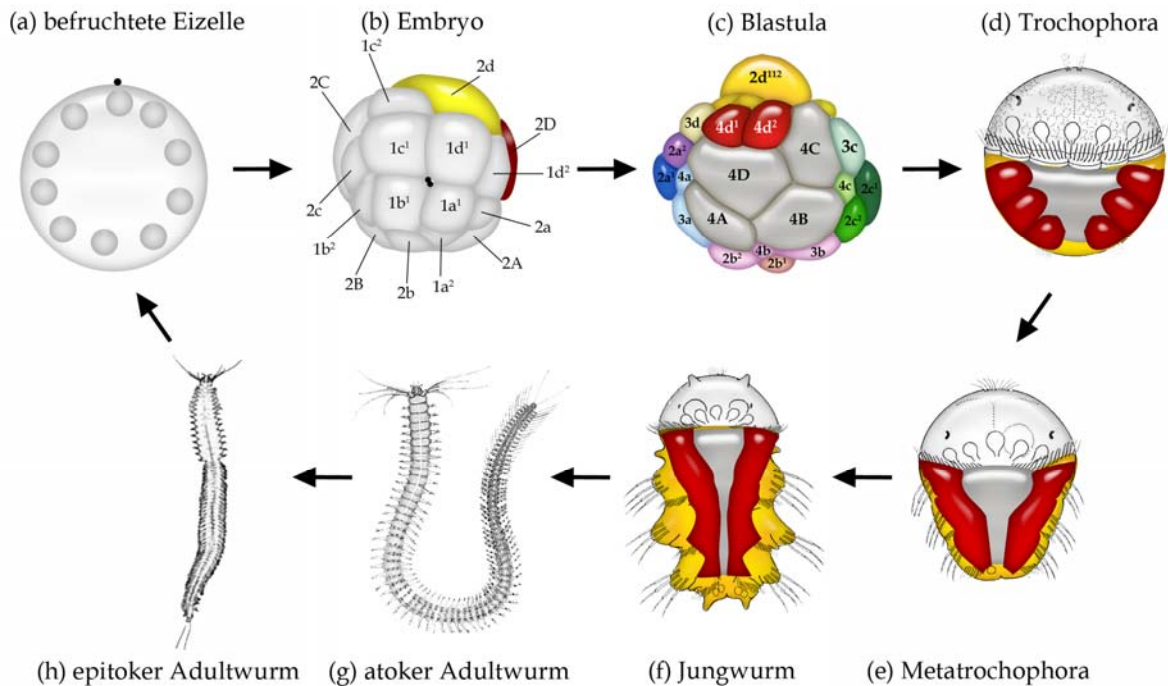


Abbildung 1.3: Der Lebenszyklus von *Platynereis dumerilii*. Die befruchtete Eizelle (a) durchläuft eine inäquale Spiralfurchung (b), die zur typischen Stereoblastula der Spiraler ohne Blastocoel (c) führt. Diese durchläuft die epibolische Gastrulation und bildet nach 24 Stunden Entwicklung eine sphärisch geformte Larve, die Trochophora (d), welche sich nach 72 Stunden Entwicklung zum Jungwurm differenziert hat (e-f). Der Jungwurm wächst durch das kontinuierliche Sprossen von neuen Segmenten aus einer posterioren Wachstumszone zum atoken Adultwurm (g) heran. Durch eine Metamorphose wird der atoke Adultwurm zum sexuell reifen epitoken Adultwurm (h) transformiert. Zeichnungen verändert nach Ackermann (Ackermann *et al.*, 2005) und Fischer und Dorresteyn (Fischer und Dorresteyn, 2004).

Neben diesen Merkmalen, die ihn für evolutiv vergleichende Untersuchungen prädestinieren, weist *Platynereis* ebenfalls Vorteile auf, die ihn für entwicklungsbiologische Untersuchungen attraktiv machen. *Platynereis dumerilii* ist in Laborzucht einfach zu halten und zu vermehren (Hauenschild und Fischer, 1969) und produziert bei jeder Paarung mehrere hundert sich synchron entwickelnde, im Gegensatz zu den Embryonen anderer Spiraler, völlig transparenter Entwicklungsstadien und Larven (Fischer und Dorresteyn, 2004). Diese sind für *in situ* Hybridisierung, Immunohistochemie und Immunofluoreszenz zugänglich (Dorresteyn *et al.*, 1993; Arendt *et al.*, 2001), so dass eine stadienspezifische Lokalisation von mRNA und Proteinen in ihnen möglich ist. Durch Inkubation in Inhibitoren wichtiger zellbiologischer Prozesse sind Analysen biochemischer Regulationsprozesse durchführbar (Dorresteyn und Graffy, 1993; Heimann, 2000) und die Injektion von Tracer-Molekülen (Ackermann *et al.*, 2005), mRNAs,

Reporterkonstrukten oder von Molekülen, die posttranskriptionelles Silencing induzieren, ermöglicht die Verfolgung und Beeinflussung des Zellschicksals der einzelnen Blastomeren.

Nach der Befruchtung der Eizelle beginnt diese mit einer typischen Spiralfurchung, die die Zygote zunächst inäqual in die embryonalen Quadranten A, B, C und D unterteilt. Diese sind in ihrer zytoplasmatischen Zusammensetzung extrem unterschiedlich und in ihrem prospektivem Schicksal schon weitestgehend diversifiziert (Dorresteiijn, 1990; Ackermann *et al.*, 2005). Die Lage des D-Quadranten legt, wie bei vielen anderen Spiraliern, die präsumptive dorsale Körperseite fest. Während der ooplasmatischen Segregation wurde das Zytoplasma und die zytoplasmatischen Einschlusskörper der Eizelle animal/vegetal polarisiert verteilt. Diese Umverteilung resultiert in einem Becher aus Dotter und Lipidtropfen am vegetalen Pol und einer Kappe aus dotterfreiem Zytoplasma am animalen Pol der Zygote (Abbildung 1.4 A).

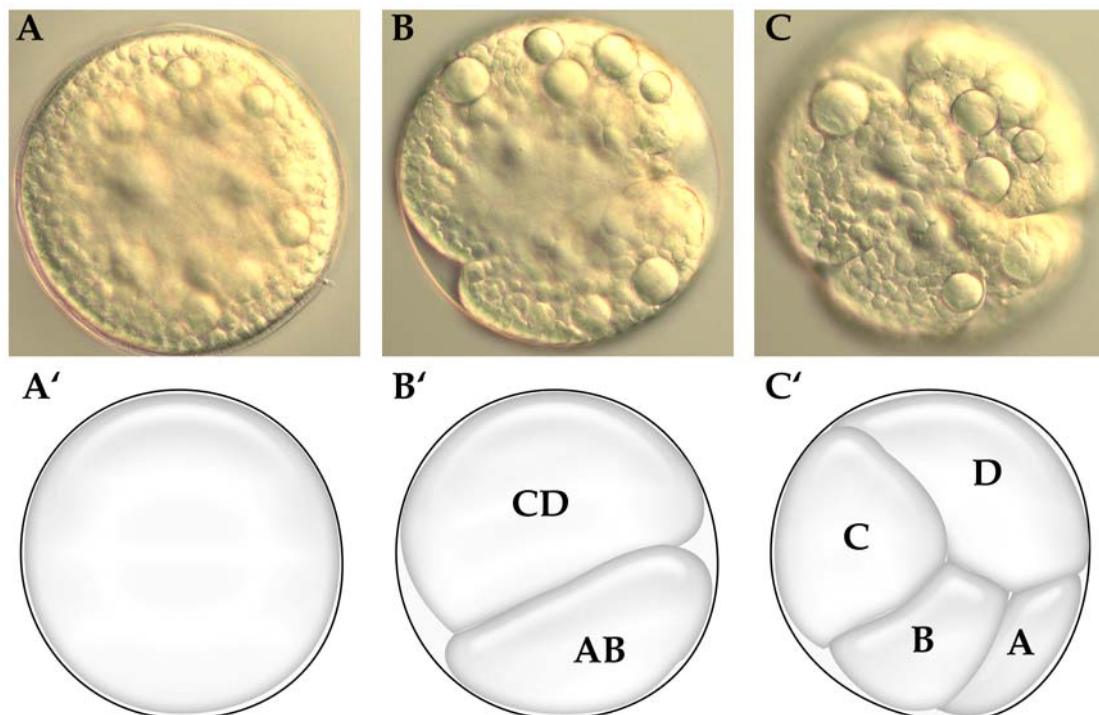


Abbildung 1.4: Die Etablierung der embryonalen Quadranten im *Platynereis* Keim. Die befruchtete Eizelle (A, A') wird durch die ersten beiden extrem inäqualen Furchungen in die embryonalen Quadranten A, B, C und D unterteilt (B, B', C, C'). Diese sind in ihrer zytoplasmatischen Zusammensetzung extrem unterschiedlich und in ihrem prospektivem Schicksal schon weitestgehend diversifiziert. A-C zeigen animale Ansichten. Das dotterfreie Plasma am animalen Pol ist gut zu erkennen.

Dieses sogenannte dotterfreie Polplasma wird während der ersten Furchungen vor allem in den D-Quadranten verteilt (Abbildung 1.4) und enthält Determinanten, die für die Etablierung der primären Achsen im *Platynereis* Embryo zuständig sind.

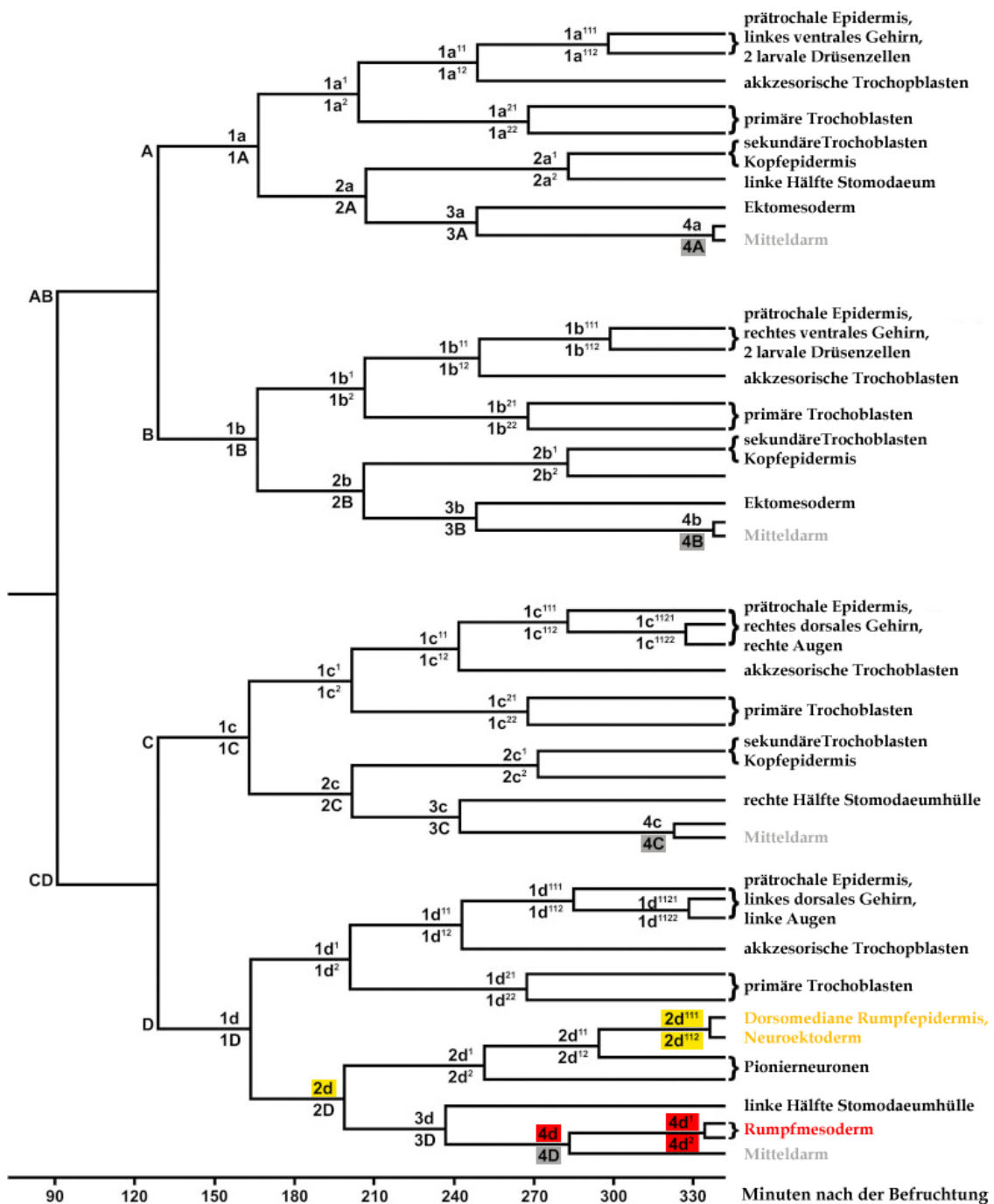


Abbildung 1.5: Der Zellstammbaum der Blastomeren im *Platynereis* Keim. Das komplette Rumpfektoderm wird von den Nachkommen von 2d, das komplette Rumpfesoderm von den Nachkommen von 4d gebildet. Die Blastomeren des D-Quadranten, die den größten Gehalt an dotterfreiem Zytoplasma aufweisen, zeigen die kürzesten Zellzyklen. Verändert nach Dorresteiijn (Dorresteiijn, 1990).

Durch experimentelle Manipulation der Verteilung des dotterfreien Zytoplasmas werden ektopische Achsensysteme induziert, die zu morphologischen Verdopplungen der Körperachsen führen (Dorresteijn und Eich, 1991). Im Verlauf der weiteren Furchungen teilen sich die Blastomeren wiederholt in animale Mikromeren und vegetale Makromeren (Abbildung 1.2 D, E). In der, durch dieses kanonische Furchungsmuster entstehenden, Stereoblastula lässt sich bereits ein Anlagenplan für den dreisegmentigen Jungwurm aufstellen (Ackermann *et al.*, 2005) und die Gründerzellen sowohl des posttrochalen Ektoderms, Mesoderms als auch Endoderms benennen (Abbildung 1.2 F). Während das komplette posttrochale Ektoderm von den Nachfolgezellen von 2d gebildet wird, entsteht das Rumpfmesoderm aus den Nachfolgezellen von 4d und das Endoderm aus den Nachfolgezellen von 4A, 4B, 4C und 4D. Da sich das dotterfreie Zytoplasma im weiteren Verlauf der *Platynereis* Entwicklung zum größten Teil in 2d und 4d verteilt, wird davon ausgegangen, dass es ebenfalls Determinanten, die für die Spezifizierung der Keimblätter zuständig sind, enthält. Auffällig ist ebenfalls die reziproke Korrelation zwischen dem Gehalt an dotterfreiem Zytoplasma und der Länge der embryonalen Zellzyklen (Dorresteijn, 1990). Die Zellen des D-Quadranten, die am meisten dotterfreies Zytoplasma erhalten, zeigen die kürzesten Zellzyklen (Abbildung 1.5). Diese Unterschiede in der Dauer der embryonalen Zellzyklen stellen ebenfalls eine Bedingung für die Etablierung der embryonalen Achsen und die Spezifizierung der Keimblätter dar (Heimann, 2000; Depner, 2002). Durch die Zellzyklusasynchronien bedingt, werden die Blastomeren wahrscheinlich so in der Stereoblastula positioniert, dass eine ortsgemäße Induktion stattfinden kann. Die Zusammensetzung des dotterfreien Zytoplasmas und der molekulare Charakter der Determinanten, die es enthält sind nicht bekannt. Nach der Etablierung des embryonalen Achsensystems in der Stereoblastula (Abbildung 1.6 A) endet die Spiralfurchung und die Nachkommen von 4d und 2d beginnen sich bilateralsymmetrisch zu teilen. Dies läutet den Beginn der Gastrulation ein. Die proliferierenden Nachkommen von 2d¹¹² und 4d beginnen mit epibolischen, morphogenetischen Gastrulationsbewegungen.



Abbildung 1.6: Die epibolische Gastrulation des *Platynereis* Keims. (A) *Platynereis* Stereoblastula (B) Die Trennung der Keimblätter im *Platynereis* Keim wird durch epibolische Gastrulationsbewegungen der proliferierenden Nachkommen von 2d¹¹² und 4d¹ und 4d² vermittelt. Die Mesodermanlagen (rot) kommen dorsolateral der Endodermanlage (grau) zu liegen und werden vom Ektoderm (gelb) überwachsen. Nach dem Schluss der Blastopore hat sich die Gastrula (C) gebildet und das Mesoderm (rot) und das Endoderm (grau) sind internalisiert. (A-C) sind posteriore Ansichten. Die schwarzen Pfeile zeigen die Richtung der epibolischen Gastrulationsbewegungen an. Abbildungen verändert nach Ackermann (Ackermann *et al.*, 2005).

Im Verlauf derer kommen die Mesodermanlagen dorsolateral der Endodermanlagen zu liegen und werden vom Ektoderm überwachsen (Abbildung 1.6 B). Nach dem Schluss der Blastopore (Abbildung 1.6 C) beginnt sich die Gastrula zur typischen Trochophora-Larve zu differenzieren und bildet nach weiteren 48 Stunden Entwicklung den dreisegmentigen Jungwurm (Abbildung 1.3 d-f). Dieser wächst durch die posteriore Sprossung neuer Segmente zum atoken adulten Wurm heran (Abbildung 1.3 g).

1.3 *Twist* und *snail* als Kandidatengene für mögliche Mesoderm-determinanten in *Platynereis*

Die beginnende Spezifizierung der Keimblätter zeigt sich in den klassischen Modellsystemen durch die Expression von Mitgliedern der T-Box, GATA, Twist-bHLH und Snail-Zinkfinger Familien von Transkriptionsfaktoren in den präsumptiven Anlagen (Abbildung 1.1). In *Platynereis* sind aus diesen Familien bisher ein T-Box Homolog (*Pdu-Brachyury*) sowie zwei Paraloge aus der Familie der GATA-Transkriptionsfaktoren (*PdGATA123*, *PdGATA456*) identifiziert und analysiert worden.

Pdu-Brachyury Expression findet sich nach 8 Stunden Entwicklung in den präsumptiven ektodermalen, vegetalen Zellen um die Blastopore sowie im sich

entwickelnden Vorder- und Hinterdarm der Larven. Es scheint, wie bei den Larven basaler Deuterostomia, für die Entwicklung des Vorder- und Hinterdarms, hierfür sprechen auch die gemeinsamen Expressionsdomänen mit *Pdu-gooseoid*, und für die Entwicklung eines Teil des viszeralen Mesoderms zuständig zu sein. (Arendt *et al.*, 2001). *PdGATA123* wird im Ektoderm und *PdGATA456* in den Mesodermanlagen der Trochophora exprimiert. Sie werden erst nach der Beendigung der Gastrulation transkribiert und können somit als Determinanten für mesodermales 4d-Schicksal ebenfalls ausgeschlossen werden (Gillis *et al.*, 2007). Als Kandidatengene für mögliche Determinanten mesodermalen Schicksals im *Platynereis* Embryo bieten sich somit die Homologen von *twist* und *snail* an.

1.3.1 *Twist* und die Funktion seiner Homologen in anderen Spezies

Twist kodiert für einen bHLH-Transkriptionsfaktor der in *Drosophila* essentiell für die Determination und Entwicklung des Mesoderms ist (Thisse *et al.*, 1987a). *Drosophila* *Twist* ist der Gründer einer *Twist*-like Familie von Transkriptionsfaktoren. Mitglieder dieser *Twist*-like Familie wurden bisher im Stamm der Chordaten beim Menschen (Wang *et al.*, 1997), bei Primaten (Gachot-Neveu *et al.*, 2002), der Maus (Wolf *et al.*, 1991; Li *et al.*, 1995), im Frosch (Hopwood *et al.*, 1989), im Huhn (Scaal *et al.*, 2001; Tavares *et al.*, 2001; Gitelman, 2007), sowie bei *Danio* (Morin-Kensicki und Eisen, 1997; Germanguz *et al.*, 2007) und *Oryzias* (Yasutake *et al.*, 2004) beschrieben und untersucht. Bei den Urochordata finden sich Homologen bei *Ciona* (Imai *et al.*, 2003; Tokuoka *et al.*, 2004), bei den Cephalochordata in *Branchiostoma* (Yasui *et al.*, 1998).

Beim Überstamm der Ecdysozoa finden sich neben der Analyse bei *Drosophila* (Thisse *et al.*, 1988) Untersuchungen zu *Twist* Homologen bei *Caenorhabditis* (Harfe *et al.*, 1998b), bei *Tribolium* (Sommer und Tautz, 1994) und bei *Apis* (Handel *et al.*, 2005), bei dem Cheliceraten *Achaearanea tepidariorum* (Yamazaki *et al.*, 2005) und dem Crustaceen *Parhyale hawaiiensis* (Price und Patel, 2007).

Mitglieder der *Twist*-like Familie wurden auch bei *Capitella capitata* (Dill *et al.*, 2007), *Enchytraeus coronatus* (Brand *et al.*, 2003), *Helobdella robusta* (Soto *et al.*, 1997) und *Patella vulgata* (Nederbragt *et al.*, 2002) kloniert und analysiert. Ebenso wie

Tubifex tubifex, *Transanella tantilla*, *Helix aspersa* und *Ilyanassa obsoleta*, gehören diese Spezies alle zum Überstamm der Lophotrochozoa. Die Sequenzen der Twist-Homologen der letztgenannten finden sich in der Sequenzdatenbank des NCBI.

Sogar außerhalb der Bilateria, bei *Podocoryne carnea* (Spring et al., 2000) und *Nematostella vectensis* (Martindale et al., 2004) die beide zum Stamm der Cnidaria gehören, finden sich zu Twist homologe Proteine.

Bei *Drosophila* besteht das präsumptive Mesoderm aus einem Feld pluripotenter Zellen (Beer et al., 1987; Farrell und Keshishian, 1999), die den Transkriptionsfaktor Twist exprimieren (Leptin, 1991; Baylies und Bate, 1996). Diese Twist exprimierenden Zellen invaginieren entlang der ventralen Oberfläche des Embryos und verbreiten sich nach dorsal, wo sie als einzellige Schicht in dichten Kontakt mit dem Ektoderm treten (Leptin und Grunewald, 1990). Während sich bei *Tribolium* innerhalb der Insekta diese Funktionen konserviert finden (Handel et al., 2005), ergab eine Analyse der *twist* Homologen zweier weiterer Vertreter der Arthropoda, des amphipoden Krebses *Parhyale hawaiensis* (Price und Patel, 2007) und der Spinne *Achaearanea tepidariorum* (Yamazaki et al., 2005), dass diese ebenfalls nur bei der Mesoderm differenzierung beteiligt sind. Dies trifft ebenfalls auf die *twist* Gene der bisher analysierten Lophotrochozoen zu (Nederbragt et al., 2002; Dill et al., 2007).

Die *twist* Gene der Vertreter der Vertebraten werden erst nach der Gastrulation und der Mesodermspezifizierung exprimiert (Wolf et al., 1991; Gitelman, 1997). Diesen Sachverhalt trifft man auch bei der Analyse der *twist* Gene von *Caenorhabditis* und *Branchiostoma* (Harfe et al., 1998b; Yasui et al., 1998) an. Eine in Mausembryonen (Chen und Behringer, 1995) und sich entwickelnden *C. elegans* (Corsi et al., 2000) durchgeführte *twist* „loss of function“-Analyse ergab, dass die Spezifizierung des Mesoderms auch bei dem Verlust der Twist Expression normal verlief.

Das *twist* Homolog des Cnidariers *Podocoryne carnea* wird im sogenannten Entocodon exprimiert. Das Entocodon stellt eine „mesodermähnliche“ Zellschicht aus undifferenzierten, proliferativ aktiven Zellen dar. Es entsteht durch die Invagination des distalen Ektoderms der Meduse in einem Prozess, den die

Autoren als mit einer Gastrulation vergleichbar ansehen. Obwohl der Entocodon kein „echtes“ Mesoderm darstellt, differenziert es in die medusentypischen glatten und quergestreiften Muskeln. Es wäre durchaus möglich, dass die Zielgene von *Pctwist* für Faktoren codieren, die für Prozesse, wie Änderung der Zellform, Zellwanderung und Zellproliferation, die in anderen Spezies für einen reibungslosen Ablauf der Gastrulation notwendig sind, gebraucht werden (Spring et al., 2000).

1.3.2 *Snail* und die Funktion seiner Homologen in anderen Spezies

Das erste Mitglied der Snail-Familie, *snail* wurde in *Drosophila melanogaster* (Grau et al., 1984; Nüsslein-Volhard et al., 1984) beschrieben. Dort ist es für die Bildung der ventralen Furche und die nachfolgende Gastrulation im *Drosophila* Embryo notwendig (Alberga et al., 1991). *Snail* kodiert für einen Transkriptionsfaktor des sogenannten Zink-Finger-Typs, der fünf Zink-Finger vom C₂H₂-Typ besitzt, welche als sequenzspezifische DNA-Bindemotive dienen (Boulay et al., 1987; Knight und Shimeld, 2001). Der Besitz von vier oder fünf Zinkfingern des oben beschriebenen Typs ist charakteristisch für die Mitglieder der Snail-Superfamilie. Mitglieder dieser Familie von Zink-Finger-Transkriptionsfaktoren sind beim Mensch (Paznekas et al., 1999), bei der Maus (Nieto et al., 1992), beim Huhn (Sefton et al., 1998), beim Frosch (Sargent und Bennett, 1990), bei *Danio* (Hammerschmidt und Nüsslein-Volhard, 1993; Thisse et al., 1993) und bei *Takifugu* (Smith et al., 2000), sowie bei *Branchiostoma* (Langeland et al., 1998) analysiert worden. Bei den Urochordata finden sich Homologen bei *Ciona* (Corbo et al., 1997) und *Halocynthia* (Wada und Saiga, 1999). Im Stamm der Deuterostomia ist außerdem bei dem Seestern *Lytechinus variegatus* (Wu und McClay, 2007) ein Snail Homolog bekannt.

Beim Überstamm der Ecdysozoa finden sich neben der Analyse bei *Drosophila* (Grau et al., 1984; Nüsslein-Volhard et al., 1984) Homologen bei *Caenorhabditis elegans* (Metzstein und Horvitz, 1999), dem Diplopoden *Glomeris marginata* (Pioro und Stollewerk, 2006) und der Spinne *Cupiennius salei* (Weller und Tautz, 2003).

Mitglieder der Snail-Superfamilie sind auch bei *Capitella capitata* (Dill et al., 2007), *Helobdella robusta* (Goldstein et al., 2001) und *Patella vulgata* (Lespinet et al., 2002) kloniert und analysiert worden. Diese Spezies gehören zum Überstamm der Lophotrochozoen.

Auch bei Spezies, die nicht zu den Bilateria gehören wurden Snail Homologen isoliert und analysiert. Dies sind die Cnidarier *Nematostella vectensis* (Martindale et al., 2004), *Acropora millepora* (Hayward et al., 2004) und *Podocoryne carnea* (Spring et al., 2002).

In *Drosophila* findet sich *snail* Expression im präsumptiven Mesoderm (Leptin, 1991), wo es als Inhibitor neuroektodermale Gene wie *rhabdoid* und *single-minded* unterdrückt (Ip et al., 1992a; Kasai et al., 1998). Während die Isolierung und Analyse von Snail Homologen verschiedener Spezies eine konservierte Rolle von *snail* bei der Mesodermspezifizierung in *Tribolium* (Sommer und Tautz, 1994), *Ciona* und *Halocynthia* (Corbo et al., 1997; Wada und Saiga, 1999), sowie *Branchiostoma* (Langeland et al., 1998) ergab, findet sich bei den Vertebraten eine Rolle bei der Mesodermdifferenzierung (Nieto et al., 1994; Carver et al., 2001). Bei den bisher analysierten Spezies der Lophotrochozoa findet sich keinerlei Verbindung zwischen Mesodermspezifizierung oder Mesodermdifferenzierung und *snail* Expression. Hier scheint die Rolle des Transkriptionsfaktors eher bei der Auslösung einer epithelialen mesenchymalen Transition (EMT) bei migrierender Zellen zu liegen (Goldstein et al., 2001; Lespinet et al., 2002; Dill et al., 2007).

Diploblasten besitzen kein Mesoderm in *sensu stricto*, dennoch besitzen sie zu *snail* homologe Gene. Diese werden während der Gastrulation im präsumptiven Endoderm exprimiert, das durch die Invagination des Ektoderms entsteht (Spring et al., 2002; Fritzenwanker et al., 2004; Hayward et al., 2004; Martindale et al., 2004; Magie et al., 2007). Diese morphogenetische Bewegung erinnert an das was sich während der Mesodermbildung in *Drosophila* abspielt, bei der *snail* eine zentrale Rolle spielt, und weist ebenfalls auf einer Rolle der *snail* Homologen bei der Zellwanderung hin.

1.3.3 *Platynereis twist* und *snail*

In der vorliegenden Arbeit habe ich mich mit der Analyse der Mechanismen beschäftigt, die zur Festlegung und Differenzierung mesodermalen Zellschicksals in *Platynereis dumerilii* führen. Obwohl über den Ursprung des Mesoderms aus 4d schon lange Klarheit herrscht (Wilson, 1892; Dorresteijn, 1990) und durch neuere Analysemethoden bestätigt wurde (Ackermann *et al.*, 2005), waren über den molekularen Charakter der Determinanten, die in diesem Prozess eine Rolle spielen und die Mechanismen über die sie ihre Wirkung vermitteln, bis heute keine Daten vorhanden.

Um diese Fragestellung näher zu analysieren, habe ich im Verlauf dieser Arbeit die zu *twist* und *snail* homologen Gene von *Platynereis* als Kandidatengene kloniert und ihre Expression in der Früh- und Larvalentwicklung über stadienspezifische RT-PCR, Northern Blot Analysen sowie *in situ* Hybridisierungen lokalisiert und zeitlich charakterisiert.

Da *Platynereis* keinen Organismus darstellt, der genetischen Manipulationen zugänglich ist, etablierte ich durch die Injektion von *dsRNA* in adulte Tiere parentale *RNAi* vermittelte, funktionelle Analysen. Die Analyse der resultierenden Phänotypen ermöglicht uns einen Einblick in die Art und Weise, die der Festlegung mesodermalen Schicksals in *Platynereis* auf molekularer Ebene zugrunde liegt. Zur Verifizierung der Ergebnisse dieser Experimente, exprimierte ich *Pdu-twist* heterolog in *E. coli*, reinigte das rekombinante Protein auf und stellte durch Immunisierung von Kaninchen polyklonale Antiseren gegen Pdu-Twist her.

In *Drosophila* stellt Twist eine Determinante dar, deren Funktionsverlust zum Ausbleiben der Mesodermspezifizierung führt (Thisse *et al.*, 1987b). Zur Überprüfung der Frage, ob diese Entsprechungen eventuell durch eine in der Evolution konservierte funktionelle Komponente der beiden homologen Transkriptionsfaktoren vermittelt wird, stellte ich *UAS-Pdu-twist* transgene *Drosophila* her. Diese benutzte ich für, über *twi-GAL4/UAS-Pdu-twist* vermittelte, Rettungsexperimente an *twist*⁻ und *twist*⁻, *snail*⁻ *Drosophila* Stämmen.

Die in dieser Arbeit durchgeführten Analysen sind die Ersten, die die Erstellung eines Modells der molekularen Prozesse, die zu mesodermalen

Zellschicksal in *Platynereis* führen, ermöglichen. Durch den Vergleich mit anderen Modellsystemen ist es möglich einen Blick in die Evolution der Entwicklungsprinzipien zu werfen, die der Etablierung des dritten Keimblatts in den Bilateria zugrunde liegen und womöglich ursprüngliche zu identifizieren.

2 Material & Methoden

2.1 Geräte

Autoklaven

2540 EL, Tuttnauer Systec
Astell APA 090, Astell Scientific

Analysenwaage

Sartorius CP 1245, Sartorius AG

Beleuchtungseinheit

KL 1500 LCD, Schott

Bilddokumentation

ColorCube-12, SIS Olympus
ColorView-I, SIS Olympus
analySIS, SIS Olympus

Bunsenbrenner

Fireboy eco, IBS Integra Biosciences

Eismaschine

AF 100, Scotsman

Elektrophoresekammern für

horizontale Gelelektrophorese

Model 40-0708, PeqLab
Model 40-1214, PeqLab

Elektrophoresekammer für SDS-PAGE

PerfectBlue Twin S, PeqLab

Geldokumentation

E-Box Videosysteme, PeqLab

Gelgießstand für SDS-PAGE

Cast-It S, PeqLab

Heizblöcke

Rotilabo-Block-Heater H 250, Roth
LS1, VLM

Hybridisierungsöfen

Compact Line OV4, Biometra

Konfokales Laserscannmikroskop

Leica TSC SP5, Leica Microsystems

Magnetrührer

Model L-71, MBT Brandt

Magnetheizrührer

Model L-81, MBT Brandt

Mikroinjektor

FemtoJet™, Eppendorf

Mikromanipulator

Leitz

Mikroskope

Olympus BX 51 Olympus
Olympus BX 41, Olympus

Mikropipettenpuller

P-97 Flaming/Brown Micropipette
Puller, Sutter Instruments

Mikrowelle

Mikrowave 800, Severin

Netzgeräte

E 835, Consort
Standard Power Pack P25, Biometra

pH-Messgerät

pH 211, Hanna Instruments

Photometer

SmartSpec™ 3000, BioRad

Präzisionswaage

Sartorius BL 310, Sartorius AG

Molekulare Evolution und Phylogenie

Mega 3.1
(Kumar et al., 2004)

Reinstwasseranlage

Simplicity TM Water, Millipore

Rotator

Universitätswerkstätten Mainz

Schüttler

Rotamax 120, Heidolph

Mikrobiologische Sicherheitswerkbank

Holten Save 2010, Heto / Holten

Stereolupe

Leica MZ 16, Leica Microsystems

Semi-Dry Blotter

Biotec Fischer

Sequenzanalyse

BioEdit Sequence Alignment Editor,
Tom Hall

Thermocycler

Cyclone 25, PeqLab

Cyclone Gradient, PeqLab

Mastercycler Gradient, Eppendorf

Tischschüttler mit Inkubationshaube

Certomat R mit Certomat H, B. Braun

Trockenschrank

Memmert

Ultramikrotom

Reichert

Ultraschall-Desintegrator

Sonifier B12, Branson

Wärmeschrank

Heraeus

Wasserbäder

HC-4 / 10, Julabo

EC-BRU / PU (EC 19), Julabo

Vortex

L 46, MBT Brandt

Zentrifugen

Mikro 22R, Hettich

Mikro 20, Hettich

2.2 Chemikalien & Nährmedien

Die verwendeten Chemikalien und Reagenzien wurden, wenn nicht anders angegeben, von folgenden Firmen bezogen: AppliChem (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Sigma-Aldrich (Taufkirchen). Die Lösungen wurden mit Reinstwasser angesetzt und autoklaviert oder sterilfiltriert. Ihre Zusammensetzung ist bei den entsprechenden Protokollen angegeben.

2.3 Reagenziensätze

Zum Anfertigen dieser Arbeit wurden folgende molekularbiologische und proteinbiochemische Reagenziensätze verwendet:

RNeasy™ Protect Mini Kit	(Qiagen, 74124)
Omniscript RT-Kit	(Qiagen, 205111)
GeneRacer™ Kit	(Invitrogen, L1502-01)
SMART™RACE cDNA amplification Kit	(Clontech, 634914)
MiniElute™ Gel Extraction Kit	(Qiagen, 28604)
TOPO TA Dual Promoter Cloning Kit	(Invitrogen, K4600-01)
pGEM-T and pGEM-T easy Vector systems	(Promega, A1380)
FastPlamid™ Mini Kit	(Eppendorf, 0032 007.653)
DIG RNA Labeling Mix	(Roche, 11277073910)
Fluorescein RNA Labeling Mix	(Roche, 11685619910)
Biotin RNA Labeling Mix	(Roche, 11685597910)
His-Bind™ Purification Kit	(Novagen, 70239)
BugBuster™ + Lysonase™ Kit	(Novagen, 71370)
Vectastain Elite ABC Kit Standard	(Vector Laboratories, PK-6100)

TSA™ Fluorescein Tyramide Reagent Pack (PerkinElmer, SAT701001EA)

TSA™ Cyanine 3 Tyramide Reagent Pack (PerkinElmer, SAT704A001EA)

2.4 Antikörper und Seren

Zum immunhistochemischen oder immunfluoreszierenden Nachweis von Antigenen wurden folgende Antikörper und Seren in dieser Arbeit benutzt:

anti-RGS-His	(Qiagen, 34698)
anti-Penta-His	(Qiagen, 34698)
anti-Tetra-His	(Qiagen, 34698)
anti-PduTwist-8086	(diese Arbeit)
anti-PduTwist-8087	(diese Arbeit)
anti-acetyliertes Tubulin	(Sigma, T6793)
anti-Twist	(Roth <i>et al.</i> , 1989)
anti-Mef2	(Lilly <i>et al.</i> , 1995)
anti-GFP	(Abcam, ab290)
anti- β -Galaktosidase	(Promega, Z3781)
anti-Digoxigenin-AP, Fab-Fragmente	(Roche, 11093274910)
anti-Fluorescein-AP, Fab-Fragmente	(Roche, 11426338910)
anti-Biotin-AP, Fab-Fragmente	(Roche, 11426303001)
anti-Maus-IgG-AP	(Sigma, A3562)
anti-Maus-IgG-POD	(Sigma, A4416)
anti-Kaninchen-IgG-AP	(Sigma, A3687)
anti-Kaninchen-IgG-POD	(Sigma, A6154)
anti-Maus-IgG-Cy2	(JIR, 115-225-062)

anti-Maus-IgG-Cy3	(JIR, 115-165-062)
anti-Kaninchen-IgG-Cy2	(JIR, 111-225-045)
anti-Kaninchen-IgG-Cy3	(JIR, 111-165-045)
anti-Schaf-IgG, biotinyliert	(Vector Laboratories, BA-9200)
anti-Kaninchen-IgG, biotinyliert	(Vector Laboratories, BA-6000)
Schafserum	(Sigma, S3772)
Ziegenserum	(Sigma, G9023)

2.5 Vektoren

In der vorgelegten Arbeit wurden folgende Vektoren zur Herstellung von rekombinanten Konstrukten und nachfolgender Transformation in kompetente *Escherichia coli* (2.10.2) benutzt:

pCRII-TOPO (Invitrogen)

Klonierungsvektor, (Plasmidkarte siehe 7.3)

pCR4-TOPO (Invitrogen)

Klonierungsvektor, (Plasmidkarte siehe 7.4)

pGEM-T easy (Promega)

Klonierungsvektor, (Plasmidkarte siehe 7.5)

pQE-30 (Qiagen)

Induzierbarer Expressionsvektor zur heterologen Expression von Fusionsproteinen mit His-Tag (Plasmidkarte siehe 7.6)

pUAST (Brand und Perrimon, 1993)

P-Element Insertionsvektor (Plasmidkarte siehe 7.7)

p π 25.7wc (Karess und Rubin, 1984)

Helferplasmid für die P-Element-Transformation, das die codierende Sequenz für die P-Element-Transposase enthält

2.6 Stammhaltung und Kultivierung von *Escherichia coli*

In der vorgelegten Arbeit wurden folgende Stämme von *Escherichia coli* verwendet:

DH5- α (Life Technologies)

supE44 Δ lacU 169 (Φ 80 Δ lacZ M15) hsd R17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1

NEB 5-alpha (New England Biolabs)

fhuA2 Δ (argF-lacZ) U169 phoA glnV44 (Φ 80 Δ lacZ M15) gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17

TOP10 (Invitrogen)

F- mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) (Φ 80 lacZ Δ M15) Δ lacX74 recA1 araD139 Δ (araleu)7697 galU galK rpsL (Str^r) endA1 nupG

XL1Blue (Stratagene)

recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacI^q Δ M15 Tn10 (Tet^r)]

XL1Blue MRF' (Stratagene)

Δ (mcrA)183 Δ (mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac [F' proAB lacI^q Δ M15 Tn10 (Tet^r)]

Die Stämme XL1Blue und XL1 Blue MRF' besitzen das F'-Episom und das lacI^q Allel und überexprimieren den Lac-Repressor. Deshalb wurden sie für die induzierbare heterologe Expression von Fusionsproteinen mit His-Tag benutzt. Die Stämme XL1Blue MRF', NEB 5-alpha, DH5- α und TOP10 wurden zur Transformation mit rekombinanten Plasmiden verwendet.

Zur Stammhaltung und Kultivierung der Bakterienstämme dienten folgende Medien.

LB-Medium (Luria-Bertani)

1 % (w/v) Bactotrypton, 0,5 % (w/v) Hefeextrakt, 1 % (w/v) NaCl, pH = 7,0

LB-Agar (Luria-Bertani)

1,5 % (w/v) Agar, 1 % (w/v) Bactotrypton, 0,5 % (w/v) Hefeextrakt, 1 % (w/v) NaCl, pH = 7,0

Bakterienstammpplatten

Kurzfristige Stammhaltungen erfolgten auf festen LB-Agarböden, die nach der Anzucht bei 37 °C für vier Wochen bei 4 °C aufbewahrt werden konnten.

E. coli-Bakterien wurden vor Gebrauch von einer älteren Stammpplatte oder aus Bakterien-Dauerkulturen mit Hilfe einer sterilen Impföse auf Agarplatten mit dem entsprechendem Antibiotikum (Tabelle 2.1) ausgestrichen und bei 37 °C, bis einzelne Kolonien sichtbar wurden (über Nacht), in einem Inkubator kultiviert.

Bakterienflüssigkulturen

Eine einzelne Kolonie wurde mit einer sterilen Impföse von einer Stammpplatte in ein steriles Kulturgefäß mit dem entsprechendem Selektionsmedium (Tabelle 2.1) übertragen. Die Kultivierung erfolgte im Schüttelinkubator bei 37 °C (180 Umdrehungen pro Minute). Das Wachstum der Bakterienkulturen wurde durch Messung der optischen Dichte bei $\lambda = 600 \text{ nm}$ (OD_{600}) bestimmt.

Glycerindauerkulturen

Zur langfristigen Stammhaltung wurde eine einzelne Kolonie von einer Stammpplatte in ein steriles Inkubationsgefäß mit 5 ml entsprechendem Selektivmedium (Tabelle 2.1) überimpft und entweder über Nacht oder bis zu einer $OD_{600} > 1$ bei 37 °C auf einem Schüttelinkubator inkubiert. 0,5 ml dieser frischen Flüssigkultur wurden mit 0,5 ml 80 % (v/v) sterilem Glycerin in Reinstwasser gemischt und danach bei -80 °C aufbewahrt.

Tabelle 2.1: Antibiotikaresistenzen der verwendeten Bakterienstämme.

Bakterienstamm	Antibiotikaresistenz (Arbeitskonzentration)
DH5- α	keine
NEB 5-alpha	Tetrazyklin (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$)
TOP10	Streptomycin (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$)
XL1Blue	Tetrazyklin (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$)
XL1Blue MRF'	Tetrazyklin (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$)
transformierte Stämme	Ampicillin (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$)

2.7 Haltung und Zucht von *Platynereis dumerilii*

Platynereis dumerilii wird in Laborkultur im Institut für Allgemeine und Spezielle Zoologie in Giessen nach Hauenschild und Fischer (Hauenschild und Fischer, 1969) gehalten und gezüchtet. Die Methoden zur Gewinnung, Besamung und Handhabung der Embryonen sind von Dorresteijn (Dorresteijn, 1990) ausführlich beschrieben worden.

2.7.1 Präparation von *Platynereis* Entwicklungsstadien für die RNA- und Proteinextraktion

Sollten unbefruchtete Eizellen präpariert werden, wurde ein epitokes Weibchen mit 3,5 % (w/v) MgCl₂ in natürlichem Seewasser (NSW) betäubt, lateral mit einer Pinzette die Körperwand eröffnet, die Oocyten mit Seewasser aus dem Körper gespült und in ein 1,5 ml Eppendorfreaktionsgefäß überführt. Zur Präparation von RNA aus embryonalen Entwicklungsstadien wurden mehrere Gelege von *Platynereis dumerilii* gleichzeitig besamt. Wenn das gewünschte Entwicklungsstadium bevor sich Schwimmlarven (Trochophorae) entwickelt hatten erreicht war, wurden sämtliche Keime des Geleges in ein Nylonnetz (Maschenweite 100 µm) überführt und, um die die Embryonen umgebende Gallerte möglichst vollständig zu entfernen, mehrmals mit viel NSW gewaschen. Die gewaschenen Embryonen wurden dann in ein Eppendorfreaktionsgefäß überführt. Bei Gelegen deren Embryonen schon das Trochophorastadium erreicht hatten, wurden die Larven mit Hilfe einer Kaltlichtlampe ans Licht gelockt und in ein Eppendorfreaktionsgefäß überführt. Das überstehende Seewasser in den Reaktionsgefäßen wurde abgenommen und die Gelege entweder sofort in Lyse-Puffer (2.11.2, 2.13.6) homogenisiert oder in Stickstoff schockgefroren. Bis zur weiteren Verwendung wurden sie bei -80 °C gelagert.

Subadulte und adulte *Platynereis*-Stadien wurden solange bis kein Darminhalt mehr sichtbar war vereinzelt gehalten. Für die RNA- und Proteinpräparation wurden sie im Ganzen in Stickstoff schockgefroren, im stickstoffgekühlten Mörser zu Pulver zerrieben und dann im entsprechenden Puffer (2.11.2, 2.13.6) aufgenommen.

2.8 Haltung und Zucht von *Drosophila melanogaster*

Bei der Anfertigung dieser Arbeit wurden die im folgenden Abschnitt gelisteten Fliegenstämme benutzt. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wird jeder Stamm mit einer Kurzbezeichnung bzw. einem Trivialnamen benannt. Die mit dem Präfix BL und einer Stocknummer gekennzeichneten Stämme wurden vom Bloomington *Drosophila* Stock Center (Indiana University, Bloomington, Indiana, USA) bezogen.

SGS-GAL4	GAL4-Treiberlinie, die unter Kontrolle der sgs-regulatorischen Elemente steht, zur Verfügung gestellt von A. Holz, Giessen
rp298-GAL4	GAL4-Treiberlinie, die unter der Kontrolle der rp298-regulatorischen Elemente steht, zur Verfügung gestellt von A. Holz, Giessen
BL 6873	<i>Pf108.4, w¹</i> Enhancer Trap-GAL4-Treiberlinie, Expression im embryonalen Mesoderm Donor: Michael Akam
UAS-PduTwi1a	P-Element-Insertionslinie mit pUAST-Pdu-twi
UAS-PduTwi2a	P-Element-Insertionslinie mit pUAST-Pdu-twi
UAS-PduTwi3a	P-Element-Insertionslinie mit pUAST-Pdu-twi
UAS-PduTwi5a	P-Element-Insertionslinie mit pUAST-Pdu-twi
UAS-2xeGFP	P-Element-Insertionslinie mit pUAST-2xeGFP Zur Verfügung gestellt von A. Holz, Giessen
UAS-LacZ	P-Element-Insertionslinie mit pUAST-LacZ Zur Verfügung gestellt von A. Holz, Giessen
white¹¹¹⁸	Transformationsstamm, Transposase-frei zur Verfügung gestellt von A. Holz, Giessen
BL 2381	<i>cn¹ twi¹ bw¹ sp¹/CyO</i> Donor: Mark Seeger
BL 3299	<i>cn¹ sna¹⁸ twi³ bw¹ sp¹/CyO</i> Donor: C. Nüsslein-Volhard
Balancer II.	Blaubalancer für II. Chromosom <i>w;sp/CyO ftz lacZ</i>

Weitere Informationen zu den entsprechenden Stämmen sind erhältlich unter flystocks.bio.indiana.edu.

Maismehlagar

60 % (w/v) Maismehl, 7,15 % (w/v) Fructose, 1,2 % (w/v) Trockenhefe, 0,14 % (w/v) Nipagin, 0,6 % (w/v) Propionsäure, 0,7 % (w/v) Agar

Die Aufzucht der Fliegen erfolgte in Kunststoffröhrchen verschiedener Größe, die etwa zu einem Viertel mit Maismehlagar gefüllt waren und mit einem Plastikstopfen verschlossen wurden. Zur Fütterung der Tiere wurde zusätzlich eine Prise gekörnte Trockenhefe auf den Agar gegeben. Die Haltung der Fliegenstämme erfolgte in einem klimatisierten Raum oder Inkubator bei 18 °C bzw. 25 °C. Zur experimentellen Handhabung wurden die Tiere kurz mit Kohlenstoffdioxid narkotisiert.

2.8.1 Präparation von *Drosophila*-Entwicklungsstadien für die RNA- und Proteinextraktion

Apfelsaftagar

25 % (v/v) Apfelsaft, 1,25 % (w/v) Saccharose, 2,5 % (w/v) Trockenhefe, 0,2 % (w/v) Nipagin, 2,7 % (w/v) Agar

0,7 % NaCl-Lösung

0,7 % (w/v) NaCl, 0,02 % (v/v) Triton™ X-100 (Sigma, X100)

Zur Eiablage wurden die Fliegen auf mit Apfelsaftagar gefüllte Plastikflaschen gesetzt. Zur Fütterung wurde auf den Apfelsaftagar zusätzlich eine Portion Trockenhefe gegeben. Die Embryonen wurden dann mit einem Pinsel und 0,7 % NaCl-Lösung abgesammelt, die Flüssigkeit abgenommen und dann entweder in flüssigen Stickstoff schockgefroren oder direkt in Lysepuffer (2.11.2.3) aufgenommen. *Drosophila* Larven wurden mit der Federstahlpinzette aus den Flaschen abgesammelt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

2.9 Synthetische Oligonukleotide

Die im Folgenden aufgelisteten Oligonukleotide wurden bei den Firmen Carl-Roth (Karlsruhe) und MWG-Biotech (Ebersberg) zur Synthese in Auftrag gegeben. Sie wurden als Primer in der Polymerase-Kettenreaktion (2.12.5) zur sequenzspezifischen DNA-Amplifizierung eingesetzt.

a) degenerierte Primer

Zur Amplifizierung und Klonierung von Fragmenten der *Platynereis dumerilii* Homologen der *Drosophila*-Gene *twist* und *snail* wurden sogenannte degenerierte Primer entworfen. Sie sind in ihrer Sequenz teilweise variabel und tragen somit der Degeneration des genetischen Codes im Verlaufe der Evolution Rechnung. Zur Codonnutzung von *Platynereis* siehe Dissertation Heimann (Heimann, 2000).

Tabelle 2.2: Nukleotidsequenzen der degenerierten Primer.

Primername	Nukleotidsequenz
Tw3F	5'-GCCAACGTCCGCGA(AG)(AC)G(AGCT)CA(AG)(AC)G-3'
Tw3R	5'-TCCATGCGCCACACG(GC)(AT)(AG)AA(AGCT)GC(AG)TA-3'
Tw5F	5'-CCTTCGCCCCGCTG(AC)G(AGCT)AA(AG)AT(ACT)(AG)T-3'
SnaF1	5'-GG(AGCT)GC(AGCT)(CT)T(AGCT)AA(AG)ATGCA(CT)AT-3'
SnaR1	5'-(AG)AA(AGCT)GG(CT)TT(CT)TC(AGCT)CC(AGCT)GT(AG)TG-3'

b) genspezifische Primer

Tabelle 2.3: Nukleotidsequenzen der verwendeten genspezifischen Primer.

Primername	Nukleotidsequenz
Pduactin RT F	5'-AGATCTGGCATCACACCTTCTAC-3'
Pduactin RT R	5'-CTCGTGGATAACCAGCGGATTC-3'
PdutwiRACE F	5'-CCAACGTGCGCGAGCGACAGAGTACACA-3'

PdutwiRACE R	5'-GCCACGGTAACTGCAGGACGGGGGAA-3'
Twist pro F	5'-GCGAGCGACAGAGTACACAAT-3'
Twist pro R	5'-TGCATAGCTGAGTCTCTCGTG-3'
TwifuF	5'-ATACAGGAGTACATAGAAGGGACTG-3'
TwifuF_cDNA	5'-AGTTCATGCTAAGCCCTCGACT-3'
TwifuF_ATG	5'-ATGATACAGGAGTACATAGAAGGG-3'
TwifuR	5'-GTGGCCGTTGACTCCGTTTCAT-3'
TwifuR_cDNA	5'-TTTATTAGATGTGAGCAGAAATCAC-3'
Pdutwist RT1 F	5'-AAGGGACTGTTGACAACGG-3'
Pdutwist RT1 R	5'-AATGAGCTTGTGGTCCA-3'
Pdu_twi_SacI	5'-AAGCAGAGCTCATA CAGGAGTACATA-3'
Pdu_twi_HindIII	5'-ATATCGTAAGCTTGTGGCCGTTGACT-3'
PdSna6F	5'-GGGGCGTTAAAGATGCAC-3'
PdSna6R	5'-TGAGGTTTGAACGGTCAGC-3'
PdSnaRACE R	5'-GGGCGCTGAGGTTTGAACGGTCAGCA-3'
PdSnaRACE F	5'-AAGATGCACATCCGGACGCACACCCTG-3'
Pdsnail_R_1	5'-TGTTGTGCTTTTAATTACAG-3'
Pdsnail_R_2	5'-ATTGAAAGTCTTGATAATTCCAG-3'
Pdsnail_F_1	5'-ACCCTGCCCTGCAAATGCCCC-3'
Pdsnail_F_2	5'-ATGCACATCCGGAGCGCACACCCTG-3'
PduSnail RT N2F	5'-GCTACTCCAGTGACACCTTGC-3'
PduSnail RT NR	5'-GATGGGGGTGGTTGTTAG-3'
T7-SP6	5'-TAATACGACTCACTATAGGATTTAGGTGACACTATAGA-3'

c) plasmidspezifische Primer

Tabelle 2.4: Nukleotidsequenzen der verwendeten plasmidspezifischen Primer.

Primername	Plasmid	Nukleotidsequenz
pUA5xB	pUAST	5'-ATCTCTGTAGGTAGTTTGTCC-3'
pUA3EC	pUAST	5'-ACTGCAACTACTGAAATCTGC-3'
pQESeq	pQE-30	5'-CGGATAACAATTTACACACAG-3'
SP6	pCRII-TOPO, pGEM-T easy	5'-CATTTAGGTGACACTATAG-3'
T7	pCRII-TOPO, pGEM-T easy	5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'
M13F(-20)	pCRII-TOPO, pGEM-T easy	5'-GTAAAACGACGGCCAG-3'
M13F(-40)	pCRII-TOPO, pGEM-T easy	5'-GTTTTCCCAGTCACGAC-3'
M13R	pCRII-TOPO, pGEM-T easy	5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'

2.10 Präparation und Analyse von DNA

2.10.1 Herstellung chemisch kompetenter Bakterien

RF1-Puffer

10 mmol/l RbCl, 50 mmol/l MnCl₂, 30 mmol/l KCl, 10 mmol/l CaCl₂, 15 % (v/v)
Glycerin

RF2-Puffer

10 mmol/l MOPS (pH = 6,8), 10 mmol/l RbCl, 75 mmol/l CaCl₂, 15 % (v/v)
Glycerin

SOB-Medium

0,5 % (w/v) Hefeextrakt, 2,0 % (w/v) Bactotrypton, 10 mmol/l NaCl, 2,5 mmol/l
KCl, 10 mmol/l MgCl₂, 10 mmol/l MgSO₄

Die Herstellung chemisch kompetenter Bakterien wurde nach Sambrook und Russell (Sambrook und Russell, 2001) durchgeführt. Hierzu wurden 200 ml SOB-Medium mit 2,0 ml einer frischen *E. coli* Übernachtskultur (2.6) angeimpft und im Schüttelinkubator bis zum Erreichen einer $OD_{260} = 0,5$ bis $OD_{260} = 0,6$ bei 37 °C inkubiert. Nach fünfzehnminütiger Inkubation auf Eis wurden die Zellen pelletiert (10 Minuten, 4000 UpM, 4 °C), in 80 ml eiskaltem RF1-Puffer resuspendiert und erneut für 15 Minuten auf Eis gekühlt. Die Bakterienzellen wurden erneut abzentrifugiert (10 Minuten, 4000 UpM, 4 °C), in 20 ml RF2-Puffer aufgenommen und für 15 Minuten auf Eis inkubiert.

Abschließend wurde die Zellsuspension in 200 µl Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

2.10.2 Transformation chemisch kompetenter Bakterien

SOC-Medium

0,5 % (w/v) Hefeextrakt, 2,0 % (w/v) Bactotrypton, 10 mmol/l NaCl, 2,5 mmol/l
KCl, 10 mmol/l MgCl₂, 20 mmol/l MgSO₄, 20 mmol/l Glukose (erst nach dem Autoklavieren zugeben)

Die Transformation chemisch kompetenter Bakterien wurde nach Sambrook und Russell (Sambrook und Russell, 2001) durchgeführt. Zur Transformation von Plasmid-DNA in chemisch kompetente *E. coli* wurden 200 µl kompetente Zellen (2.10.1) auf Eis aufgetaut, mit 10 µl bis 20 µl Plasmidlösung (entspricht 10 ng Plasmid) versetzt und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Die Bakterien wurden anschließend im Wasserbad bei 42 °C für 30 Sekunden einem Hitzeschock ausgesetzt und danach sofort auf Eis gebracht. Nach einer fünfminütigen Inkubation wurden 800 µl vorgewärmtes SOC-Medium zugegeben und die Zellen eine Stunde, in der sich die Antibiotikaresistenz ausbildet, bei 37 °C unter Schütteln (180 UpM) bebrütet. Um eine Blau/Weiss-Selektion (2.10.3.1) bei den Transformanten durchzuführen wurden auf LB-Selektionsplatten (100 µg Ampicillin /ml) zusätzlich noch 40 µl X-Gal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranosid, 100 mmol/l, Roth, 2315.3) ausgestrichen. Danach wurden Aliquots des Transformationsansatzes mit dem Drigalski-Spatel ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Die Stämme XL1Blue und XL1Blue MRF' überexprimieren den Lac-Repressor *lacI^q* und müssen deshalb, wenn eine Blau/Weiss-Selektion gewünscht ist, mit IPTG (40 µl, 100 mmol/l) induziert werden.

2.10.3 Selektion rekombinanter bakterieller Kolonien

2.10.3.1 Blau/Weiss-Selektion

Neben dem Gen für die Ampicillin-Resistenz zur Selektion transformierter Bakterien, kodieren die in dieser Arbeit verwendeten Klonierungsvektoren noch für ein Fragment der β-Galaktosidase. In Zellen, die einen komplementären Abschnitt desselben Gens enthalten entsteht so eine funktionelle β-Galaktosidase (α-Komplementation). Die Produktion der β-Galaktosidase kann man aufgrund eines Farbumschlags des farblosen X-Gal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranosid) ins Blaue verfolgen.

Um die Zellen identifizieren zu können, die rekombinante Vektoren enthalten, befindet sich die Multiple Klonierungsstelle (Polylinker) in der codierenden Sequenz für das Markergen. Wird rekombinante DNA in die Mitte des Polylinkers

eingebaut, führt dies dazu, dass keine funktionelle β -Galaktosidase mehr produziert wird. Deshalb zeigen Zellen, die Vektoren mit rekombinanter DNA enthalten in der Gegenwart von X-Gal keinen Farbumschlag, wohingegen sich Zellen, deren Vektoren keine DNA aufgenommen haben, blau färben (Insertionsinaktivierung).

Um eine Blau/Weiss-Selektion durchzuführen wurden vor dem Ausplattieren des Transformationsansatzes (2.10.2) 40 μ l X-Gal (100 mmol/l, Roth, 2315.3) auf einer vorgewärmten Selektionsplatte (100 μ g Ampicillin/ml LB-Agar,) mit dem Drigalski-Spatel ausplattiert.

2.10.3.2 Restriktionsverdau von isolierter Plasmid-DNA

Vektoren, die rekombinante DNA enthalten, lassen sich auch über einen Restriktionsverdau (2.12.2) von isolierter Plasmid-DNA (2.10.4) identifizieren.

Der Polylinker, der in dieser Arbeit verwendeten Vektoren (2.5), enthält flankierend zu der inserierten rekombinanten DNA Erkennungsstellen für die Restriktionsendonuklease *Eco* RI. Durch einen Restriktionsverdau mit dem bakteriellen Enzym *Eco* RI kann die rekombinante DNA aus dem ringförmigen Plasmid „herausgeschnitten“ werden.

500 ng	Plasmid-DNA
0,5 μ l	<i>Eco</i> RI (10 U/ μ l, Fermentas, #ER0271)
2 μ l	10x Reaktions-Puffer <i>Eco</i> RI
Ad 20 μ l	Reinstwasser

Der Reaktionsansatz wurde nach obigen Angaben angesetzt und für 2 Stunden bei 37 °C inkubiert. Die Restriktionsfragmente wurden durch Agarosegelelektrophorese der Größe nach aufgetrennt und analysiert (2.10.7).

2.10.3.3 Kolonie-Polymerase-Kettenreaktion (Kolonie-PCR) mit plasmidspezifischen Primern

Zellklone, die Vektoren enthalten, in deren multipler Klonierungsstelle rekombinante DNA enthalten ist, lassen sich auch über eine Kolonie-PCR (2.12.5) identifizieren.

Hierbei macht man sich zunutze, dass flankierend zum Polylinker bestimmter Klonierungsvektoren (2.5) Bindestellen für plasmidspezifische Primer (z.B. M13F/M13R 2.9c, oft auch für SP6, T7 oder T3) lokalisiert sind und der DNA-Abschnitt zwischen den Primern mittels Polymerase-Kettenreaktion amplifiziert werden kann.

Hierzu wird von der Transformationsplatte ein Klon mit einem sterilen Zahnstocher aufgenommen, in PCR-Reaktionsgemisch resuspendiert und die Polymerase-Kettenreaktion (2.12.5.1) durchgeführt. Wichtig ist hierbei eine initiale zehnminütige Inkubation bei 95 °C, um die Bakterien zu denaturieren und die Plasmid-DNA ins Reaktionsgemisch zu entlassen.

Die Amplifikate werden durch Agarosegelelektrophorese der Größe nach aufgetrennt und analysiert (2.10.7).

2.10.4 Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli*

2.10.4.1 Plasmidpräparation durch alkalische Lyse

Um rekombinante Plasmid-DNA aus transformierten *E. coli* aufzureinigen wurde auf die Methode von Birnboim und Doly (Birnboim und Doly, 1979) zurückgegriffen. Hierzu vermehrt man zuerst den bakteriellen Klon, lysiert dann die Zellen und präpariert aus dem Lysat die DNA. Um die rekombinante DNA von der Wirts-DNA zu trennen bedient man sich der Unterschiede zwischen ihr und der bakteriellen chromosomalen DNA. Bei Bakterien besteht das Chromosom, wie auch sämtliche Plasmide, aus zirkulärer doppelsträngiger DNA. Das Chromosom ist aber verhältnismäßig groß (etwa 4,3 MBp) im Vergleich zu den meisten rekombinanten DNA-Molekülen, die oft nur wenige Kilobasenpaare lang sind.

Während der Zelllyse und der nachfolgenden Extraktion wird das Chromosom, nicht aber die Plasmid-DNA gebrochen und geschert, dabei entstehen lineare DNA-Fragmente mit freien Enden. Man kann diesen Unterschied ausnutzen, indem man die isolierte DNA denaturiert und einem alkalischen pH-Wert aussetzt. Aufgrund ihrer kovalent geschlossenen zirkulären Konformation lässt sich die Plasmid-DNA durch Neutralisierung vollständig renaturieren, während die chromosomale DNA denaturiert bleibt, ausfällt und durch Zentrifugation zusammen mit Zelltrümmern und Proteinen präzipitiert werden kann. Im Überstand findet sich die Plasmid-DNA, die dann durch Phenol/Chloroform-Extraktion (2.10.5.1) und Fällung (2.10.5.1) weiter aufgereinigt werden kann.

Alkalische Lyse Puffer I (P1)

50 mmol/l Glukose, 25 mmol/l Tris-HCl (pH = 8,0), 10 mmol/l EDTA (pH = 8,0)

Alkalische Lyse Puffer II (P2)

200 mmol/l NaOH, 1 % (w/v) SDS, sollte frisch hergestellt werden

Alkalische Lyse Puffer III (P3)

60 ml 5M Kaliumacetat, 11,5 ml Essigsäure, 28,5 ml H₂O

Präparation der Zellen

Zur Vermehrung der rekombinanten DNA wurde von einer Stammplatte mit einer sterilen Impföse eine einzelne Kolonie in eine 5 ml Flüssigkultur (LB-Medium, 100 µg Ampicillin/ml) überimpft und 16 Stunden bei 37 °C im Schüttelinkubator bebrütet. Die Bakterienzellen wurden durch Zentrifugation (10 Minuten, 4000 UpM, 4 °C) pelletiert und der Überstand verworfen. Dabei wurde darauf geachtet das Pellet so „trocken“ wie möglich zu präparieren.

Lyse der Zellen

Zur Lyse der Zellen wurde das Bakterienpellet in 200 µl eiskaltem P1 durch Vortexen resuspendiert und in ein sauberes 1,5 ml Eppendorfreaktionsgefäß transferiert. Durch Zugabe von 400 µl P2 und mehrmaligem Invertieren wurde die DNA denaturiert, mit 400 µl eiskaltem P3 wurde die Lösung neutralisiert und das gebildete Präzipitat abzentrifugiert (10 Minuten, 14000 UpM, 4 °C). Die wässrige

Phase mit der gelösten Plasmid-DNA wurde in ein frisches 1,5 ml Eppendorfreaktionsgefäß transferiert.

Präparation der DNA

Zur Präparation der Plasmid-DNA wurde das geklärte Lysat mit 600 µl Isopropanol versetzt, gevortext und 2 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Durch Zentrifugation (10 Minuten, 14000 UpM) wurden die präzipitierten Nukleinsäuren gesammelt und der Überstand verworfen. Das Nukleinsäurepellet wurde mit 1 ml 70 % (v/v) Ethanol gewaschen und erneut für 10 Minuten bei 14000 UpM zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut verworfen und die präzipitierte DNA getrocknet. Das getrocknete Pellet wurde in 50 µl TE-Puffer (pH = 8,0) oder 10 mmol/l Tris-HCl (pH = 8,5) gelöst und die Plasmid-DNA bei -20 °C gelagert. Die in der Präparation ebenfalls enthaltene RNA kann durch Zugabe von 20 µg/ml DNase-freier RNase entfernt werden.

Die meisten der erhältlichen Reagenziensätze zur Plasmidpräparation beruhen ebenfalls auf diesem Prinzip. Nur anstatt die Nukleinsäuren alkoholisch zu fällen und zu präparieren, werden diese affinitätschromatographisch an Silikasäulen aufgereinigt und durch Veränderung des Salzgehalts eluiert.

2.10.4.2 FastPlasmid™-Präparation

Das FastPlasmid™-Verfahren (Eppendorf) arbeitet mit einer 1-Schritt-Lyse, bei welcher die Bakterien in einem Schritt resuspendiert und lysiert werden. Diese werden ohne eine vorhergehende Zentrifugation auf eine Silikasäule aufgetragen und von dort mit Niedersalzpuffer eluiert. Das Herstellerprotokoll wurde folgendermaßen modifiziert.

3 ml Flüssigkultur (100 µg Ampicillin/ml LB-Medium) wurden in einem sterilen Inkubationsgefäß mit einer einzelnen transformierten Kolonie beimpft, 16 Stunden bei 37 °C auf dem Schüttelinkubator bebrütet (180 UpM) und die Zellen durch Zentrifugation (15 Minuten, 4000 UpM, 4 °C) pelletiert. Der Überstand wurde abgenommen und verworfen.

Das Zellpellet wurde in 400 µl eiskaltem Lyse-Puffer resuspendiert und 30 Sekunden gevortext. Nach einer 5 minütigen Inkubation bei Raumtemperatur und der Zugabe von 125 µl Isopropanol, wurde das Zelllysat auf die

FastPlasmid™-Säule aufgetragen und 1 Minute bei 14000 UpM zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und die Säulenmatrix mit 400 µl Wasch-Puffer gewaschen (1 Minute, 14000 UpM). Durch eine erneute Zentrifugation (1 Minute, 14000 UpM) wurde der in der Säule verbliebene Waschpuffer entfernt.

Zur Elution der DNA wurden 50 µl Elutions-Puffer auf die Säule aufgetragen und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die DNA wurde darauf folgend durch einminütige Zentrifugation eluiert. Die eluierte Plasmid-DNA wurde bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

2.10.4.3 „Midi“-Präparation mit dem JETSTAR Midi Plasmid Kit 2.0

Zur Präparation größerer Mengen hochreiner Plasmid-DNA, wurde das JETSTAR Midi Plasmid Kit 2.0 benutzt.

Hierzu wurden 25 ml Flüssigkultur (100 µg Ampicillin/ml LB-Medium) in einem sterilen Erlenmeyerkolben mit einer Einzelkolonie beimpft und für 16 Stunden bei 37 °C auf dem Schüttelinkubator (180 UpM) bebrütet. Die chromatographische Aufreinigung der Plasmid DNA wurde nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt. Die präparierte Plasmid-DNA wurde bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

2.10.5 Präparation von DNA aus wässrigen Lösungen

2.10.5.1 Fällung von DNA aus wässriger Lösung

Nukleinsäuren aus wässriger Lösung wurden nach Sambrook und Russell (Sambrook und Russell, 2001) präpariert. Durch Zugabe von 1/10-Volumen 3 mol/L Na-Acetat Lösung (pH = 5,5) oder 1 Volumen 4 mol/l NH₄-Acetat-Lösung wurden die in Reinstwasser oder TE-Puffer gelösten Nukleinsäuren zunächst mit monovalenten Kationen angereichert. Nach gründlicher Durchmischung wurden die Nukleinsäuren entweder durch Zugabe von zwei Volumina (3 mol/l Na-Acetat) oder vier Volumina (4 mol/l NH₄-Acetat) auf -20 °C gekühltem 96 % (v/v) Ethanol über Nacht bei -20 °C gefällt. In dieser Form konnten die Nukleinsäuren bei -20 °C oder -80 °C bis zur Verwendung gelagert werden.

Vor Gebrauch wurden die Nukleinsäuren durch Zentrifugation (30 Minuten, 14000 UpM, 4 °C) präzipitiert. Nach dem vorsichtigen Entfernen des Überstandes wurde das Nukleinsäure-Pellet mit 70 % (v/v) Ethanol gewaschen und an der Luft getrocknet. Das getrocknete Pellet wurde dann entweder in 0,1 mol/l Tris-HCl (pH = 8,5) oder Reinstwasser wieder in Lösung gebracht. Zu langes Trocknen wurde vermieden, da ansonsten Schwierigkeiten beim Lösen der Nukleinsäuren auftreten konnten.

2.10.5.2 *Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol Extraktion*

Um Nukleinsäurelösungen von Proteinen zu befreien wurde 1 Volumen Phenol (äquilibriertes Roti-Phenol (pH = 7,5); Roth, 0038.2) zu der Probe gegeben und durch Vortexen oder Schütteln gründlich gemischt. Um die Phasen zu trennen wurde die Probe bei 4 °C und maximaler Geschwindigkeit (14000 UpM) 30 Minuten zentrifugiert. Die wässrige Phase, in der die Nukleinsäuren enthalten waren, wurde abgenommen und in ein sauberes Reaktionsgefäß überführt. Dabei wurde darauf geachtet, dass kein Material der Phasengrenze in die wässrige Phase verschleppt wurde. Danach folgten zwei Extraktionen mit einem Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) Gemisch. Abschließend wurde die Probe einer weiteren Chloroform-Extraktion unterzogen. Diese Schritte entfernten noch eventuell vorhandenes Protein und Phenol.

Wenn die Nukleinsäuren in einem folgenden Schritt für enzymatische Reaktionen benutzt werden sollten, wurden sie mit Ethanol gefällt (2.10.5.1) und in 0,1 mol/l Tris-HCl (pH = 8,5) oder Reinstwasser wieder in Lösung gebracht.

2.10.6 **Präparation von genomischer *Platynereis dumerilii* DNA**

Gewebelyse

Zur Präparation genomischer DNA wurde ein adulter *Platynereis*, der einige Tage isoliert gehalten und nicht gefüttert wurde, im stickstoffgekühlten Mörser mit dem Pistill zu Pulver zerrieben und mit 1 ml DNAzol™ Genomic DNA Isolation Reagent (Molecular Research Center, DN 127) versetzt. Nachdem sich das Gewebepulver gelöst hatte, wurden unlösliche Gewebedebris, RNA und Mukopolysaccharide durch eine 10 minütige Zentrifugation (14000 UpM, 4 °C)

entfernt und der visköse Überstand in ein frisches 1,5 ml Eppendorfreaktionsgefäß überführt.

DNA-Präparation

Zur Präzipitation der DNA wurden dem Lysat 0,5 ml 96 % (v/v) Ethanol zugegeben, durch mehrmaliges Invertieren gemischt und der Ansatz für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die gefällte DNA wurde als wolkiges Präzipitat sichtbar, das entweder mit einer Pipettenspitze aufgewickelt und in ein frisches Eppendorfreaktionsgefäß überführt, oder durch eine Zentrifugation (5 Minuten, 14000 UpM, 4 °C) pelletiert wurde. Das DNA-Präzipitat wurde zweimal mit 1 ml 75 % (v/v) Ethanol gewaschen, wenn notwendig erneut pelletiert (5 Minuten, 14000 UpM, 4 °C) und danach getrocknet. Nach dem Entfernen von verbliebenem Ethanol wurde die DNA in 200 µl 0,1 mol/l Tris-HCl (pH = 8,5) wieder in Lösung gebracht.

2.10.7 Elektrophorese und Detektion von DNA in Agarosegelen

TAE-Puffer

40 mmol/l Tris-Acetat (pH = 8,0), 1 mmol/l EDTA

6x Nukleinsäuren-Probenpuffer

0,25 % (w/v) Bromphenolblau (Roth, A512.1), 0,25 % (w/v) Xylencyanol FF (Sigma-Aldrich, X4126), 30 % (v/v) Glycerin

Die Auftrennung von Nukleinsäuren erfolgte durch horizontale Agarosegelelektrophorese nach Sambrook und Russell (Sambrook und Russell, 2001) in einer Flachbett-Gelelektrophoresekammer. Je nach Größe der aufzutrennenden DNA-Moleküle wurden 0,5 % bis 1,5 % (w/v) Agarose (Roth, 2267.3) in TAE-Puffer durch Aufkochen gelöst und nach kurzem Abkühlen mit 0,2 µg/ml Ethidiumbromid (Roth, 2218.3) versetzt. Darauf folgend wurde das Gel in die zuvor mit Gelschlitten und Kamm zusammengesetzte Elektrophoresekammer gegossen.

Nach dem Erstarren des Gels wurde die Elektrophoresekammer mit TAE-Puffer befüllt, der Kamm entfernt, die Nukleinsäureproben je mit einem fünftel

Volumen Nukleinsäuren-Probenpuffer versetzt und in die Taschen des Gels gefüllt. Zur Größenbestimmung wurden außerdem Molekulargewichtsstandards mit aufgetragen.

Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 80 V bis 100 V solange, bis der vordere Bromphenolblaumarker etwa 2/3 des Gels zurückgelegt hatte. Die Betrachtung der Nukleinsäurebanden erfolgte mit Hilfe eines UV-Transilluminators. Zur Dokumentation wurden eine Sofortbildkamera (CRT-Instant Camera TA 40, Polaroid) oder ein Video-Gel-Dokumentationssystem (E-Box Videosysteme, PeqLab) benutzt.

2.10.8 Isolation von DNA aus Agarosegelen

Nach der elektrophoretischen Auftrennung der Nukleinsäuren, wurde die gewünschte Bande auf dem UV-Transilluminator mit dem Skalpell aus dem präparativen Agarosegel ausgeschnitten und in ein steriles Eppendorfreaktionsgefäß überführt.

Die Extraktion der DNA aus dem präparierten Gelstück wurde mit dem MiniElute™ Gel Extraction Kit (Qiagen) nach Herstellerangaben durchgeführt. Das Elutionsvolumen betrug 10 µl.

2.10.9 Quantifizierung von Nukleinsäurekonzentrationen

Die Konzentration von RNA- oder DNA-Proben wurde photometrisch bestimmt (Spektralphotometer). Nukleinsäuren absorbieren Licht der Wellenlänge $\lambda = 260$ nm und ihre Konzentration in Lösung kann mithilfe des Lambert-Beer'schen Gesetzes bestimmt werden. Bei einem Zentimeter Lichtweg in der Quarzküvette lässt sich die Konzentration der Nukleinsäuren somit mit folgender Formel berechnen:

$$\text{Nukleinsäurekonzentration } [\mu\text{g/ml}] = \text{OD}_{260} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times \text{Umrechnungsfaktor}$$

Die Umrechnungsfaktoren der verschiedenen Nukleinsäuren finden sich in Tabelle 2.5

Tabelle 2.5: Umrechnungsfaktoren von Nukleinsäuren zur Konzentrationsbestimmung.

Nukleinsäure	Umrechnungsfaktor
dsDNA	50 µg/ml
ssDNA	33 µg/ml
RNA	40 µg/ml

2.10.10 Southern Blot Analyse

2.10.10.1 Southern Blot durch nach oben gerichteten Kapillartransfer

Denaturierungspuffer

1,5 mol/l NaCl, 0,5 mol/l NaOH

Neutralisierungspuffer

1 mol/l Tris-HCl (pH = 7,4), 1,5 mol/l NaCl

20x SSC

3 mol/l NaCl, 0,3 mol/l Na-Citrat, (pH = 7,0)

Die Southern Blot Analyse wurde nach Sambrook und Russell (Sambrook und Russell, 2001) durchgeführt. Hierzu wurden 5 µg bis 10 µg restriktionsenzymatisch behandelte, genomische DNA aus *Platynereis* (2.10.6) oder durch Polymerase-Kettenreaktion (2.12.5) amplifizierte DNA in einem Agarosegel gelelektrophoretisch aufgetrennt und durch einen nach oben gerichteten Kapillartransfer auf eine positiv geladene Nylonmembran (Hybond N+, Amersham, RPN203B) transferiert.

Hierzu wurde das Agarosegel zunächst 10 Minuten in 0,25 mol/l HCl gebadet. Dies diente dazu große DNA-Segmente (> 10 kBp) durch die im Säuren stattfindende Depurinierung zu fragmentieren und somit leichter transferierbar zu machen. Nachdem das Agarosegel kurz mit Reinstwasser gespült wurde, folgten zwei fünfzehnminütige Inkubationen in Denaturierungspuffer und zwei fünfzehnminütige Inkubationen in Neutralisierungspuffer.

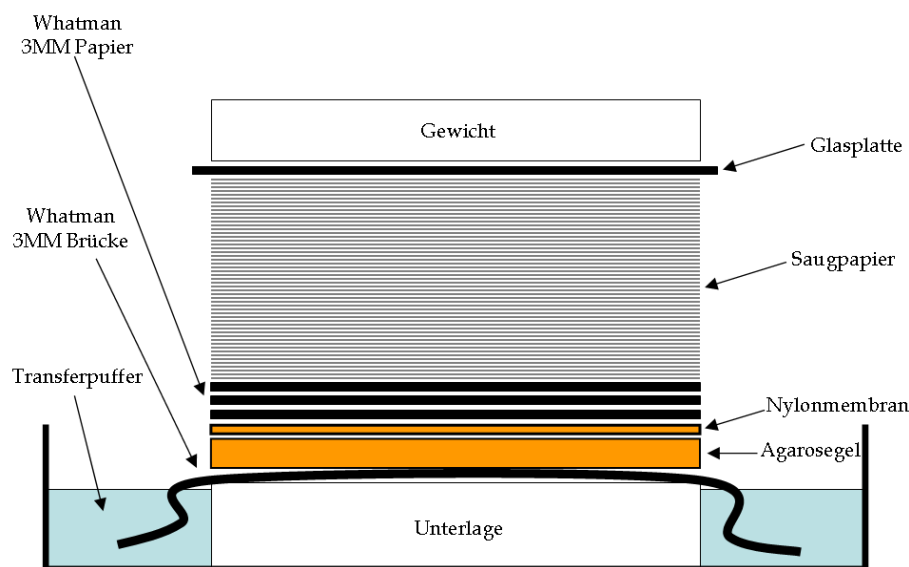


Abbildung 2.1: Schematische Darstellung des Aufbaus eines Southern Blots.

In der Zwischenzeit wurde der Blotaufbau wie folgt vorbereitet: in eine Schale mit Transferpuffer (10x SSC) wurde auf eine feste Unterlage eine mit Transferpuffer vollgesaugte Brücke aus Whatmann 3 MM Papier gelegt und darauf das Gel mit den Geltaschenöffnungen nach unten luftblasenfrei aufgelegt. Auf das Gel wurde die mit Transferpuffer benetzte, auf Gelgröße zugeschnittene Nylonmembran ebenfalls luftblasenfrei aufgebracht und mit 3 Lagen in Transferpuffer getränktem 3 MM Whatmanpapier überschichtet. Als Abschluss wurden 5 cm Saugpapiertücher, die mit einer Glasplatte und einem Gewicht beschwert wurden, aufgelegt (Abbildung 2.1). Der DNA-Transfer aus dem Agarosegel auf die Nylonmembran erfolgte über Nacht. Nach dem Transfer wurden zur Orientierung die Geltaschen auf der Membran markiert und die Membran vorsichtig von dem Agarosegel getrennt. Durch eine zweistündige Inkubation bei 80 °C oder eine halbstündige Inkubation bei 120 °C wurde die DNA mit der Membran kovalent vernetzt.

2.10.10.2 Hybridisierung einer nicht radioaktiv markierten Sonde an der Membran

Standard-Hybridisierungspuffer + 50 % Formamid

5x SSC, 50 % (v/v) Formamid (Roth, deionisiert, P040.11), 0,1 % (w/v) Natrium-Laurylsarcosin, 0,02 % (w/v) SDS, 2 % (w/v) Blocking Reagent™ (Roche: 1096176)

2x Stringenzwaschpuffer für Southern Blotting

2x SSC, 0,1 % (w/v) SDS

0,1x Stringenzwaschpuffer für Southern Blotting

0.1x SSC, 0,1 % (w/v) SDS

Die getrocknete Membran mit den fixierten Nukleinsäuren wurde zunächst in einem Hybridisierungsbeutel (Gefrier-Kochbeutel, Melitta Toppits) mit Standard-Hybridisierungspuffer +50 % Formamid 2 Stunden bei 68 °C (wenn es sich um RNA-Sonden handelte) oder 56 °C (wenn es sich um DNA-Sonden handelte) im rotierenden Wasserbad prähybridisiert. Gegen Ende der Prähybridisierungszeit wurde die DIG-markierte Sonde in 50 µl Reinstwasser für 10 Minuten bei 100 °C denaturiert und danach 5 Minuten auf Eis inkubiert (2.12.7.3, 2.12.7). Die Prähybridisierungslösung wurde abgenommen, die Sonde mit Standard-Hybridisierungspuffer + 50 % Formamid auf 50 ng/ml bis 100 ng/ml verdünnt und der Membran zugegeben. Der Hybridisierungsbeutel wurde hermetisch versiegelt. Die Hybridisierung fand bei 68 °C oder 56 °C über Nacht im rotierenden Wasserbad statt.

Nach dem Dekantieren der Hybridisierungslösung wurde die Membran zunächst 10 Minuten bei Raumtemperatur in 2x Stringenzwaschpuffer und darauf folgend zweimal 15 Minuten bei 68 °C in 0,1x Stringenzwaschpuffer gewaschen.

2.10.10.3 Detektion der nicht radioaktiv markierten Sonde**Blocking Reagent™-Stammlösung**

10 % Blocking Reagent™ (Roche, 1096176) (w/v) in Maleinsäure-Puffer

Maleinsäure-Puffer

0,1 mol/l Maleinsäure, 0,15 mol/l NaCl (pH = 7,5)

Wasch-Puffer

0,3 % (v/v) Tween™20 (Sigma, P1379) in Maleinsäure-Puffer

Blocking-Puffer

1 % (w/v) Blocking Reagent™ (Roche, 1096176) in Maleinsäure-Puffer

Detektionspuffer SB9.5

100 mmol/l Tris-HCl (pH = 9,5), 100 mmol/l NaCl

BCIP-Lösung

50 mg/ml 5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat (Roth, A155.1) in 100 % Dimethylformamid (Roth, CP79.1), Lagerung bei -20 °C im Dunkeln

NBT-Lösung

75 mg/ml 4-Nitroblautetrazoliumsals (Roth, 4421.3) in 70 % (v/v) Dimethylformamid (Roth, CP79.1), Lagerung bei -20 °C im Dunkeln

Die mit den DNA-Banden an der Membran hybridisierte DIG-markierte Sonde wurde durch einen kolorimetrischen Nachweis sichtbar gemacht. Das Immuno-Enzym-Assay wurde unter Verwendung eines Anti-Digoxigenin-alkalische-Phosphatase Konjugats (anti-DIG-AP) (Roche, 11093274910) durchgeführt.

Nach der Bindung des anti-DIG-AP an die hybridisierte DIG-markierte Sonde wurde diese durch die von der alkalischen Phosphatase katalysierte Umsetzung von 5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat (BCIP oder X-Phosphat) und Nitroblau-Tetrazoliumsals (NBT) in ein violette Farbpräzipitat sichtbar gemacht. Hierzu wurde nach der Hybridisierung und den Stringenzwaschungen die Membran 5 Minuten in Wasch-Puffer äquilibriert und danach 1 Stunde in Blocking-Puffer unter Schütteln inkubiert. Dieser Schritt diente dazu unspezifische Bindungsstellen für das Antikörper-Konjugat abzusättigen. Durch Inkubation der Membran mit dem zuvor in Waschpuffer 1:5000 verdünnten anti-DIG-AP (150 mU/ml) für eine Stunde wurde die Bindung des Antikörper-Konjugats an die DIG-markierte Sonde/DNA-Hybride herbeigeführt. Nicht gebundenes Konjugat wurde durch zwei Waschschrte (15 Minuten) mit je 100 ml Waschpuffer entfernt. Nach der Äquilibrierung der Membran in Detektionspuffer SB9.5 kam es durch die Zugabe der Färbelösung (4,5 µl BCIP-Lösung/ml und 3,5 µl NBT-Lösung/ml Detektionspuffer SB9.5) zur Farbreaktion. Die Farbreaktion wurde, um photooxidative Effekte auszuschließen, im Dunkeln durchgeführt. Als die Banden deutlich sichtbar geworden waren, wurde die Reaktion durch Waschen mit Wasser beendet und das Bandenmuster mit dem E-Box Geldokumentationssystem mit UV/Weisslicht Conversion Screen (Peqlab, 60-FC-26WL) dokumentiert.

2.11 Präparation und Analyse von RNA

2.11.1 Herstellung von RNase-freien Lösungen, Materialien und Geräten

Um qualitativ gute Präparationen eukaryotischer mRNA zu erhalten, ist es zunächst notwendig die Aktivität von, bei der Zellyse freigesetzten, Ribonucleasen (RNasen) zu minimieren. Dies wird durch zugesetzte RNase-Inhibitoren oder Methoden, die schon bei der Lyse der Zellen gleichzeitig RNasen inaktivieren, erreicht. Ebenso sollte eine exogene RNase-Kontamination, der für die Arbeiten mit RNA verwendeten Lösungen, Materialien und Geräte verhindert werden. Folgende Sicherheitsmaßnahmen nach Sambrook und Russell (Sambrook und Russell, 2001) wurden getroffen.

Für RNA-Arbeiten wurden Chemikalien verwendet, welche ausschließlich für diesen Zweck reserviert waren und nur steril aus ihren Packungen entnommen und abgewogen wurden.

Für die Arbeit mit RNA benutzte Lösungen wurden, soweit sie keine Komponenten mit Aminogruppen enthielten, über Nacht mit 0,1 % (v/v) DMPC (Dimethylpyrocarbonat Sigma, D5520) oder DEPC (Diethylpyrocarbonat Sigma, D5758) behandelt und nachfolgend autoklaviert. War eine derartige Behandlung nicht möglich, wurden die Lösungen mit DMPC/DEPC behandeltem Reinstwasser steril angesetzt.

Alle Glaswaren wurden mit Aluminiumfolie verpackt und acht Stunden oder über Nacht bei 250 °C sterilisiert. Spezielle Schraubdeckel aus Polybuthylenterephthalat (PBT) zum Verschließen der Duranflaschen (Schott, Mainz) wurden ebenfalls bei 250 °C sterilisiert. Plastikwaren, wie Eppendorfreaktionsgefäße, Plastikpipettenspitzen oder Plastikzentrifugenröhrchen wurden aus speziell für RNA-Arbeiten reservierten Packungen entnommen.

Für die Elektrophorese von RNA wurde eine, nur für diese Arbeiten verwandte, Flachbett-Gelelektrophoresekammer durch Behandlung mit Detergenz gereinigt, kurz mit Wasser gespült, mit Ethanol getrocknet und dann mit

3 % (v/v) H₂O₂-Lösung oder mit RNaseAway™-Spraylösung (Fluka, 83931) behandelt. Nach zehnminütiger Einwirkungsdauer wurde die Kammer gründlich mit RNase-freiem Wasser gespült.

Alle RNA-Arbeiten wurden mit jeweils frischen Einweghandschuhen, die regelmäßig gewechselt wurden, durchgeführt.

2.11.2 Extraktion von Gesamt-RNA aus *Platynereis* und *Drosophila* Entwicklungsstadien

Um Gesamt-RNA zu isolieren bedient man sich Methoden, die schon bei der Lyse der Zellen gleichzeitig RNasen inaktivieren. In Lösungen potenter denaturierender Agenzien wie Guanidin-HCl, Guanidinthiocyanat oder Cetrimoniumbromid desintegrieren die zellulären Strukturen vollständig. Dabei gehen Proteinsekundärstrukturen verloren, und Nukleoproteine dissoziieren von Nukleinsäuren (Cox, 1968). Dennoch können RNasen, z.B. nach Erhitzung, ihre Aktivität wiedererlangen. Dies wird durch Verwendung von 4 mol/l Guanidinthiocyanat (Sela et al., 1957) oder 2 % (w/v) Cetidumbromid (Hale et al., 1996) und reduzierenden Reagenzien wie β -Mercaptoethanol verhindert. Auf diesem Prinzip basieren die nachfolgenden Protokolle.

2.11.2.1 Extraktion mit GTC-Puffer

CSB-Puffer

42 mmol/l Natriumcitrat, 0,83 % (w/v) N-Lauryl-Sarcosin, 0,2 mmol/l 2-Mercaptoethanol

GTC-Extraktionspuffer

25 g Guanidinthiocyanat (Sigma, G9277) in 33 ml CSB-Puffer

Gesamt-RNA wurde nach Chomczynski und Sacchi (Chomczynski und Sacchi, 1987) isoliert. Die präparierten *Platynereis*-Keime (2.7.1) oder *Drosophila* Entwicklungsstadien (2.8.1) wurden in 20 Volumina GTC-Extraktionspuffer und 2 Volumina 2 mol/l Natrium-Acetat (pH = 4,0) resuspendiert und bis zur vollständigen Lyse auf Eis inkubiert. Anschließend wurde das Lysat einer Phenol-

Chloroform-Isoamylalkohol-Extraktion (2.10.5.2) unterzogen und die obere wässrige Phase mit der gelösten RNA in ein sauberes Eppendorfreaktionsgefäß überführt. Die Fällung der RNA erfolgte nach Zugabe von 2-2,5 Volumen Isopropanol und bei 4 °C. Die gefällte RNA wurde durch Zentrifugation (30 Minuten, 13000 g, 4 °C) pelletiert. Das Pellet wurde zweimal mit 1 ml 70 % (v/v) Ethanol (-20 °C) durch Vortexen und anschließende Zentrifugation (10 Minuten, 13000 g, 4 °C) gewaschen und an der Luft getrocknet. Die RNA wurde in deionisiertem Formamid (Roth, P040.11), RNase-freiem Wasser oder DEPC-behandeltem 0,5 % (w/v) SDS wieder in Lösung gebracht. Zur Kontrolle des Präparationserfolgs wurde ein Aliquot auf einem 1,0 % (w/v) Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Die RNA-Konzentration wurde photometrisch bestimmt (2.10.9). Die RNA-Präparationen wurden bei -80 °C gelagert.

2.11.2.2 Extraktion mit CTAB-Puffer

CTAB-Puffer

2 % (w/v) Cetidumbromid (CTAB, Sigma, H6269), 2 % (w/v) Polyvinylpyrrolidon K 25 (PVP, Roth, 4606.2), 100 mmol/l Tris-HCl (pH = 7,4), 2 mol/l NaCl, 25 mmol/l EDTA, 4 % (v/v) β -Mercaptoethanol (erst bei der Präparation zugeben)

Unbefruchtete *Platynereis* Eizellen enthalten große Mengen an sauren Mukopolysacchariden in ihren Cortikalgranula. Diese quellen bei der Lyse auf und machen die Präparation der RNA schwierig. Abhilfe schafft hier eine Extraktionsmethode, die mit Cetidumbromid (CTAB) und Polyvinylpyrrolidon K 25 (PVP) arbeitet. CTAB wirkt als starkes Detergenz und PVP präzipitiert Mukopolysaccharide, Proteine und Zelltrümmer selektiv. Die darauf folgende Chloroform-Isoamylalkohol-Aufreinigung entfernt verbliebenes Protein und Polysaccharid. Schließlich werden durch eine LiCl-Fällung DNA und RNA getrennt und die aufgereinigte RNA mit Ethanol gefällt (Tao et al., 2005). Das ursprüngliche Protokoll wurde zur Verwendung mit *Platynereis* Eizellen folgendermaßen modifiziert.

Hierzu wurden pro Eizellpräparation ein Milliliter auf 65 °C vorgeheizter CTAB-Puffer auf die zuvor unter Stickstoff homogenisierten Eizellen gegeben und durch Pipettieren gemischt. Nachdem ein homogenes Lysat entstanden war wurde der Ansatz für 10 Minuten bei 65 °C inkubiert. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wurde das Lysat einer Chloroform-Isoamylalkohol-Extraktion (2.10.5.2) unterzogen, die obere wässrige Phase in ein neues Eppendorfreaktionsgefäß überführt, erneut mit Chloroform-Isoamylalkohol extrahiert und die wässrige Phase mit ¼ Volumen 10 mol/l LiCl versetzt. Der Ansatz wurde für 30 Minuten bei -20 °C inkubiert und die RNA 20 Minuten bei 14000 UpM und 4 °C pelletiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 500 µl DEPC-behandeltem Wasser aufgenommen und erneut Chloroform-Isoamylalkohol extrahiert. Durch Zugabe 1/10 Volumen 3 mol/l Natriumacetat (pH = 5,2) und 2 Volumen 96 % Ethanol wurde die RNA erneut gefällt und bei 14000 UpM, 4 °C 20 Minuten pelletiert. Das Pellet wurde bis zur weiteren Verwendung unter Ethanol bei -80 °C aufbewahrt. Zur Verwendung wurde das Ethanol abgenommen, das Pellet zweimal mit 70 % (v/v) Ethanol gewaschen und in 50 µl DEPC-behandeltem Wasser aufgenommen. Zur Kontrolle des Präparationserfolgs wurde ein Aliquot auf einem 1,0 % (w/v) Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Die RNA-Konzentration wurde photometrisch bestimmt (2.10.9). Die RNA-Präparationen wurden bei -80 °C gelagert.

2.11.2.3 Extraktion mit RNeasy™protect Mini Kit

Eine einfache Möglichkeit qualitativ hochwertige RNA zu präparieren stellt das RNeasy™ Kit (Qiagen) dar. Es wurde in dieser Arbeit sowohl für die RNA-Extraktion aus *Platynereis* als auch *Drosophila* benutzt. Seine Funktionsweise beruht ebenfalls auf der GTC-Methode (2.11.2.1), die RNA wird allerdings nicht gefällt sondern affinitätschromatographisch aufgereinigt und mit Niedersalzpuffer eluiert.

Das Protokoll des Herstellers für tierische Gewebe wurde wie folgt modifiziert. Die gefrorenen oder frischen Entwicklungsstadien (2.7.1, 2.8.1) wurden mit einem Pistill im Eppendorfreaktionsgefäß homogenisiert, in 300 µl Lysepuffer aufgenommen und die genomische DNA durch zehnmaliges Aufziehen und

Zurückspritzen mit einer RNase-freien Spritze (Außendurchmesser der Kanüle 0,5 cm) geschert. Danach wurde nach den Angaben des Herstellers vorgegangen. Das Elutionsvolumen betrug 30 µl. Zur Kontrolle des Präparationserfolgs wurde ein Aliquot auf einem 1,0 % (w/v) Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Die RNA-Konzentration wurde photometrisch bestimmt (2.10.9). Die RNA-Präparationen wurden bei -80 °C gelagert.

2.11.3 Elektrophorese und Detektion von RNA in denaturierenden Agarosegelen

10x Formaldehyd-Gelelektrophoresepuffer (MOPS)

0,2 mol/l MOPS (3-(N-morpholino)propansulfonsäure) (pH = 7,0), 20 mmol/l Natrium-Acetat, 10 mmol/l EDTA (pH = 8,0)

10x Formaldehyd-Gelelektrophorese-Ladepuffer

50 % (v/v) Glycerin, 10 mmol/l EDTA (pH = 8,0), 0,25 % (w/v) Bromphenolblau (Roth, A512.1), 0,25 % (w/v) Xylencyanol FF (Sigma-Aldrich, X4126)

Die denaturierende Elektrophorese von RNA wurde in der Flachbett-Gelelektrophoresekammer mit formaldehydhaltigen Gelen nach Sambrook und Russell (Sambrook und Russell, 2001) durchgeführt. Da Formaldehyddämpfe toxisch sind, wurden sowohl das Giessen des Gels, als auch die elektrophoretische Auftrennung unter dem Abzug durchgeführt.

Zur Herstellung von 100 ml des Formaldehyd-Gels wurden 0,5 % (w/v) bis 1,5 % (w/v) Agarose in 72 ml RNase-freiem Wasser gelöst und in der Mikrowelle aufgeköcht. Nachdem das Gel auf 55 °C abgekühlt war, wurden 18 ml 12,3 mol/l deionisiertes Formaldehyd (pH > 4), 10 ml 10x Formaldehyd-Gelelektrophoresepuffer zu der Agaroselösung gegeben und das Gel gegossen. Um die RNA-Proben für die Elektrophorese zu denaturieren, wurde ein Ansatz nach den folgenden Angaben in einem sterilen Reaktionsgefäß hergestellt und bei 85 °C für 10 Minuten inkubiert.

- 2,0 µl präparierte Gesamt-RNA (2.11.2)
- 2,0 µl 10x Formaldehyd-Gelelektrophoresepuffer
- 10,0 µl Formamid (deionisiert, Roth, P040.11)
- 4,0 µl Formaldehyd (12,5 mol/l)
- 1,0 µl Ethidiumbromid (200 µg/ml)

Danach wurden die Proben auf Eis abgekühlt und kurz abzentrifugiert. Während die Proben auf Eis inkubierten, wurde das Gel unbeladen 5 Minuten bei 5 V/cm Gellänge elektrophoretisch behandelt. Nach der Zugabe von 2 µl 10x Formaldehyd-Gelelektrophorese-Ladepuffer, konnten die Proben in die Taschen des Gels aufgetragen werden. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 4 V/cm bis 5 V/cm Gellänge in 1x Formaldehyd-Gelelektrophoresepuffer solange, bis der vordere Bromphenolblaumarker etwa 2/3 des Gels zurückgelegt hatte.

Zur Dokumentation wurden eine Sofortbildkamera (Polaroid: CRT-Instant Camera TA 40) oder ein Video-Gel-Dokumentationssystem (E-Box Videosysteme, PeqLab) in Verbindung mit einem UV-Transilluminator benutzt.

2.11.4 Northern Blot Analyse

Die Northern Blot Analyse benutzt man, um Informationen über das Expressionsmuster von Genen zu erhalten. Ist ein Gen oder seine cDNA einmal kloniert, kann man es zur Synthese einer spezifischen, markierten Sonde verwenden (2.12.7) und mit einem Northern Blot hybridisieren, der in seinen verschiedenen Spuren z.B. RNA-Proben aus verschiedenen Entwicklungsstadien enthält. Die so gewonnenen Daten können Auskunft darüber geben, wie stark das betreffende Gen im jeweiligen Entwicklungsstadium exprimiert wird. Außerdem kann das Vorhandensein unterschiedlich großer Transkripte als Hinweis auf den Gebrauch alternativer Promotoren, Spleiß- oder Polyadenylierungsstellen dienen. Sie wurde nach der Methode von Sambrook und Russell durchgeführt (Sambrook und Russell, 2001).

2.11.4.1 Northern Blot durch nach oben gerichteten Kapillartransfer

20x SSC

3 mol/l NaCl, 0,3 mol/l Na-Citrat, (pH = 7,0)

Jeweils 1 µg bis 2 µg isolierte Gesamt-RNA aus verschiedenen Entwicklungsstadien wurden mit einem denaturierendem 1,5 % (w/v) Agarosegel (2.11.3) elektrophoretisch aufgetrennt. Als Größenmarker wurde 1 µg ssRNA-ladder (New England Biolabs, NO362S) aufgetragen.

Nach Beendigung des Gellaufs wurde zur Entfernung des Formaldehyds das Gel mit der aufgetrennten RNA 15 Minuten in RNase-freiem Wasser unter mildem Schütteln inkubiert. Darauf folgend wurde das RNase-freie Wasser durch 20x SSC ersetzt und das Gel zweimal für 15 Minuten äquilibriert. Der Kapillartransfer der RNA auf eine Nylonmembran (Hybond N+, Amersham, RPN203B) wurde leicht verändert mit 20x SSC als Transferpuffer über Nacht durchgeführt (auch 2.10.10.1). Hierzu wurde eine Glaspetrischale mit der Unterseite nach oben in eine mit Transferpuffer gefüllte Schale gelegt. Auf diese wurde eine Lage Whatmann 3MM-Papier in der Art gelegt, das die beiden Enden in den Transferpuffer hineinragten. Nachdem das Papier mit 20x SSC gesättigt war, wurde das Formaldehyd-Agarosegel mit der Unterseite nach oben auf das 3MM-Papier gelegt und die etwas größer als das Gel zugeschnittene Nylonmembran blasenfrei aufgelegt. Auf die Membran wurden 3 Lagen feuchtes 3MM-Papier und ein Stapel saugfähiges Papier gelegt. Um den Kontakt zwischen den einzelnen Lagen zu gewährleisten, wurden zuoberst eine Glasplatte und ein Gewicht (ca. 0,5 kg) gestellt. Um direkten Flüssigkeitstransfer zwischen dem Pufferreservoir und den auf das Gel aufgelegten Papierlagen zu verhindern, wurde um das Gel herum Parafilm M (Brand, 701606) gelegt. Nach Beendigung des Transfers wurde die Membran an einer Ecke markiert, kurz in 2x SSC gewaschen und das Ergebnis durch Betrachtung auf dem UV-Transilluminator überprüft. Die Fixierung der RNA an der zuvor getrockneten Membran erfolgte für 30 Minuten bei 120 °C im

Wärmeschrank. Darauf folgend wurden die Markerbanden mit dem Skalpell abgetrennt und mit Methylenblau gefärbt (2.11.4.2).

2.11.4.2 Färbung von Northern-Blots mit Methylenblau

Methylenblau-Färbelösung

0.5 mol/l Na-Acetat (pH = 5,2), 0.04 % (w/v) Methylenblau

Durch die Färbung mit Methylenblau kann die auf der Membran fixierte RNA sichtbar gemacht werden (Herrin und Schmidt, 1988). Hierzu wurde die Membran 15 Minuten in 5 % (v/v) Essigsäure inkubiert und danach in die Methylenblau-Färbelösung überführt. Nach 5 Minuten bis 10 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Blotstreifen solange in RNase-freiem Wasser entfärbt, bis der Hintergrund weiß erschien.

2.11.4.3 Hybridisierung einer nicht radioaktiv markierten Sonde an der Membran

Standard-Hybridisierungspuffer + 50 % Formamid

5x SSC, 50 % (v/v) Formamid (Roth, deionisiert, P040.11), 0,1 % (w/v) Natrium-Laurylsarcosin, 0,02 % (w/v) SDS, 2 % (w/v) Blocking Reagent™ (Roche: 1096176)

2x Stringenzwaschpuffer für Northern Blotting

2x SSC, 0,1 % (w/v) SDS

0,5x Stringenzwaschpuffer für Northern Blotting

0.5x SSC, 0,1 % (w/v) SDS

0,1x Stringenzwaschpuffer für Northern Blotting

0.1x SSC, 0,1 % (w/v) SDS

Die Membran mit der fixierten RNA wurde prähybridisiert, um unspezifische Bindungsstellen für die Digoxigenin (DIG)-markierte Sonde (2.12.7) abzublocken. Hierzu wurde die Nylon-Membran in einen Hybridisierungsbeutel (Gefrier-Kochbeutel, Melitta Toppits) mit 20 ml Prähybridisierungslösung (Standard-Hybridisierungspuffer mit 50 % Formamid) pro 100 cm² Membranoberfläche gegeben. Der Beutel wurde hermetisch versiegelt und die Membran für

mindestens 1 Stunde bei 68 °C im Wasserbad inkubiert. Die DIG-markierte RNA-Sonde wurde im kochenden Wasserbad 10 Minuten denaturiert und dann in Hybridisierungs-Puffer (Standard-Hybridisierungspuffer mit 50 % Formamid) auf eine Konzentration von 50 ng/ml bis 100 ng/ml verdünnt. Im Anschluss an die Prähybridisierung wurde die Membran in einen neuen Hybridisierungsbeutel transferiert, der die Sonde enthaltende Hybridisierungs-Puffer zugegeben und der Beutel versiegelt. Die Hybridisierung erfolgte im Wasserbad bei 68 °C über Nacht. Nach Ablauf dieser Zeit wurde die Hybridisierungslösung entfernt und bei -80 °C gelagert. Sie konnte für weitere Experimente wiederverwendet werden. In den folgenden sechs Stringenzwaschschritten wird unspezifisch und nicht hybridisierte Sonde von der Membran entfernt: Die Membran wurde zweimal 15 Minuten in 2x Stringenzwaschpuffer und nachfolgend zweimal 15 Minuten in 0,5x Stringenzwaschpuffer bei Raumtemperatur inkubiert. Abschließend folgten zwei fünfzehnminütige Waschschrte mit 0,1x Stringenzwaschpuffer bei 68 °C im Wasserbad.

2.11.4.4 *Detektion der nichtradioaktiv markierten Sonde*

Blocking Reagent™-Stammlösung

10 % (w/v) Blocking Reagent™ (Roche, 1096176) in Maleinsäure-Puffer

Maleinsäure-Puffer

0,1 mol/l Maleinsäure, 0,15 mol/l NaCl (pH = 7,5)

Wasch-Puffer

0,3 % (v/v) Tween™20 (Sigma, P1379) in Maleinsäure-Puffer

Blocking-Puffer

1 % (w/v) Blocking Reagent™ (Roche, 1096176) in Maleinsäure-Puffer

Detektionspuffer SB9.5

100 mmol/l Tris-HCl (pH = 9,5), 100 mmol/l NaCl

Die Detektion der mit den RNA-Banden hybridisierten DIG-markierten Sonde erfolgte über ein chemolumineszentes Immuno-Enzym-Assay. Dieses ist etwa um den Faktor zehn sensitiver als die kolorimetrische Detektion. Das Immuno-Enzym-Assay wurde unter Verwendung eines Anti-Digoxigenin-alkalische-

Phosphatase-Konjugats (anti-DIG-AP) (Roche, 11093274910) durchgeführt. Nach der Bindung des anti-DIG-AP an die hybridisierte DIG-markierte Sonde wurde diese durch die von der alkalischen Phosphatase katalysierte Dephosphorylierung von Dinatrium 3-(4-methoxy Spiro {1,2-dioxetane-3,2'-(5'-chloro)tricyclo [3.3.1.1^{3,7}] decan}-4-yl)phenyl phosphat (CSPD ready-to-use, Roche, 11755633001) und der daraus folgenden Emittierung von Licht der Wellenlänge $\lambda = 477$ nm detektiert. Das luminisierte Licht wurde mit Röntgenfilmen aufgenommen und dokumentiert. Hierzu wurde nach der Hybridisierung und den Stringenzwaschungen die Membran 5 Minuten in Wasch-Puffer äquilibriert und danach 1 Stunde in Blocking-Puffer unter Schütteln inkubiert. Dieser Schritt diente dazu unspezifische Bindungsstellen für das Antikörper-Konjugat abzusättigen. Durch Inkubation der Membran mit dem zuvor in Waschpuffer 1:10000 verdünnten anti-DIG-AP (150 mU/ml) für eine Stunde wurde die Bindung des Antikörper-Konjugats an die DIG-markierte Sonde/RNA-Hybride herbeigeführt. Nicht gebundenes Konjugat wurde durch zwei Waschschriffe (15 Minuten) mit je 100 ml Waschpuffer entfernt. Nach der Äquilibrierung der Membran in Detektionspuffer SB9.5 wurde die Membran mit der RNA-Seite nach oben in eine Entwicklungshülle (Novagen, 69137) eingelegt, mit 1 ml CSPD überschichtet, die zweite Seite der Entwicklungshülle blasenfrei aufgelegt und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Überschüssige Flüssigkeit wurde entfernt und die Entwicklungshülle versiegelt. Nach einer zehnmütigen Inkubation bei 37 °C wurde die Entwicklungshülle in eine Röntgenkassette eingebracht, in der Dunkelkammer ein Blatt Röntgenfilm (Kodak Biomax XAR, Sigma, F5388) aufgelegt und für 15 Minuten bis 25 Minuten belichtet. Der Röntgenfilm wurde dann 1 Minute bis 4 Minuten entwickelt (GBX developer/replenisher, Sigma, P7042), 5 Minuten gewässert, 10 Minuten fixiert (GBX fixer/replenisher, Sigma, P7167) und weitere 5 Minuten gewässert. Entsprechend dem Bild wurde die Inkubationszeit für eine weitere Belichtung abgeschätzt. Nachdem die Signalstärke befriedigend war wurde der Film mit dem E-Box Geldokumentationssystem mit UV/Weisslicht Conversion Screen (Peqlab, 60-FC-26WL) dokumentiert.

2.12 Enzymatische Manipulation von Nukleinsäuren

2.12.1 Reverse Transkription

Zur Herstellung von cDNA aus Gesamt-RNA benutzt man das Enzym Reverse Transkriptase. Dieses Enzym ist in Gegenwart von Desoxynukleotiden in der Lage, ausgehend von einem Primer und einzelsträngiger RNA als Matrize, einen zur Matrize komplementären DNA-Strang (cDNA) zu synthetisieren und die Matrize danach abzubauen (RNase H-Aktivität).

Zur cDNA-Synthese wurde in dieser Arbeit das Omniscript RT Kit (Qiagen, 205111) verwendet. Es wurden jeweils 2 µg Gesamt-RNA als Matrize pro Reaktion eingesetzt und die cDNA nach Angaben des Herstellers synthetisiert. Als Primer diente p(dT)₁₅ (Roche, 10814270001), als RNase-Inhibitor RNasin (Promega, N2111).

2.12.2 Sequenzspezifisches Schneiden von DNA-Molekülen mit Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen sind bakterielle Enzyme die DNA-Moleküle an spezifischen Erkennungssequenzen schneiden. Sie werden in drei Typen eingeteilt, von denen in der Molekularbiologie aber nur die Restriktionsendonukleasen vom Typ III eine Bedeutung haben. Die Erkennungssequenzen dieser Restriktionsenzyme sind meist Palindrome und besitzen somit auf beiden DNA-Strängen dieselbe Sequenz. Man unterscheidet zwischen Restriktionsenzymen, die 5'-überhängende Schnittkanten, 3'-überhängende Schnittkanten und „glatte“ Schnittkanten (blunt ends) produzieren.

Eine Unit [U] ist definiert als die Menge Restriktionsenzym, die 1 µg λ-DNA in einer Stunde vollständig schneidet. Die Enzymmenge in Units [U], die benötigt wird um 1 µg beliebiger DNA zu schneiden hängt von der Größe des DNA-Moleküls und der Anzahl der Schnittstellen in der DNA ab. Sie lässt sich nach folgender Formel berechnen:

$$\frac{\text{benötigte Units}}{\mu\text{g DNA}} = \frac{48,3 \text{ kBp} \times \text{Anzahl der Schnittstellen in der Ziel-DNA}}{\text{Anzahl der Schnittstellen in der } \lambda \text{-DNA} \times \text{Größe der Ziel-DNA}}$$

Pro Restriktionsansatz wurden 1,0 μg DNA bis 10,0 μg DNA mit der entsprechenden Enzymmenge in dem vom Hersteller mitgelieferten Puffersystem in einem Reaktionsvolumen von 50 μl bis 100 μl bei optimaler Reaktionstemperatur (in der Regel 37 °C) für ein bis drei Stunden inkubiert.

2.12.3 Dephosphorylierung von freien 5'-Enden

Alkalische Phosphatase (Calf intestinal phosphatase, CIP) katalysiert die Entfernung terminaler 5'-Phosphatgruppen von DNA und RNA. CIP-behandelte DNA-Fragmente besitzen somit keine terminalen 5'-Phosphatgruppen mehr. Da diese aber als Substrat in der Ligationreaktion (2.12.4) benötigt werden, benutzt man die CIP-Behandlung zur Unterdrückung der Selbstligation von geschnittenen Vektoren (Sambrook und Russell, 2001).

Hierzu wird die restringierte Plasmid-DNA-Lösung mit 0,5 U/ μg CIP (New England Biolabs, MO290S) und 1/10 mitgelieferten NEB-Buffer 3 versetzt und bei 37 °C für eine Stunde inkubiert. Die CIP-behandelte Plasmid-DNA wurde dann über Agarosegelelektrophorese (2.10.7) aufgetrennt und aus dem Agarosegel präpariert (2.10.8).

2.12.4 Ligation von DNA

T4 DNA-Ligase katalysiert die Bildung einer Phosphodiesterbindung zwischen zwei sich gegenüberliegenden 5'-Phosphat- und 3'-Hydroxylenden in doppelsträngiger DNA oder RNA (Engler et al., 1983). Sie wurde zur Ligation von DNA-Fragmenten mit kompatiblen Enden benutzt.

2.12.4.1 Ligation von PCR-Fragmenten in T-Überhang Vektoren

Die zur Polymerasekettenreaktion (2.12.5) benutzte Taq-DNA-Polymerase hängt substratunabhängig an die beiden 3'-Enden der Amplifikate ein Desoxyadenosin-5'-Phosphat an. Linearisierte T-Überhang Vektoren besitzen an

ihren 5'-Enden zusätzlich jeweils ein Desoxythymidin-5'-Phosphat, so dass mit DNA-Ligasen die PCR-Amplifikate in die Vektoren ligiert werden können.

Das pGEMT-easy Vector System II (Promega, A1380) arbeitet nach diesem Prinzip. Die aus dem Agarosegel präparierten PCR-Amplifikate (2.10.8) wurden mit 1 µl pGEM-T easy, 1 µl T4 DNA Ligase (3 Weiss units/µl) und 5 µl 2x Rapid Ligation Buffer in einem Gesamtansatz von 10 µl in einem sterilen Reaktionsgefäß über Nacht bei 4 °C ligiert. 2 µl des Ligationsansatz wurde in chemisch kompetente Zellen transformiert (2.10.2) und rekombinante Klone selektiert (2.10.3).

Das TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen, K4600-01) arbeitet nach einem leicht veränderten Prinzip. Hier besitzen die linearisierten T-Überhang-Vektoren kovalent gebundene Topoisomerase I, welche anstatt von T4 DNA-Ligase die Ligation katalysiert. Das Herstellerprotokoll wurde folgendermaßen modifiziert: Zur Klonierung in die topoisomerasegekoppelten T-Überhangvektoren pCR-II TOPO und pCR4 TOPO wurden in einem sterilen Reaktionsgefäß 4,5 µl gelaufgereinigte PCR-Amplifikate (2.10.8), 1 µl Salzlösung (1,2 mol/l NaCl, 0,06 mol/l MgCl₂) und 0,5 µl Vektor 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. 2 µl des Ligationsansatz wurde in chemisch kompetente Zellen transformiert (2.10.2) und rekombinante Klone selektiert (2.10.3).

2.12.4.2 *Ligation von DNA-Fragmenten mit „Sticky Ends“ (kohesiven Enden)*

Zur Klonierung von DNA-Fragmenten in die Vektoren pQE-30 (Qiagen) und pUAST (Brand und Perrimon, 1993) wurden die DNA-Moleküle mit Restriktionsenzymen (2.12.2), die kompatible kohesive Enden (sticky ends) produzieren, geschnitten. Die restriktionsverdauten Vektoren wurden daraufhin einer CIP-Behandlung unterzogen (2.12.3). Die geschnittenen DNA-Fragmente und Vektoren wurden mit 1 µl T4 DNA-Ligase (New England Biolabs, M0202S), 2 µl Ligationspuffer in einem Gesamtvolumen von 20 µl über Nacht bei 4 °C in einem sterilen Reaktionsgefäß inkubiert. Der Ligationsansatz wurde in chemisch kompetente Zellen transformiert und rekombinante Klone selektiert.

2.12.5 Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction, PCR)

Das Prinzip der PCR ist die selektive und hocheffiziente Anreicherung *in vitro* amplifizierter DNA definierter Länge und Sequenz. In einem zyklischen Prozess aus Denaturierung, Annealing und Elongation synthetisiert die thermostabile Taq DNA Polymerase in einem exponentiellen Reaktionsverlauf DNA Fragmente, die von spezifischen Oligonukleotidprimern flankiert sind (Saiki et al., 1988).

2.12.5.1 Standard-PCR

Die Reaktionen wurden in einem Thermocycler durchgeführt (Eppendorf, Peqlab). Die genaue Zusammensetzung des Reaktionsansatzes wurde für jedes Primerpaar neu optimiert. Insbesondere die $MgCl_2$ -Konzentration und die Dauer und Temperatur der einzelnen Reaktionsschritte, sowie die Anzahl der Wiederholungszyklen wurden an jeden Einzelfall angepasst. Die Reaktionsansätze setzten sich prinzipiell aus folgenden Komponenten zusammen:

DNA-Matrize (5 ng bis 50 ng)	(Plasmid, cDNA, genomische DNA)
5'-Primer (1 μ mol/l bis 1,5 μ mol/l)	(siehe 2.9)
3'-Primer (1 μ mol/l bis 1,5 μ mol/l)	(siehe 2.9)
Desoxynukleotide (200 μ mol/l)	(dNTP-Mix, NEB, N0447S)
Mg^{2+} (0,5 mmol/l bis 10 mmol/l)	(NEB, B9015S)
10x Reaktionspuffer (1/10 Volumen)	(NEB, B9015S)
DNA-Polymerase (0,05 U/ μ l)	(Taq DNA-Polymerase, NEB, M0273S)

Die Reaktionsschritte wurden nach dem Schema in Tabelle 2.6 programmiert. Indem die DNA-Polymerase erst nach einem initialen Denaturierungsschritt zu dem Reaktionsansatz (Hotstart-PCR) hinzugefügt wurde, konnte die spezifische Amplifikation von DNA-Fragmenten teilweise erheblich verbessert werden. Derselbe Effekt konnte auch durch den Gebrauch von Hotstart-Taq DNA-Polymerasen (JumpStart™ REDTaq™ DNA Polymerase, Sigma, D8187; FastStart Taq DNA-Polymerase, Roche, 04738357001) erreicht werden. Diese Taq DNA-Polymerasen sind an einen Antikörper, der ihre Aktivität inhibiert, gebunden.

Durch die initiale Denaturierung wurde der Antikörper entfernt und die Polymerase aktiv. Bei der „touch down“-Programmierung wurde die zunächst hohe (stringente) Temperatur des Primer-Hybridisierungsschrittes während der Wiederholungszyklen nach und nach erniedrigt.

Tabelle 2.6: Programmschema der PCR

	Temperatur	Zeit	Anzahl der Zyklen
Hot Start PCR: Initialer Denaturierungsschritt (optional)	95 °C	5 min	1
Denaturierung	95 °C	30 sec	
Annealing	50-72 °C ^a	30sec ^b	30-35
Elongation	72 °C	1 min ^c	
Abschließende Elongation	72 °C	10 min	1

2.12.5.2 Reverse Transkription (RT)-PCR

Durch RT-PCR kann man eine durch Reverse Transkription (2.12.1) entstandene cDNA Population auf das Vorhanden eines bestimmten Transkriptes hin überprüfen. Die cDNA dient hierbei als Matrize für eine PCR mit genspezifischen Primern. Die RT-PCR kommt mit wenig RNA-Ausgangsmaterial aus und stellt somit eine Alternative zur Northern Blot Analyse dar (2.11.4).

Da kontaminierende genomische DNA in der RNA-Präparation das Ergebnis einer RT-PCR verfälschen kann, wurden die Präparationen vor der Reversen Transkription mit RNase-freier DNase (Desoxyribonuclease I, Amplification Grade; Invitrogen, 18068-015) behandelt. Der Reaktionsansatz setzte sich aus den

^a Annealingtemperaturen können berechnet werden, müssen aber für jedes Primerpaar empirisch ermittelt werden

^b Die Annealingdauer sollte 1 Minute nicht überschreiten

nachfolgenden Komponenten zusammen und wurde 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

1 µg	RNA
1 µl	10x DNase Reaktionspuffer
1 µl	DNase I, Amp. Grade, 1 U/µl
Ad 10 µl	RNase-freies Wasser

Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1 µl 25 mmol/l EDTA (pH = 8,0) und zehnminütiges Erhitzen auf 65 °C abgestoppt. Der Reaktionsansatz wurde im Ganzen in die Reverse Transkription (2.12.1) eingesetzt.

5 % bis 10 % der Reversen Transkription wurden als Matrize in eine PCR-Reaktion mit genspezifischen Primern (Tabelle 2.8) eingesetzt. Als Kontrolle für cDNA-spezifische Amplifikation und zum Ausschluss von genomischer DNA Kontamination, wurde parallel nicht revers transkribierte RNA-Präparation als Matrize in einer PCR-Reaktion eingesetzt. Der Thermocycler wurde folgendermaßen programmiert.

Tabelle 2.7: Programmschema der RT-PCR mit genspezifischen Primern

Temperatur	Zeit	Anzahl der Zyklen
95 °C	5 min	1
95 °C	45 sec	
Siehe Tabelle 2.8	45 sec	35
72 °C	1 min ^a	
72 °C	10 min	1

^a Die Elongationsdauer hängt von der Größe des zu amplifizierenden DNA-Stücks ab.

Tabelle 2.8: benutzte RT-PCR Primer

Gen	Primerpaar	Annealingtemperatur	Fragmentgröße
Pdu-twist	Pdutwist RT1 F Pdutwist RT1 R	58 °C	547 Bp
Pdu-snail	Pdusnail RT N2F Pdusnail RT NR	58 °C	732 Bp
Pdu-actin	Pduactin RT F Pduactin RT R	57 °C	560 Bp

2.12.5.3 Rapid Amplifikation of cDNA Ends (RACE)-PCR

Bei der RACE-PCR handelt es sich um eine Abwandlung der RT-PCR. Sie stellt eine Methode dar, um ausgehend von einem cDNA-Fragment bekannter Sequenz, die Sequenzinformation in Richtung 5' und 3' zu erweitern.

Hierzu werden Primersequenzen aus der Sequenz des Genfragmentes abgeleitet. Mit Primern die im cDNA-Fragment (5'- und 3'-RACE-Primer) liegen und mit sogenannten Ankerprimern, die am 5'- oder 3'-Ende der cDNA lokalisiert sind, wird dann eine PCR mit cDNA als Template durchgeführt.

Bei der 3'-RACE benutzt man als Ankerprimer einen Oligo(dA)-Primer, der an den Oligo(dT)-Schwanz der cDNA bindet, und einen genspezifischen Primer für die PCR.

Bei der sogenannten Capfinder-Strategie der 5'-RACE (auch RLM-RACE) wird schon vor der Reversen Transkription ein Oligonukleotid bekannter Sequenz an die mRNA ligiert. Um nur undegradierete, vollständige mRNA zu ligieren wurden zunächst sämtliche freien 5'-OH-Enden durch Alkalische Phosphatase CIP (2.12.3) degradiert. Nur bei den durch capping geschützten und somit vollständigen mRNAs wurde das 5'-Hydroxylende nicht entfernt. Nach der Entfernung der Kappen (caps) mit Hilfe einer Nikotinsäure-Pyrophosphatase (tobacco acid pyrophosphatase, TAP) wurde mit T4 DNA-Ligase (2.12.4) der Oligonukleotidadapter angelagert. Es folgte eine Reverse Transkription und eine PCR mit dem 5'-RACE-Primer und dem Adapter-Primer am 5'-Ende.

In dieser Arbeit wurde das GeneRacer™ Kit (Invitrogen, L1502-01), welches auf dem Prinzip der RLM-RACE beruht, benutzt und nach dem Protokoll des Herstellers vorgegangen. Die amplifizierten Fragmente wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt (2.10.7), auf Nylonmembran geblottet (2.10.10) und mit der entsprechenden Sonde hybridisiert. Positive Banden wurden aus dem Agarosegel präpariert (2.10.8) und in pCR-II TOPO oder pGEM-T easy (2.12.4.1) kloniert.

Bei der SMART-RACE (Switching Mechanism at 5' end of RNA Transcript) wurde die gesamte mRNA von einem oligo(dT)-Primer aus in cDNA umgeschrieben. An das 3'-Ende der cDNA wurde ein oligo(dC) (3-5 Cytosinoligonukleotide) angefügt. Die 5'-RACE-PCR wurde dann mit Hilfe eines Ankerprimers mit einem passenden oligo(dG) und einem genspezifischen Primer durchgeführt.

In dieser Arbeit wurde das SMART™RACE cDNA Amplification Kit (Clontech, 634914) benutzt und nach dem Protokoll des Herstellers vorgegangen. Die amplifizierten Fragmente wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt (2.10.7), auf Nylonmembran geblottet (2.10.10) und mit der entsprechenden Sonde hybridisiert. Positive Banden wurden aus dem Agarosegel präpariert (2.10.8) und in pCR-II TOPO oder pGEM-T easy (2.12.4.1) kloniert.

2.12.5.4 Fusions-PCR

Bei der Fusions-PCR, oder auch End-to-End PCR, werden durch eine Polymerase-Kettenreaktion zwei unterschiedliche, aber in ihrer Sequenz überlappende DNA-Fragmente zu einem von den beiden Primern begrenzten DNA-Fragment fusioniert.

Diese Technik wurde in dieser Arbeit benutzt, um Fragmente aus der 5'- und 3'-RACE (2.12.5.3) zu der kompletten cDNA oder Teilen davon zusammenzufügen. Hierzu wurden zwei Primer (5'-Primer, 3'-Primer) abgeleitet, die jeweils auf einem der beiden Fragmente liegen und eine Polymerase-Kettenreaktion (2.12.5.1) mit den nachfolgenden Reaktionsbedingungen durchgeführt.

50 ng	5'-Fragment-Matrize
50 ng	3'-Fragment-Matrize
1 $\mu\text{mol/l}$	5'-Primer
1 $\mu\text{mol/l}$	3'-Primer

Die amplifizierten Fusionsfragmente wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt (2.10.7), aus dem Agarosegel präpariert (2.10.8) und in pGEM-T easy (2.12.4.1) kloniert.

Tabelle 2.9: Programmschema der Fusions-PCR

Temperatur	Zeit	Anzahl der Zyklen
95 °C	5 min	1
95 °C	1 min	
Siehe Tabelle 2.10	1 min	35
72 °C	3 min	
72 °C	10 min	1

Tabelle 2.10: Für die Fusions-PCR verwendete Primerkombinationen

Amplifikat	Primerpaar	Annealingtemperatur	Fragmentgröße
Pdu-twist-ORF	TwifuF TwifuR	58 °C	663 Bp
Pdu-twist-cDNA	TwifuF_cDNA TwifuR_cDNA	58 °C	1859 Bp
Pdu-twist-ATG	TwifuF_ATG TwifuR	58 °C	666 Bp

2.12.6 Sequenzierung von DNA-Molekülen

Sequenzierarbeiten wurden bei der Firma Seqlab GmbH, Göttingen in Auftrag gegeben. Als Primer dienten jeweiligen plasmidspezifischen Primer (2.9)

2.12.7 Nichtradioaktive Markierung von DNA- und RNA-Molekülen

DNA- und RNA-Moleküle können durch modifizierte Nucleotide während der Synthese markiert werden. Dies können Nucleotide sein, die radioaktive Isotope (z.B. ^{32}P) enthalten und über Autoradiographie nachgewiesen werden. Es können aber auch nichtradioaktive Moleküle an die Nucleotide angefügt werden. Deren Nachweis erfolgt über Immuno-Enzym-Assays.

In dieser Arbeit wurden Digoxigenin-, Biotin- und Fluorescein-markierte Nucleotide (Digoxigenin-11-UTP, Digoxigenin-11-dUTP, Biotin-16-UTP, Fluorescein-12-UTP, Roche) zur Markierung von DNA- und RNA-Sonden benutzt.

2.12.7.1 *Random Labeling mit Hexanucleotiden*

Das zufällige Markieren „Random Labeling“ von DNA-Molekülen (Feinberg und Vogelstein, 1984) erlaubt das Einfügen eines markierten Nucleotids (DIG-, Biotin- oder Fluorescein-dUTP) etwa alle 20 Basenpaare bis 25 Basenpaare. Es beruht auf der zufälligen, statistisch verteilten Hybridisierung von Nucleotid-Hexameren, die alle möglichen Sequenzkombinationen repräsentieren, an die zu markierende DNA. Der Gegenstrang wird mithilfe des Klenow-Fragments der DNA-Polymerase I, von den 3'-Hydroxylenden der Hexamere ausgehend, aufgefüllt.

Hierzu wurden in einem Reaktionsgefäß 1 µg DNA-Matrize (lineares oder supercoiled Plasmid) auf 15,0 µl mit Reinstwasser aufgefüllt und die DNA 10 Minuten in einem kochenden Wasserbad denaturiert. Die Proben wurden danach auf Eis abgekühlt und folgende Komponenten aus dem DIG DNA Labeling Kit (Roche, 11175033910) zugegeben.

2 µl	10x Reaktionspuffer
1 µl	Klenow-Fragment (2 U/µl)
2 µl	dNTP-labeling-Mix

Der Reaktionsansatz wurde über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Die Reaktion wurde mit 2 µl 0,2 mol/l EDTA (pH = 8,0) und durch Erhitzen auf 65 °C (10 Minuten) abgestoppt. Die Markierungseffizienz wurde über einen Dot-Test (2.12.8) getestet.

2.12.7.2 Polymerase-Kettenreaktion mit Digoxigenin-11-dUTP

Eine alternative Möglichkeit DNA-Moleküle zu markieren stellt die Polymerase-Kettenreaktion mit modifizierten Nukleotiden dar. Hierzu wurden die unten angegebenen Komponenten in eine Polymerasen-Kettenreaktion (2.12.5) eingesetzt.

50 ng	Matrize
2,5 mmol/l	dATP, dCTP, dGTP (jeweils)
2,0 mmol/l	dTTP
0,5 mmol/l	Digoxigenin-11-dUTP (Roche, 11573152910)

Bei einer erfolgreichen Markierung konnte bei gelelektrophoretischer Auftrennung der Fragmente eine verringerte Mobilität des markierten Fragments beobachtet werden. Die markierten Nukleinsäuren wurden aus dem Agarosegel präpariert (2.10.8). Die Markierungseffizienz wurde über einen Dot-Test (2.12.8) getestet.

2.12.7.3 Nichtradioaktive Markierung von RNA durch *in vitro* Transkription

Die einfachste Art, RNA-Sonden (Ribosonden) zu markieren, besteht darin, eine in einem geeigneten Plasmidvektor klonierte DNA *in vitro* zu transkribieren. Dabei benutzt man einen Vektor (2.5), in dem sich neben einer multiplen Klonierungsstelle (MCS) Phagenpromotoren befinden, die von den entsprechenden Phagen-RNA-Polymerasen erkannt werden können.

Zur Herstellung der markierten RNA-Sonde wurden 2 µg des aufgereinigten Plasmids linearisiert (2.10.3.2), wobei zur Synthese der sense-Probe am 3'-Ende, für die antisense-Probe am 5'-Ende des cDNA-Inserts geschnitten wurde. Der

Restriktionsansatz wurde Phenol/Chloroform extrahiert (2.10.5.2) und mit Ethanol gefällt (2.10.5.1).

Das Pellet wurde in 13 μ l RNase-freiem Wasser gelöst, der Reaktionsansatz durch Zugabe der unten angegebenen Komponenten zusammengestellt und im Wasserbad bei 37 °C für 2 Stunden inkubiert.

- 2 μ l 10x DIG-, Biotin- oder Fluorescein RNA-labeling Mix (Roche, siehe 2.3)
- 2 μ l 10x Transkriptions-Puffer
- 1 μ l RNasin (Promega, N2111)
- 2 μ l SP6 (Roche, 10810274001) oder T7 RNA-Polymerase (Roche, 10881767001)

Das Abstoppen der Reaktion geschah durch Zugabe von 2 μ l 0,2 mmol/l EDTA (pH = 8,0). Die Aufreinigung der Sonde erfolgte mit dem RNeasy Mini Kit (Qiagen, 74124) nach dem „Probe Cleanup Protocol“ des Herstellers.

2.12.8 Dot-Test zur Überprüfung der Markierungseffizienz der Sondensynthese

Die Effizienz des Einbaus von markierten Nukleotiden in die Nukleinsäuresonde während der Markierungsreaktion wurde über Dot-Blots verschiedener Konzentrationen von markierter Sonde überprüft. Hierzu wurden 1 μ l Aliquots einer Verdünnungsreihe (1:10, 1:50, 1:100, 1:500, 1:1000, 1:5000) der aufgereinigten Sonde auf ein Stück Nylonmembran (Hybond N+, Amersham, RPN203B) aufgetropft, getrocknet und durch 30 Minuten Backen bei 120 °C auf der Membran fixiert. Der Nachweis der markierten Nukleinsäuren erfolgte kolorimetrisch über ein Immuno-Enzym-Assay (2.10.10.3) mit den entsprechenden alkalische Phosphatase-Konjugaten (2.4).

Eine verwendbare Sonde zeigte in der höchsten Verdünnung (1:5000) innerhalb von 5 Minuten ein gut sichtbares Signal.

2.12.9 Herstellung von doppelsträngiger RNA (*dsRNA*)

Zur Herstellung von doppelsträngiger RNA (*dsRNA*), wurde auf eine Strategie zurückgegriffen, die es erlaubt beide RNA-Stränge gleichzeitig zu transkribieren und während der Transkription zu annealen.

Die in dieser Arbeit verwendeten Klonierungsvektoren besitzen sowohl einen SP6 als auch einen T7-Promotor. Diese liegen flankierend zu der inklonierten rekombinanten DNA. Der Primer T7-SP6 (siehe 2.9) besitzt in seiner Sequenz sowohl den T7-Promotor als auch den SP6-Promotor. Führt man eine Polymerase-Kettenreaktion mit der Primerkombination T7/T7-SP6 und diesen Vektoren als Template durch, erhält man ein DNA-Fragment, das an seinen beiden Enden den T7-Promotor besitzt. Hierzu wurden in eine Polymerase-Kettenreaktion (2.12.5) folgende Komponenten eingesetzt und der Thermocycler programmiert (siehe Tabelle 2.11).

50 ng	Plasmidvektor
1 µmol/l	T7-Primer (siehe 2.9)
1 µmol/l	SP6-T7-Primer (siehe 2.9)

Tabelle 2.11: Programmschema zur Templatesynthese für die *dsRNA*-Synthese

Temperatur	Zeit	Anzahl der Zyklen
95 °C	2 min	1
95 °C	30 sec	
40 °C	30 sec	30
72 °C	1 min/kBp	
72 °C	10 min	1

Das DNA-Fragment wurde gelelektrophoretisch aufgetrennt und aus dem Agarosegel präpariert (2.9). Für die simultane *in vitro* Transkription des sense- und antisense-Strangs wurde der Reaktionsansatz mit folgender Zusammensetzung angesetzt und für 2 Stunden bei 37 °C inkubiert.

3 µg	DNA-Fragment
5 µl	10x Transkriptionspuffer
5 µl	T7 RNA-Polymerase
5 µl	NTP-Mix (10 mmol/l pro NTP, Roche, 11277057001)
2 µl	RNasin (Promega, N2611)
Ad 50 µl	Reinstwasser

Die dsRNA wurde gefällt (2.10.5.1) und in 50 µl steril filtriertem Seewasser aufgenommen. Die Konzentration wurde photometrisch bestimmt (2.10.9) und auf 1 µg/µl in 1x Injektionspuffer eingestellt. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C.

2.13 Präparation und Analyse von Proteinen

2.13.1 Expression von His-Fusionsproteinen in *E. coli*

Der Vektor pQE-30 (Qiagen, Hilden) ist ein Expressionsvektor (2.5) mit einem IPTG-induzierbaren Promotor. Eine im Leserahmen des Vektors gerichtet einklonierte cDNA wird nach der Induktion in *E. coli* potent als His-Fusionsprotein transkribiert und translatiert. Der N-terminal angefügte 6x His-Tag, eine Wiederholung von 6 Histidinen, ermöglicht die affinitätschromatographische Aufreinigung des Fusionsproteins an Nickelsäulen und den Nachweis des rekombinanten Proteins.

Zur Expression von His-Fusionsproteinen in *E. coli* wurde das entsprechende Expressionskonstrukt in einen *E. coli*-Stamm transformiert (2.10.2) der das *lacI^q* Allel besitzt (2.6). Der Expressionsklon wurde bezüglich des Zeitpunktes der Induktion, der IPTG-Konzentration bei der Induktion und der Inkubationstemperatur nach der Induktion, in Hinsicht auf maximale Ausbeute an

rekombinanten Protein, optimiert (Sambrook und Russell, 2001). Für Pdu-Twist betrug die optimale IPTG-Konzentration 1 mmol/l und die Inkubationsdauer 4 Stunden.

Für Expression und Aufreinigung großer Mengen rekombinanten Proteins wurden 50 ml LB-Medium (Ampicillin 50 µg/ml) in einem 250 ml Erlenmeyerkolben mit einer Einzelkolonie des Expressionsklons angeimpft und auf dem Schüttelinkubator (200 UpM) bei 37 °C über Nacht inkubiert. 500 ml auf 37 °C vorgewärmtes LB-Medium (50 µg/ml Ampicillin) wurden in einem 2 l Erlenmeyerkolben mit der Übernachtskultur angeimpft, bis zum Erreichen einer $OD_{600} = 0,5$ bis $OD_{600} = 1,0$ bei 37 °C auf dem Schüttelinkubator (200 UpM) bebrütet, mit 1 mmol/l IPTG induziert und für weitere 4 Stunden im Schüttelinkubator bei 37 °C inkubiert. Die Zellen wurden pelletiert (15 Minuten, 4000 UpM, 4 °C), der Überstand verworfen und das Zellpellet bei -80 °C komplett eingefroren. Das gefrorenen Pellet wurde bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

2.13.2 Aufreinigung von *E. coli* Einschlusskörpern

Bei der heterologen Überexpression von Fusionsproteinen in Bakterien ist oft das Phänomen der Bildung von Einschlusskörpern, sogenannten „Inclusion bodies“, zu beobachten. Es handelt sich hierbei um Aggregate unlöslichen, rekombinanten Proteins, die im Cyto- oder Periplasma abgelagert werden. Die Bildung von Einschlusskörpern bietet Vorteile aber auch Nachteile bei der Aufreinigung des rekombinanten Proteins. Einerseits stellt die Einschlusskörperbildung einen ersten Schritt der Konzentration und Aufreinigung des rekombinanten Proteins dar, da die Einschlusskörper nach der Lyse der Zellen von der Zelldebris und löslichem Protein durch Zentrifugation getrennt werden können. Andererseits liegt das rekombinante Protein in unlöslicher, somit biologisch inaktiver, Form vor und muss zur weiteren Analyse wieder in den löslichen Zustand zurückgeführt werden (Strandberg und Enfors, 1991).

Die Mechanismen, die zur Bildung von Einschlusskörpern führen, sind nur ansatzweise verstanden, dennoch kann aufgrund der Aminosäuresequenz des

rekombinanten Proteins eine Vorhersage getroffen werden (Wilkinson und Harrison, 1991). Die Analyse ist online unter <http://www.biotech.ou.edu/> verfügbar. Für Pdu-Twist ergab sich eine Wahrscheinlichkeit von 91,4 %, dass das rekombinante, überexprimierte Protein unlöslich sein wird.

Lösungs-Puffer zur Einschlusskörper Aufreinigung

50 mmol/l Tris-HCl (pH = 8,0), 25 % (w/v) Sucrose (Sigma, S0389), 1 mmol/l NaEDTA, 0,1 % (w/v) Natriumazid (Sigma-Aldrich, 438456), 10 mmol/l DTT (Dithiothreitol; Fluka, 43816)

Lyse-Puffer zur Einschlusskörper Aufreinigung

50 mmol/l Tris-HCl (pH = 8,0), 100 mmol/l NaCl, 1 % (v/v) Triton™ X-100 (Sigma, X100), 1 % (w/v) Natriumdeoxycholat (Fluka, 30970), 0,1 % (w/v) Natriumazid (Sigma-Aldrich, 438456), 10 mmol/l DTT (Dithiothreitol; Fluka, 43816)

Wasch-Puffer I zur Aufreinigung von Einschlusskörpern

50 mmol/l Tris-HCl (pH = 8,0), 0,5 % (v/v) Triton™ X-100 (Sigma, X100), 100 mmol/l NaCl, 1 mmol/l NaEDTA, 0,1 % (w/v) Natriumazid (Sigma-Aldrich, 438456), 10 mmol/l DTT (Dithiothreitol; Fluka, 43816)

Wasch-Puffer II zur Aufreinigung von Einschlusskörpern

50 mmol/l Tris-HCl (pH = 8,0), 100 mmol/l NaCl, 1 mmol/l NaEDTA, 0,1 % (w/v) Natriumazid (Sigma-Aldrich, 438456), 10 mmol/l DTT (Dithiothreitol; Fluka, 43816)

Zur Aufreinigung der Einschlusskörper wurde das Zellpellet (2.13.7) auf Eis aufgetaut, in 12,5 ml Lösungs-Puffer resuspendiert und in ein frisches 50 ml Zentrifugengefäß transferiert. Die resuspendierten Zellen wurden 5 Minuten auf Eis mit Ultraschall aufgeschlossen, danach 30 µl Lysonase (Novagen, 712340-4) und 12,5 ml Lyse-Puffer zugegeben und der Ansatz für 60 Minuten bei Raumtemperatur unter mildem Schütteln inkubiert. Die nachfolgenden Schritte wurden alle auf Eis durchgeführt. Die Einschlusskörper wurden abzentrifugiert und der Überstand abgenommen. Ein Milliliter wurde für die spätere Analyse aufbewahrt, der Rest verworfen. Das Pellet wurde in 10 ml Wasch-Puffer I aufgenommen und durch Ultraschallbehandlung (5 Minuten, volle Leistung, in 1 Minuten Pulsen) resuspendiert. Die Einschlusskörper wurden erneut abzentrifugiert (20 Minuten, 11000 g, 4 °C) und der Überstand verworfen. Die

pelletierten Einschlusskörper wurden in 10 ml Wasch-Puffer II aufgenommen und durch Ultraschallbehandlung (5 Minuten, volle Leistung, in 1 Minuten Pulsen) resuspendiert. Durch eine abschließende Zentrifugation (20 Minuten, 11000 g, 4 °C) wurden die aufgereinigten Einschlusskörper gesammelt, der Überstand verworfen und das Pellet bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C aufbewahrt.

2.13.3 Denaturierende affinitätschromatographische Aufreinigung von His-Fusionsproteinen aus *E. coli* Einschlusskörpern

8X His-Bind Binde-Puffer

4 mol/l NaCl, 40 mmol/l Imidazol, 160 mmol/l Tris-HCl, (pH = 7,9)

8X His-Bind Lade-Puffer

400 mmol/l NiSO₄

8X His-Bind Wasch-Puffer

4 mol/l NaCl, 480 mmol/l Imidazol, 160 mmol/l Tris-HCl, (pH = 7,9)

4X His-Bind Elutions-Puffer

4 mol/l Imidazol, 2 mol/l NaCl, 80 mmol/l Tris-HCl, (pH = 7,9)

4X His-Bind Strip-Puffer

2 mol/l NaCl, 400 mmol/l EDTA, 80 mmol/l Tris-HCl, (pH = 7,9)

His-Fusionsproteine können über Nickel-Chelat Affinitätschromatographie aufgereinigt (IMAC, Immobilized Metal Affinity Chromatography) werden. Hierfür werden Chromatographiesäulen mit immobilisierten Ni²⁺-Ionen benutzt. Die Histidine der His-Fusionsproteine chelieren die Nickelionen und die Fusionsproteine werden selektiv auf der Säule gebunden. Durch Behandlung mit Imidazol können die Proteine dann von der Säule eluiert werden.

Rekombinantes His-Fusionsprotein in *E. coli* Einschlusskörpern ist meist unlöslich in Salzlösungen oder nicht-ionischen Detergentien. Um die Proteine in Lösung zu bekommen, ist meistens eine vollständige Denaturierung notwendig. Dies wird durch die Verwendung von 6 mol/l Harnstoff oder 6 mol/l Guanidin-HCl im jeweiligen Puffer erreicht. Diese wurden durch direkte Zugabe der konzentrierten Puffer zu der entsprechenden Menge Harnstoff oder Guanidin-

HCl und nachfolgendem Auffüllen auf das Endvolumen hergestellt. Der Imidazolgehalt des His-Bind Wasch-Puffers wurde mit His-Bind Binde-Puffer auf 20 mmol/l eingestellt. Als Säulenmatrix wurde in dieser Arbeit His-Bind resin (aus dem His-Bind Purification Kit, 2.3) benutzt. Das Protokoll des Herstellers wurde folgenderweise abgewandelt:

In die Chromatographiesäule (Novagen, 70971-3) wurden 5 ml resuspendierte Säulenmatrix aufgetragen. Dies entspricht einem gepackten Säulenvolumen von 2,5 ml. Nachdem sich die Säulenmatrix gesetzt hatte wurde sie mit 7,5 ml Reinstwasser, 12,5 ml His-Bind Lade-Puffer und 7,5 ml His-Bind Binde-Puffer (6 mol/l Harnstoff) äquilibriert und mit Ni²⁺-Ionen beladen. Um die Proteine in den Einschlusskörpern (2.13.2) in Lösung zu bringen, wurden sie auf Eis aufgetaut, in 25 ml His-Bind Binde-Puffer (6 mol/l Harnstoff) durch Ultraschallbehandlung (5 Minuten, volle Leistung, in 1 Minuten Pulsen) resuspendiert und mehrere Stunden (oder über Nacht) bei 4 °C gelöst. Unlösliche Bestandteile wurden durch Zentrifugation (16000 g, 30 Minuten, 4 °C) und Filtration (0,45 µm, Roth, P665.1) des Überstandes entfernt. Der Proteinextrakt wurde auf die Chromatographiesäule aufgetragen und nachfolgend mit 25 ml His-Bind Binde-Puffer (6 mol/l Harnstoff) und 15 ml His-Bind Wasch-Puffer (6 mol/l Harnstoff, 20 mmol/l Imidazol) gewaschen. Das aufgereinigte Protein wurde mit 15 ml His-Bind Elutions-Puffer (6 mol/l Harnstoff) von der Säule eluiert und in 5 ml Fraktionen gesammelt. Die Lagerung der Fraktionen bis zur weiteren Analyse erfolgte bei -80 °C.

Zur Regeneration der Chromatographiesäule wurde mit 7,5 ml His-Bind Strip-Puffer gewaschen. Die Aufbewahrung der Chromatographiesäule fand in His Strip-Puffer bei 4 °C statt.

2.13.4 Dialyse und Konzentration von Proteinen

PBS:

137 mmol/l NaCl, 2,7 mmol/l KCl, 8 mmol/l Na₂HPO₄, 1,5 mmol/l KH₂PO₄

Durch Dialyse können aus Proteinlösungen ungewollte Moleküle entfernt werden. Nach der affinitätschromatographischen Aufreinigung (2.13.3) lag das rekombinante Protein in denaturierter Form gelöst in His-Bind Elutions-Puffer (6 mol/l Harnstoff) vor. Um das Protein zu renaturieren und in seine native Form zurückzuführen, wurden die gesammelten Fraktionen gegen jeweils 500 ml absteigender PBS/Harnstoffkonzentrationen (PBS/4 mol/l Harnstoff, PBS/3 mol/l Harnstoff, PBS/1 mol/l Harnstoff, PBS) 10 Stunden bis 16 Stunden dialysiert (Roth, Spectra/Por Float-A-Lyzer™ RC MWCO 15000, P638.1). Nach der Dialyse wurde die renaturierte Proteinlösung durch Ultrazentrifugation im Zentrifugenfilter (Millipore, Amicon Ultra-4 MWCO 5000, UFC800508) auf 500 µl Endvolumen eingengt. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C.

2.13.5 Immunisierung von Kaninchen und Gewinnung von polyklonalen Antikörpern

Die Immunisierung zweier Kaninchen mit rekombinantem Protein und die Gewinnung der polyklonalen Antiseren anti-PduTwi-8086 und anti-PduTwi-8087 (2.4) wurden bei der Firma Seqlab (Göttingen) in Auftrag gegeben.

2.13.6 Präparation von Gesamt-Protein aus *Platynereis* und *Drosophila* Entwicklungsstadien

RIPA (Radio Immuno Precipitation Assay) Puffer

50 mmol/l Tris (pH = 8,0), 150 mmol/l NaCl, 1 % (v/v) Igepal™CA-630 (Sigma, I3021), 0,5 % (w/v) Natriumdeoxycholat (Sigma-Aldrich, D6750), 0,1 % (w/v) SDS. Kurz vor Verwendung Protease Inhibitor Cocktail (Sigma, P2714) zugeben

Zur Präparation von Gesamtprotein aus Entwicklungsstadien von *Platynereis* und *Drosophila* (2.7.1, 2.8.1) wurden die Entwicklungsstadien unter flüssigem Stickstoff mit dem Pistill homogenisiert, in 300 µl RIPA Puffer aufgenommen und zwei Stunden bei 4 °C auf dem Schüttler lysiert. Zelltrümmer, Polysaccharide und Nukleinsäuren wurden durch eine Zentrifugation (20 Minuten, 12000 UpM, 4 °C) pelletiert, der proteinhaltige Überstand in ein frisches Eppendorfreaktionsgefäß

überführt und in Aliquots bei -80 °C oder unter flüssigem Stickstoff bis zur weiteren Verwendung gelagert.

2.13.7 Isolation von Proteinen aus wässrigen Lösungen

Um Proteine aus wässrigen Lösungen zu präparieren und zu konzentrieren wurde eine Kombination verschiedener Methoden (Wessel und Flugge, 1984) benutzt, die den besten präparativen Erfolg erzielte.

Zu einem Volumen Proteinlösung wurden 1/100 Volumen 2 % (w/v) Natriumdeoxycholat gegeben, der Ansatz gut durchmischt und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Proteine wurden durch Zugabe von 1/10 Volumen 100 % Trichloressigsäure (TCA), entweder über Nacht bei 4 °C oder für 5 Minuten bei -20 °C und weitere 15 Minuten bei 4 °C, gefällt und durch Zentrifugation (10 Minuten, 14 000 UpM, 4 °C) pelletiert. Der Überstand wurde abgenommen, das Proteinpellet bei Raumtemperatur getrocknet und in 200 µl eiskaltem Aceton resuspendiert. Nach einer zwanzigminütigen Inkubation auf Eis folgte eine zehnminütige Zentrifugation (14000 UpM, 4 °C). Der Überstand wurde erneut verworfen und die gefällten Proteine an der Luft getrocknet. Nachdem das restliche Aceton verdampft war, wurden die Proteine entweder direkt in SDS-PAGE Probenpuffer (2.13.9) oder, falls eine weitere Aufreinigung gewünscht war, in 100 µl Reinstwasser wieder in Lösung gebracht.

War eine Entfernung von Detergentien und Salzen gewünscht wurden 400 µl Methanol zugegeben und gemischt. Nach der Zugabe von 100 µl Chloroform und gründlicher Durchmischung wurden 300 µl Reinstwasser zugegeben und erneut gründlich gemischt. Die Phasentrennung erfolgte durch Zentrifugation (10 Minuten, 14000 UpM). Die wässrige Phase wurde abgenommen und verworfen. Nach der Zugabe von 400 µl Methanol und gründlicher Durchmischung wurden die Proteine pelletiert (10 Minuten, 14000 UpM), soviel wie möglich Methanol abgenommen und das Pellet an der Luft getrocknet. Die Proteine wurden dann in SDS-PAGE Probenpuffer wieder resuspendiert.

2.13.8 Bestimmung des Proteingehalts

Bradford Reagenz

100 mg Coomassie Brilliant Blue (Fluka, 27816) werden in 50 ml 95 % (v/v) Methanol gelöst, nach der Zugabe von 100 ml 85 % (v/v) Phosphorsäure wird mit Wasser auf 1 l aufgefüllt und die Lösung gefiltert

Die Bestimmung des Proteingehalts der Proteinpräparationen wurde mit dem Bradford Assay vorgenommen (Bradford, 1976). Hierzu wurden 100 µl Probe mit 3 ml Bradford Reagenz vermischt und für 5 Minuten bis 45 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Bestimmung des Proteingehalts erfolgte durch Messung der Absorption bei $\lambda = 595$ nm und im Vergleich mit einer zuvor erstellten BSA-Standardkurve. Der lineare Messbereich des Assays liegt bei 0,1 mg/ml bis 1,4 mg/ml. Bei höheren Proteinkonzentrationen in der Probe wurde diese vor der Messung verdünnt.

2.13.9 SDS Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) von Proteinen

Bei der SDS-PAGE handelt es sich um eine Methode, mit der Proteine entsprechend ihrem Molekulargewicht elektrophoretisch aufgetrennt werden. Durch Inkubation der Proteine mit Natriumdodecylsulfat (SDS) und Disulfidbrücken reduzierenden Mitteln werden diese vollständig denaturiert und dissoziiert. SDS bindet an hydrophobe Regionen der Proteine. Die stark negative Ladung von SDS nivelliert alle Ladungen der Proteine, so dass in der Regel alle Proteine gleich stark negativ geladen sind und im Polyacrylamidgel elektrophoretisch entsprechend ihrer Größe aufgetrennt werden können.

2.5x SDS-PAGE Trenngel-Puffer

1,875 mol/l Tris-HCl (pH = 8,9), 0,25 % (w/v) SDS

5x SDS-PAGE Sammelgel-Puffer

0,3 mol/l Tris-Phosphat (pH = 6,7), 0,5 % (w/v) SDS

5x SDS-PAGE Elektrophorese-Puffer

0,5 mol/l Tris Base, 1,92 mol/l Glycin, 0,5 % (w/v) SDS, pH = 8,8 stellt sich selber ein, nicht titrieren

5x SDS-PAGE Proben-Puffer:

0,225 mol/l Tris-HCl (pH = 6,8), 50 % (v/v) Glycerin, 5 % (w/v) SDS, 0,05 % (w/v) Bromphenolblau (Roth, A512.1), 0,25 mol/l DTT (Dithiothreitol; Fluka, 43816)

Coomassie™-Färbelösung

1 % (w/v) Brilliant Blue R (Fluka, 27816), 40 % (v/v) Ethanol und 10 % (v/v) Essigsäure

Coomassie™-Entfärbelösung

40 % (v/v) Methanol, 10 % (v/v) Essigsäure

Die analytische Trennung von Proteinproben erfolgte in 0,8 mm dicken, 10 cm x 10 cm großen, vertikalen Flachgelen im PerfectBlue Doppelsystem Twin S (Peqlab) unter Verwendung eines diskontinuierlichen Puffersystem (SDS-PAGE Sammelgel-Puffer pH = 6,7; SDS-PAGE Trenngel-Puffer pH = 8,9; SDS-PAGE Elektrophorese-Puffer pH = 8,8) nach Laemmli (Laemmli, 1970). Die Proteinextrakte wurden mit 10 % (w/v) SDS-Polyacrylamidgelen oder mit 12 % (w/v) SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt und analysiert. Die Zusammensetzung der Trenn- und Sammelgele zeigt Tabelle 2.12. Das Trenngel wurde zwischen die zusammengesetzten Elektrophoreseplatten gegossen, mit Butanol überschichtet und für mindestens 2 Stunden bei Raumtemperatur polymerisiert. Nach der Polymerisation des Trenngels wurde das Butanol entfernt, kurz mit Reinstwasser gespült, das Trenngel mit dem Sammelgel überschichtet und der Gelkamm platziert. Nach der Polymerisation des Sammelgels (ca. 20 Minuten) wurde das Gel in die Elektrophoreseeinheit überführt, diese mit 1x SDS-PAGE Elektrophorese-Puffer befüllt, der Kamm entfernt und die Geltaschen gespült. Vor dem Auftrag in die Probenaschen wurden die Proteinproben und Molekulargewichtsmarker mit 1/5 Volumen 5x SDS-PAGE Proben-Puffer versetzt und für 10 Minuten bei 100 °C denaturiert. Als Molekulargewichtsmarker dienten Dalton Mark™ VII-L Standard Mixture (Sigma, SDS7), Standard Mixture for Molecular Weights 30,000-200,000 (Sigma, SDS6H2),

Prestained Protein Marker, Broad Range (6-175 kDa, New England Biolabs, P7708S). Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte im Sammelgel mit 80 V, im Trenngel mit 200 V. Nach erfolgter Auftrennung wurde das Sammelgel entfernt. Nach der Proteintrennung wurden die Gele 20 Minuten in CoomassieTM-Färbelösung, und anschließend für mehrere Stunden in CoomassieTM-Entfärbelösung inkubiert. Die Entfärbelösung wurde solange mehrmals erneuert bis der Hintergrund farblos und die blau gefärbten Banden klar sichtbar waren. Alle Schritte wurden bei Raumtemperatur auf einem Schüttler durchgeführt. Die Dokumentation wurde mit dem E-Box System (Peqlab) und einem UV/Weisslicht Conversion Screen (Peqlab, 60-FC-26WL) vorgenommen.

Tabelle 2.12: Zusammensetzung der SDS-PAGE Sammel- und Trenngele

Stammlösungen	4 % Sammelgel	10 % Trenngel	12 % Trenngel
Reinstwasser	3,85 ml	1,9 ml	1,65 ml
5x SDS-PAGE Sammelgel-Puffer	1,1 ml	-	-
2,5x SDS-PAGE Trenngel-Puffer	-	2,2 ml	2,2 ml
Acrylamid/Bisacrylamid (40 %, 29:1, AppliChem, A0950)	550 µl	1,40 ml	1,65 ml
TEMED	5 µl	5 µl	5 µl
10 % (w/v) Ammoniumpersulfat (APS)	50 µl	50 µl	50 µl

2.13.10 Western Blot Analyse

Mit der Western Blot Analyse ist es möglich mit geeigneten Antikörpern, Proteinepitope *in vitro* nachzuweisen. Hierzu werden die elektrophoretisch aufgetrennten (2.13.9) Proteine auf eine Membran übertragen, mit dem entsprechenden Antiserum inkubiert und dann über ein Immuno-Enzym-Assay entweder kolorimetrisch oder chemolumineszent nachgewiesen. In dieser Arbeit wurde das Semi-Dry Blotting Verfahren zum Transfer der Proteine auf die Membran benutzt.

Western Blot Transfer-Puffer

25 mmol/l Tris Base, 150 mmol/l Glycin, 10% (v/v) Methanol, pH=8,3 stellt sich selber ein, nicht titrieren

TBS-Puffer

10 mmol/l Tris-HCl (pH = 7,5), 150 mmol/l NaCl

TBS-Tween/Triton-Puffer

20 mmol/l Tris-HCl (pH = 7,5), 500 mmol/l NaCl, 0,05% (v/v) TweenTM20 (Sigma, P1379), 0,2% (v/v) TritonTM X-100 (Sigma, X100)

Detektionspuffer SB9.5

100 mmol/l Tris-HCl (pH = 9,5), 100 mmol/l NaCl, 50 mmol/l MgCl₂, 0,1% (v/v) TweenTM20 (Sigma, P1379)

BCIP-Lösung:

50 mg/ml 5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat (Roth, A155.1) in 100 % Dimethylformamid (Roth, CP79.1), Lagerung bei -20 °C im Dunkeln

NBT-Lösung

75 mg/ml 4-Nitroblautetrazoliumsaz (Roth, 4421.3) in 70 % (v/v) Dimethylformamid (Roth, CP79.1), Lagerung bei -20 °C im Dunkeln

Hierzu wurde ein Stück PVDF Membran (Immobilon-P, Millipore, IPVH00010) in Gelgröße zugeschnitten, eine Minute mit Methanol benetzt, für 2 Minuten in Reinstwasser inkubiert und für mindestens 5 Minuten in Western Blot Transfer-Puffer belassen. Zum Aufbau des Blots wurden 6 Lagen Blotpapier (Universal Saugpapier, BIOTEC-FISCHER, 361300) auf die Größe der Anode des Semi-Dry Blotters zugeschnitten und mit Western Blot Transfer-Puffer getränkt. Der Blot wurde dann folgendermaßen aufgebaut. Um einen gleichmäßigen Transfer zu gewährleisten wurden Luftblasen, durch das Überrollen mit einer Vollpipette, aus jeder einzelnen Schicht des Stapels entfernt. Auf die Anode wurden 3 Lagen Blotpapier aufgelegt und darauf die PVDF-Membran aufgebracht. Das SDS-PAGE Gel wurde aus den Elektrophoreseplatten genommen, das Sammelgel entfernt, kurz in Western Blot Transfer-Puffer geschwenkt und auf die PVDF-Membran aufgelegt. Abschließend folgten 3 Lagen Blotpapier und die Kathode wurde aufgelegt. Der Transfer erfolgte bei 1,2 mA/cm² Membranfläche für eine Stunde. Nach Beendigung des Transfers wurde die Membran getrocknet. Hierzu wurde

die Membran, um das restliche Wasser zu entfernen, für 30 Sekunden in 100 % Methanol überführt und darauf folgend auf einem Stück Saugpapier 15 Minuten getrocknet. Die Molekulargewichtsmarker wurden mit einem Skalpell abgeschnitten und mit Amidoschwarz gefärbt (2.13.10.1). Zur Überprüfung des Transfererfolgs wurden, die Proteine mit einer reversiblen Ponceau-S Färbung (2.13.10.1) sichtbar gemacht.

Tabelle 2.13: Verdünnungen der im Western Blot verwendeten primären und sekundären Antikörper (siehe 2.4)

Antikörper	Verdünnung
anti-RGS-His (Maus)	1:2000
ant-Penta-His (Maus)	1:2000
anti-Tetra-His (Maus)	1:2000
anti-PduTwist-8086 (Kaninchen)	1:500
anti-PduTwist-8087 (Kaninchen)	1:500
anti-Maus-IgG-AP	1:25000
anti-Kaninchen-IgG-AP	1:40000

Zum immunhistochemischen Nachweis wurde die Membran zweimal je 10 Minuten in TBS-Puffer bei Raumtemperatur inkubiert und dann für 1 Stunde in Blocking-Puffer (3 % (w/v) BSA in TBS-Puffer) geblockt. Nach zwei Waschschritten mit TBS-Tween/Triton-Puffer (jeweils 10 Minuten) folgte eine zehnminütige Inkubation in TBS-Puffer. Die Inkubation mit dem primären Antikörper erfolgte über Nacht bei 4 °C. Die verwendeten Verdünnungen des jeweiligen Antikörpers in Blocking-Puffer sind in Tabelle 6 angegeben. Der primäre Antikörper wurde abgenommen und konnte wieder verwendet werden (Lagerung bei 4 °C). Es folgten zwei Waschschrritte mit TBS-Tween/Triton-Puffer (jeweils 10 Minuten) und eine zehnminütige Inkubation in TBS-Puffer. Die Inkubation mit dem sekundären Antikörper erfolgte bei Raumtemperatur für 2 Stunden. Die verwendeten Verdünnungen des jeweiligen Antikörpers in Blocking-Puffer sind in Tabelle 2.13 angegeben. Nach vier Waschschrritten mit TBS-Tween/Triton-Puffer (je 10 Minuten) wurde die Membran kurz in Detektionspuffer SB9.8 äquilibriert und durch Zugabe der Färbelösung

(4,5 µl NBT-Lösung/ml und 3,5 µl BCIP-Lösung/ml Detektionspuffer SB9.5) die Färbung gestartet. Nachdem die Färbungsintensität den gewünschten Grad erreicht hatte, wurde die Färbereaktion durch Spülen in Reinstwasser gestoppt. Die Dokumentation wurde mit dem E-Box System (Peqlab) und einem UV/Weisslicht Conversion Screen (Peqlab, 60-FC-26WL) vorgenommen.

2.13.10.1 *Amidoschwarzfärbung von Membranen*

Amidoschwarz-Färbelösung

0,1 % (w/v) Naphtol Blue Black (Amidoschwarz; Sigma, N3393), 25 % (v/v) Isopropanol, 10 % (v/v) Essigsäure

Amidoschwarz-Entfärbelösung

25 % (v/v) Methanol, 10 % (v/v) Essigsäure

Die Amidoschwarzfärbung stellt eine irreversible Methode dar, um auf Membranen transferierte Proteine anzufärben. Hierzu wurde die Membran kurz in Methanol benetzt und dann 10 Minuten bis 30 Minuten in Amidoschwarz-Färbelösung inkubiert. Danach wurde die Membran in Amidoschwarz-Entfärbelösung bis zur gewünschten Bandenintensität entfärbt.

2.13.10.2 *Ponceau-S Färbung von Membranen*

Ponceau-S Lösung

0,1 % (w/v) Ponceau-S (Fluka, 78376), 5 % (v/v) Essigsäure

Mit der Ponceau-S Färbung lassen sich auf Membranen transferierte Proteine reversibel anfärben. Hierzu wurde die Membran kurz in Methanol benetzt und dann 10 Minuten in Ponceau-S Lösung inkubiert. Danach wurde mit Reinstwasser solange entfärbt, bis die Proteinbanden klar zu erkennen waren.

2.14 Arbeiten mit *Platynereis dumerilii*

2.14.1 Fixierung von Entwicklungsstadien und subadulten *Platynereis dumerilii*

2x PTW:

2x PBS (pH = 7,5), 0,1% (v/v) Tween™20 (Sigma, P1379), sterilfiltrieren (0,2 µm, Nitrocellulose)

Wilson-Lösung

10 ml Eisessig, 10 ml Glycerin, 10 ml Reinstwasser

4 % PFA:

16 % (w/v) Paraformaldehyd in PBS durch Rühren und Erhitzen auf 65 °C lösen, tropfenweise 1 mol/l NaOH hinzufügen, bis die Lösung sich klärt (pH ~ 7,5), auf Raumtemperatur abkühlen und bei 4 °C lagern (4 Wochen haltbar). Vor der Verwendung frisch mit 3 Volumina 2x PTW verdünnen.

Zur Fixierung embryonaler, larvaler und adulter *Platynereis dumerilii* wurden diese, wenn nur eine lichtmikroskopische Untersuchung gewünscht war, eine Stunde in Wilson-Lösung fixiert und auch in dieser betrachtet.

Für die Antikörperfärbung und die *in situ* Hybridisierung wurden die Entwicklungsstadien 4 Stunden in 4 % PFA fixiert, danach viermal 10 Minuten mit 1x PTW gewaschen. Das PTW wurde abgenommen und durch Methanol ersetzt. Nach zehn Minuten Inkubation wurde das Methanol ausgetauscht. Die Entwicklungsstadien wurden danach bei -20 °C gelagert.

2.14.2 Cytochalasinbehandlung von Embryonalstadien

Platynereis dumerilii Gelege wurden nach 4 Stunden, 6 Stunden und 8 Stunden Entwicklung mit 1 µg/ml Cytochalasin B (Sigma, C6762) in natürlichem Seewasser solange inkubiert, bis unbehandelte Kontrollgelege das Trochophorastadium erreicht hatten. Die Gelege wurden fixiert (2.14.1) und analysiert.

2.14.3 Kernfärbung mit dem DNA-spezifischen Fluoreszenzfarbstoff Hoechst 33342

PTW-Hoechst

10 µg/ml Hoechst 33342 (Sigma-Aldrich, 14533) in PTW

PBS-DABCO-Glycerin

25 mg/ml DABCO (1,4 Diazabicyclo-[2,2,2]-Oktan; Fluka, 33480) in PBS lösen und anschließend mit Glycerin (1:10) mischen

Zur Färbung der Kerne wurden die in 4 % PFA fixierten Keime zweimal 5 Minuten in 1x PTW gewaschen, für 30 Minuten in PTW-Hoechst gefärbt, erneut zweimal 5 Minuten in PTW gewaschen und zuletzt in PBS-DABCO-Glycerin oder Fluoromount-G (SouthernBiotech, 0100-01) auf einen Objektträger überführt. Durch schmale Deckglasstreifen zwischen dem Objektträger und dem Deckgläschen wurden die Keime vor dem Zerdrücken geschützt. Die Auswertung und Dokumentation der Keime erfolgte mit dem Epifluoreszenz-Mikroskop (Olympus BX 51, 380 nm Anregungswellenlänge).

2.14.4 Aktinfärbung mit einem Phalloidin-TRITC Konjugat

PTW-Phalloidin-TRITC

175 ng/ml Phalloidin-tetramethylrhodamin B isothiocyanat Konjugat aus *Amanita phalloides* (Fluka, 77418) in PTW

PBS-DABCO-Glycerin

25 mg/ml DABCO (1,4 Diazabicyclo-[2,2,2]-Oktan; Fluka, 33480) in PBS lösen und anschließend mit Glycerin (1:10) mischen

Zur Färbung der Aktinfilamente wurden die in 4 % PFA (ohne Methanolschritt) fixierten Keime zweimal 5 Minuten in 1x PTW gewaschen, für 30 Minuten in PTW-Phalloidin-TRITC gefärbt, erneut zweimal 5 Minuten in PTW gewaschen und zuletzt in PBS-DABCO-Glycerin oder Fluoromount-G (SouthernBiotech, 0100-01) auf einen Objektträger überführt. Durch schmale Deckglasstreifen zwischen

dem Objektträger und dem Deckgläschen wurden die Keime vor dem Zerdrücken geschützt. Die Auswertung und Dokumentation der Keime erfolgte mit dem Epifluoreszenz-Mikroskop (Olympus BX 51, 380 nm Anregungswellenlänge).

2.14.5 Parentale RNA Interferenz (pRNAi) bei *Platynereis dumerilii*

10x Injektionspuffer *Platynereis* pRNAi

100 mmol/l Tris, 10 mmol/l EDTA (pH = 8,0)

Das Phänomen der parentalen RNA Interferenz (pRNAi) wurde erstmals bei *Caenorhabditis elegans* beschrieben (Fire et al., 1998). Mit ihrer Hilfe ist es möglich durch die Injektion von dsRNA in die Gonaden eines Tieres, die Ziel-mRNA auch in den sich entwickelnden Embryonen selektiv zu degradieren.

Da *Platynereis dumerilii* keine definierten Gonaden besitzt, sondern die Eizellen und Spermien frei im Coelom der epitoken Tiere flottieren, wurde die dsRNA (2.12.9) ins Coelom injiziert.

Hierzu wurden Weibchen, die sich gerade am Beginn der Epitokie und somit auch am Beginn der Gametogenese befanden, in 3,5 % (w/v) MgCl₂ in natürlichem Seewasser (NSW) betäubt und auf einen eisgekühlten Objektträger übertragen. Die Injektion der Tiere wurde unter der Stereolupe (Leica MZ16, Leica Microsystems) mithilfe eines Mikroinjektors (FemtoJet™, Eppendorf) und eines Mikromanipulators (Leitz) in die epitoke Körperhälfte der Weibchen durchgeführt. Die Mikroinjektionsnadeln wurden aus Borosilikatkapillaren (äußerer Durchmesser 1,0 mm; innerer Durchmesser 0,5 mm, mit Filament) mit einem Mikropipettenpuller (P-97 Flaming/Brown Micropipette Puller, Sutter Instruments) hergestellt. Zur Kontrolle des Injektionserfolgs wurde in den injizierten Lösungen noch ein Kristall Rhodaminisothiocyanat (RITC) gelöst. Erfolgreich injizierte Tiere fluoreszierten somit unter dem Epifluoreszenz-Mikroskop (Olympus BX, 51 Olympus) bei entsprechender Anregung (Filtersatz U-MWIG3, Olympus). Zur Entfernung von Schwebeteilchen, die die Injektionskapillaren verstopfen, wurden die zu injizierenden Lösungen 5 Minuten bei 14000 UpM zentrifugiert. Die Injektionsnadeln wurden mit der

Injektionslösung befüllt und in den Mikromanipulator eingespannt. Die Injektionsnadeln wurden mit dem Drucksystem des Mikroinjektors verbunden, die Pipettenspitze unter der Lupe am Rande des Objektträgers geöffnet und die dsRNA in die Weibchen injiziert. Es wurden pro Injektion entweder 2 µg dsRNA (1 µg/µl Injektionspuffer) oder in der Kontrollgruppe 2 µl Injektionspuffer injiziert. Die injizierten Tiere wurden isoliert bis zum Schwärmtanz gehalten und mit nichtinjizierten Männchen gekreuzt. Die Gelege wurden nach 24 Stunden und/oder 48 Stunden fixiert (entweder in Wilson Lösung oder für die *in situ* Hybridisierung, 2.14.1) und die resultierenden Phänotypen dokumentiert.

2.14.6 Antikörperfärbung an Embryonen und subadulten *Platynereis dumerilii*

2x PTW:

2x PBS (pH = 7.5), 0,1 % (v/v) Tween™20 (Sigma, P1379), sterilfiltrieren (0,2 µm, Nitrocellulose)

Zum immunfluoreszierenden oder immunhistochemischen Nachweis von Proteinepitopen in *Platynereis dumerilii* wurde nach folgendem Protokoll vorgegangen.

Die fixierten Tiere (2.14.1) wurden in einer absteigenden Methanolreihe (75 % (v/v) Methanol in PTW, 50 % (v/v) Methanol in PTW, 25 % (v/v) Methanol in PTW) je 10 Minuten rehydriert. Nach zweimal 5 Minuten Waschen in PTW wurden die Keime zur Permeabilisierung 5 Minuten (für Entwicklungsstadien) oder 10 Minuten (für dreisegmentige Jungwürmer und subadulte *Platynereis*) mit 1 ml Proteinase K (100 µg/ml Proteinase K in PTW, frisch hergestellt aus 20 mg/ml Proteinase K-Stammlösung) behandelt. Der Verdau wurde durch zweimalige Inkubation in 1 ml frisch hergestelltem 2 mg/ml Glycin in PTW abgestoppt. Nach zwei Waschschrinen (jeweils 5 Minuten in PTW) wurde für eine Stunde in 5 % (v/v) Ziegen Serum in PTW geblockt. Die Inkubation mit dem primären Antikörper erfolgte über Nacht bei 4 °C (Verdünnungen der primären Antikörper siehe Tabelle 2.14). Der primäre Antikörper wurde abgenommen und

bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C gelagert. Es folgten 3 Waschschrte mit PTW (jeweils 10 Minuten).

Für den immunfluoreszierenden Antigennachweis wurden die Tiere 1 Stunde in 5 % (v/v) Ziegen Serum in PTW geblockt und dann mit 200 µl entsprechendem (siehe 2.4) fluoreszenzgekoppelten sekundären Antikörper (Verdünnungen der sekundären Antikörper siehe Tabelle 2.14) für 2 Stunden im Dunkeln inkubiert. Es folgten 3 Waschschrte für 10 Minuten in PTW, wobei beim zweiten Waschschrte 10 µg/ml Hoechst 33342 (Sigma-Aldrich, 14533) dem PTW zugegeben wurden. Die Dokumentation erfolgte entweder mit dem Epifluoreszenz-Mikroskop (Olympus BX 51, Olympus) mit dem für die Anregung des Fluorochroms benötigten Filtersatz oder mit dem konfokalen Laserscanmikroskop (Leica TSC SP5, Leica Microsystems).

Tabelle 2.14: Verdünnungen der benutzten primären und sekundären Antikörpern (siehe 2.4)

Antikörper	Verdünnung
anti-PduTwist-8086 (Kaninchen)	1:100
anti-PduTwist-8087 (Kaninchen)	1:100
anti acetyliertes Tubulin (Maus)	1:250
anti-Maus-IgG-Cy2	1:40
anti-Maus-IgG-Cy3	1:100
anti-Kaninchen-IgG-Cy2	1:40
anti-Kaninchen-IgG-Cy3	1:100
anti-Kaninchen-IgG biotinyliert	1:200
anti-Maus-IgG biotinyliert	1:200

Für den immunhistochemischen Antigennachweis wurden die Tiere 2 Stunden mit dem entsprechenden biotinylierten sekundären Antikörper (siehe 2.4) in einer Verdünnung von 1 : 200 in PTW inkubiert und darauf folgend viermal 10 Minuten in PTW gewaschen. Die Signalverstärkung erfolgte mit dem Vectastain Elite ABC Kit Standard (Vector Laboratories, PK-6100) nach dem Protokoll des Herstellers. Darauf folgend wurden die Entwicklungsstadien in 500 µl PTW in ein Salznäpfchen überführt. Die Färbereaktion wurde durch die Zugabe von 20 µl DAB (3,3'-Diaminobenzidine, 25 mg/ml), 10 µl H₂O₂ (1 % (v/v) H₂O₂ in

PTW) gestartet. Durch die Zugabe von 30 μ l 1 % (w/v) CoCl_2 in PTW oder 30 μ l 1 % (w/v) NiSO_4 in PTW konnte statt einer braunen auch eine graue Färbung erreicht werden. Nach dem Erreichen der gewünschten Signalintensität wurde die Färbelösung abgenommen und die gefärbten Entwicklungsstadien in 70 % (v/v) Glycerin in PTW überführt. Die Dokumentation erfolgte mit dem Mikroskop (Olympus, BX 51 Olympus) unter Einsatz von Differentialinterferenzkontrast.

2.14.7 Einfache und doppelte *in situ* Hybridisierung an Entwicklungsstadien und subadulten *Platynereis dumerilii* mit markierten RNA-Sonden

Mithilfe der Methode der *in situ* Hybridisierung ist es möglich das räumliche und zeitliche Expressionsmuster von mRNA Transkripten in einem Gewebeschnitt oder fixierten und permeabilisierten Entwicklungsstadien zu dokumentieren. Hierzu werden die Entwicklungsstadien mit nichtradioaktiv markierten, zur Sequenz oder Teilen der Sequenz der mRNA komplementären Ribonukleinsäuresonden (2.12.7.3) hybridisiert und diese dann mit einem Immuno-Enzym-Assay nachgewiesen. Benutzt man mehrere unterschiedlich markierte RNA-Sonden, können simultan mehrere verschiedene mRNA Transkripte in den Entwicklungsstadien nachgewiesen werden.

2.14.7.1 Prähybridisierung und Hybridisierung

2x PTW:

2x PBS (pH = 7.5), 0,1 % (v/v) TweenTM20 (Sigma, P1379), sterilfiltrieren (0,2 μ m, Nitrocellulose)

***In situ* Hybridisierungs-Puffer:**

50 % (v/v) Formamid (Roth, deionisiert, P040.11), 5x SSC, 50 μ g/ml Heparin, 0,1 % (v/v) TweenTM20 (Sigma, P1379), 5 mg/ml Torula RNA

2x Stringenzwaschpuffer mit 50 % Formamid für die *in situ* Hybridisierung:

2x SSC, 50 % (v/v) Formamid (Roth, deionisiert, P040.11), 0,1 % (v/v) TweenTM20 (Sigma, P1379)

2x Stringenzwaschpuffer für die *in situ* Hybridisierung:

2x SSC, 0,1 % (v/v) Tween™20 (Sigma, P1379)

0,2x Stringenzwaschpuffer für die *in situ* Hybridisierung:

0.2x SSC, 0,1 % (v/v) Tween™20 (Sigma, P1379)

Fixierte Entwicklungsstadien oder subadulte *Platynereis dumerilii* (2.14.1) wurden in eine 6-well-Zellkultur-Schale (Greiner, 657160) überführt und in einer absteigenden Methanolreihe (75 % (v/v) Methanol in PTW, 50 % (v/v) Methanol in PTW, 25 % (v/v) Methanol in PTW) je 10 Minuten rehydriert. Nach 2 x 5 Minuten Waschen in PTW wurden die Keime zur Permeabilisierung mit Proteinase K (100 µg/ml Proteinase K in PTW, frisch hergestellt aus 20 mg/ml Proteinase K-Stammlösung) behandelt. Die Proteinase K Behandlung der Embryonen ist essentiell für den Erfolg und die Qualität der Hybridisierung. Die Länge des Verdauens muss für jedes Entwicklungsstadium optimiert werden. Für die verwendeten Entwicklungsstadien (20 Stunden, 24 Stunden, 48 Stunden, 72 Stunden) galten Inkubationszeiten von 5 Minuten bei Raumtemperatur. Adulte *Platynereis dumerilii* wurden 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgten zwei Waschschrte mit frisch hergestelltem 2 mg/ml Glycin in PTW. Danach wurden die Entwicklungsstadien 20 Minuten in 4 % (w/v) PFA nachfixiert und fünfmal mit PTW gewaschen.

Zur Prähybridisierung wurden die Embryonen in 2,0 ml Eppendorfreaktionsgefäße überführt und in 1 ml *in situ* Hybridisierungs-Puffer bei 65 °C 1 Stunde bis 2 Stunden im Wasserbad inkubiert. Am Ende der Inkubationszeit wurden 1 µl bis 5 µl nichtradioaktiv markierte Sonde (2.12.7.3) in 100 µl *in situ* Hybridisierungs-Puffer verdünnt (bei einer größeren Anzahl an Entwicklungsstadien in 200 µl) und 10 Minuten bei 80 °C denaturiert. Bei der Benutzung von zwei unterschiedlich markierten Sonden wurden diese zusammen in 100 µl *in situ* Hybridisierungs-Puffer denaturiert. Nachdem sich die Keime abgesetzt hatten, wurde der Überstand vorsichtig entfernt und der Hybridisierungs-Puffer mit der verdünnten Sonde (bzw. Sondenmixture) zugegeben. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 65 °C im Wasserbad.

Nach der Hybridisierung folgten die Stringenzwaschschritte. Die Embryonen wurden zweimal 30 Minuten in 2 ml 2x Stringenzwaschpuffer mit 50 % Formamid (vorgewärmt auf 65 °C) und nachfolgend einmal 15 Minuten in 2 ml 2x Stringenzwaschpuffer (vorgewärmt auf 65 °C) bei 65 °C im Wasserbad inkubiert. Abschließend folgten zwei 30minütige Waschschritte mit 2 ml 0.2x Stringenzwaschpuffer (vorgewärmt auf 65 °C) bei 65 °C.

2.14.7.2 Detektion der nicht radioaktiv markierten Sonde

Die Detektion der hybridisierten Nukleinsäurensonden erfolgte kolorimetrisch über Immuno-Enzym-Assays unter Verwendung der entsprechenden, die Markierung der Sonde (2.12.7.3) detektierenden, Antikörper-Konjugate (anti-Digoxigenin-AP, anti-Fluorescein-AP, anti-Biotin-AP). Die verschiedenen Substrate der alkalischen Phosphatase, sowie die Reaktionsbedingungen der Färbereaktion sind in Tabelle 2.15 zu finden.

Zur Vermeidung unspezifischer Bindungen der Antikörperkonjugate an Proteine von *Platynereis* wurden die Antikörper-Konjugate mit *Platynereis*-Proteinen präabsorbiert. Zur Herstellung der präabsorbierten Antikörper-Konjugate wurde ein geschlechtsreifes *Platynereis* Weibchen mit 4 % PFA in PTW fixiert (2.15.3) und homogenisiert. Das Homogenat wurde mit PTW auf ein Volumen von 1 ml aufgefüllt, 10 µl Antikörper-Konjugat (Verdünnung 1:100) zugegeben und schüttelnd über Nacht bei 4 °C inkubiert. Die Suspension wurde abzentrifugiert (13000 g, 10 Minuten) und der Überstand mit dem präabsorbierten Antikörper sterilfiltriert (Cellulose-Acetat, 0,2 µm). Das Pellet wurde in 1 ml PTW resuspendiert, zentrifugiert und der Überstand erneut sterilfiltriert. Die Filtrate wurden vereinigt und mit PTW auf ein Endvolumen von 20 ml aufgefüllt (Endverdünnung 1:2000). Der präabsorbierte Antikörper wurde bis zur Verwendung bei 4 °C gelagert (ca. 2 Monate bis 3 Monate stabil).

Zum immuncytochemischen Nachweis wurden die Embryonen 1 Stunde bis 2 Stunden mit 2 ml 5 % (v/v) Schafserum (Sigma, G9023) in PTW vorbehandelt und dann in 200 µl, der Markierung der Sonde entsprechenden, präabsorbierten Antikörper über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach dem Ende der Inkubationszeit wurden die Keime in eine 6-well-Zellkulturplatte transferiert und, um

ungebundenen Antikörper zu entfernen, sechsmal mit 3 ml PTW gewaschen. Nach der Äquilibrierung der Embryonen in dem entsprechenden Detektionspuffer (zweimal 5 Minuten), wurde 1 ml Färbelösung (siehe Tabelle 2.15) zugegeben und bis zu 48 Stunden im Dunkeln gefärbt. Gelegentlich wurde das Fortschreiten der Farbreaktion unter dem Binokular überprüft. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 2 ml PTW abgestoppt und die Keime dreimal 5 Minuten in PTW gewaschen.

Detektionspuffer SB9.5

100 mmol/l Tris-HCl (pH = 9,5), 100 mmol/l NaCl, 50 mmol/l MgCl₂, 0,1 % (v/v) TweenTM20 (Sigma, P1379), 5 mmol/l Levamisol (Sigma, L9756)

BCIP-Lösung

50 mg/ml 5-Brom-4-Chlor-3-Indolyphosphat (Roth, A155.1) in 100 % Dimethylformamid (Roth, CP79.1), Lagerung bei -20 °C im Dunkeln

NBT-Lösung

75 mg/ml 4-Nitroblautetrazoliumsals (Roth, 4421.3) in 70 % (v/v) Dimethylformamid (Roth, CP79.1), Lagerung bei -20 °C im Dunkeln

INT/BCIP-Lösung

33 mg/ml 2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-phenyltetrazoliumchlorid (Sigma, I8377) und 33 mg/ml-Brom-4-Chlor-3-Indolyphosphat (Roth, A155.1) in 100 % Dimethylformamid (Roth, CP79.1), Lagerung bei -20 °C im Dunkeln

Detektionspuffer SB8.2

100 mmol/l Tris-HCl (pH = 8,2), 100 mmol/l NaCl, 0,1 % (v/v) TweenTM20 (Sigma, P1379), 5 mmol/l Levamisol (Sigma, L9756)

Fast Blue BB-Lösung

50 mg/ml 4-benzoylamino-2,5-diethoxybenzenediazoniumchlorid hemi[zinkchlorid]-Salz (Sigma-Aldrich, F3378) in 100 % Dimethylsulfoxid (Roth, AE02.1), Lagerung bei -20 °C im Dunkeln

NAMP-Lösung

50 mg/ml Naphthol-AS-MX-phosphat (3-hydroxy-2-naphtholsäure 2,4-dimethylanilidphosphat, (Sigma-Aldrich, N5000)) in 100 % Dimethylsulfoxid (Roth, AE02.1), Lagerung bei -20 °C im Dunkeln

Detektionspuffer TT8.2

100 mmol/l Tris-HCl (pH = 8,2), 0,1 % (v/v) TweenTM20 (Sigma, P1379), 5 mmol/l Levamisol (Sigma, L9756)

Fast Red-Lösung

Eine Tablette Fast Red Tablets (Roche, 11496549001) in 2 ml Detektionspuffer TT8.2 (100 mmol/l Tris-HCl (pH = 8,2), 0,1 % (v/v) TweenTM20 (Sigma, P1379), 5 mmol/l Levamisol (Sigma, L9756)), filtern und sofort verbrauchen

War die Detektion einer zweiten Sonde gewünscht wurden die Embryonen zur Entfernung des ersten Antikörpers zweimal 10 Minuten in 0,1 mol/l Glycin-HCl (pH = 2,2), 0,1 % (v/v) TweenTM20 gewaschen. Nach vier Waschschritten in PTW (jeweils 5 Minuten), wurden die Entwicklungsstadien über Nacht bei 4 °C mit 200 µl entsprechendem präabsorbierten Antikörper inkubiert. Die Färbung folgte analog dem vorherigen Absatz. Zur Zusammensetzung der Färbelösungen und den Reaktionsbedingungen der Färbereaktion siehe Tabelle 2.15

Tabelle 2.15: Substrate und Färbelösungen für die *in situ* Hybridisierung

AP Substrat	Arbeitskonzentration in mg/ml Färbepuffer	Färbepuffer	Farbe des Niederschlags
BCIP/NBT	175/375,5	SB9.5	violett-blau
BCIP/INT	250/250	SB9.5	dunkelbraun
Fast Blue BB/NAMP	1000/500	SB8.2	hellblau
Fast Red/NAP	1000/250	TT8.2	rot

Optional folgte eine Nachfixierung mit 4 % PFA (2.14.1). Die gefärbten Embryonen wurden in 70 % (v/v) Glycerin in PTW überführt, und mit dem Mikroskop (Olympus BX 51, Olympus) unter Einsatz von Differentialinterferenzkontrast dokumentiert.

Da das bei der Färbung mit Fast Red/NAP gebildete Präzipitat bei Anregung mit grünem Licht (U-MWIG3, Olympus) fluoresziert, wurde dessen Lokalisierung entweder mit dem Epifluoreszenz-Mikroskop (Olympus BX 51, Olympus) oder dem konfokalen Laserscanmikroskop dokumentiert.

2.14.8 Histologische Untersuchungen an Entwicklungsstadien von *Platynereis*

2.14.8.1 Einbettung von Entwicklungsstadien in Araldit und Seriendünnschnitte

Um eine genauere Analyse der *in situ* Hybridisierungen (2.14.7) zu ermöglichen wurden die gefärbten Embryonen in Araldit eingebettet und Serienschnitte angefertigt.

Aralditgemisch

13 g Araldit, 12 g DDSA werden 10 Minuten mit einem Glasstab gerührt und dann 0,5 g BDMA-Beschleuniger eingerührt

Hierzu wurden die gefärbten Embryonen aus den *in situ* Hybridisierungen in 4 % PFA nachfixiert (2.14.1) und auf einem Objektträger in flüssigen 2 % (w/v) Agar in Leitungswasser in die richtige Schnittposition orientiert. Nach dem Erstarren des Agars wurden die gefärbten Entwicklungsstadien mit einer Rasierklinge aus dem Agarblöckchen ausgeschnitten und in Eppendorfreaktionsgefäße überführt. In einer aufsteigenden Alkoholreihe (jeweils 20 Minuten in 50 % (v/v) Ethanol in Reinstwasser, 70 % Ethanol (v/v) in Reinstwasser, 80 % (v/v) Ethanol in Reinstwasser, 90 % (v/v) Ethanol in Reinstwasser, zweimal 20 Minuten 96 % (v/v) Ethanol in Reinstwasser, 20 Minuten 98% Ethanol) wurden die Agarblöckchen mit den Entwicklungsstadien entwässert, in Rollrandgläschen aus Glas überführt und dreimal 20 Minuten in Propylenoxid (1,2-Epoxypropan, Roth, 8617.1) inkubiert. Darauf folgend wurden die Agarblöckchen in einem 1:1 Gemisch aus Aralditgemisch und Propylenoxid in offenen Rollrandgläschen unter dem Abzug über Nacht inkubiert. Am darauf folgenden Tag wurden die Agarblöckchen in frisches Aralditgemisch überführt und mindestens 6 Stunden auf dem Rotator gedreht. Nach dem Ablauf der Inkubationszeit wurden die Blöckchen aus den Rollrandgläsern in eine Flacheinbettungsform überführt, in den Vertiefungen der Form orientiert und mit Aralditgemisch aufgefüllt. Die Polymerisation des Aralditgemischs erfolgte bei 60 °C für 72 Stunden. Die ausgehärteten

Aralditblöckchen wurden aus den Formen genommen und bis zur weiteren Verwendung bei Raumtemperatur gelagert.

Zu Anfertigung der Serienschritte wurden die Blöckchen mit einer Rasierklinge in der Art angetrimmt, dass eine möglichst kleine Anschnittstelle, die sogenannte „Pyramide“ entstand. Aus den getrimmten Blöckchen wurden dann mit dem Ultramikrotom (Reichert) Serien von Semidünnschnitten (Schnittdicke ca. 1 µm) angefertigt, auf Objektträger aufgezogen und getrocknet.

Der größte Teil der Schnitte wurden von Frau Brigitte Fronk (Universität Giessen, Institut für Allgemeine und Spezielle Zoologie) angefertigt und mir zur Analyse zur Verfügung gestellt.

2.14.8.2 Safraninfärbung

Safraninstammlösung

2 g Safranin O in 100 ml 50 % (v/v) Ethanol in Reinstwasser

Safraninlösung

2 ml Safraninstammlösung mit 8 ml 50 % (v/v) Ethanol in Reinstwasser verdünnen

Zur Kontrastierung der Semi-Dünnschnitte der durch *in situ* Hybridisierung gefärbten Embryonen wurde mit Safranin gefärbt. Diese Färbung färbt vor allem Chromatin und Organellen rot bis zartrot an und bildet einen guten Kontrast zur dunkelblauviolettten Färbung der *in situ* Hybridisierung. Hierzu wurden die Objektträger auf die Färbebank gebracht, auf 80 °C erhitzt und für 10 Minuten bis 15 Minuten mit Safraninlösung überschichtet. Die Differenzierung erfolgte mit Reinstwasser. Darauf folgend wurden die Schnitte luftgetrocknet und mit dem Mikroskop (Olympus BX 51, Olympus) dokumentiert.

2.15 Arbeiten mit *Drosophila melanogaster*

2.15.1 P-Element Keimbahntransformation von *Drosophila*

In P-Element-Vektoren einklonierte cDNAs lassen sich durch Injektion der Vektoren in das Polplasma sich entwickelnder *Drosophila* Embryonen stabil in deren Keimbahn integrieren (Rubin und Spradling, 1982; Spradling und Rubin, 1982).

2.15.1.1 Vorbereitung der Embryonen

0,7 % NaCl-Lösung

0,7 % (w/v) NaCl, 0,02 % (v/v) Triton™ X-100 (Sigma, X100)

200 bis 300 *white*-Fliegen wurden 3 Tage bis 5 Tage nach dem Schlüpfen, in mit Apfelsaftagar gefüllten Plastikröhrchen bei 25 °C gehalten. Zur Fütterung wurde eine Portion Trockenhefe zugegeben. Die für die Injektion vorgesehenen Embryonen wurden durch das Wechseln der Apfelsaftagarröhrchen in Intervallen (ungefähr alle 30 Minuten) gewonnen. Die Entwicklungsstadien wurden mit einem Pinsel vorsichtig in ein feinmaschiges Metallsieb überführt, mit 0,7 % NaCl-Lösung gewaschen und schließlich in einer, im Verhältnis 1:1 mit Reinstwasser verdünnten, Danklorix-Lösung (Colgate-Palmolive, Hamburg), unter Lupenkontrolle bis zur Auflösung des Chorions inkubiert. Die entchorionisierten Embryonen wurden gründlich mit 0,7 % NaCl-Lösung gewaschen, mit einem Pinsel auf einen rechteckigen Apfelsaftagar-Block überführt und für die Injektion mit Hilfe einer Präpariernadel mit dem anterioren Pol zur Blöckchenkante hin orientiert. Durch Aufsetzen eines mit Klebstoff bestrichenen (Klebstoff von 10 cm Tesa-Packband in 10 ml Heptan gelöst) Deckgläschens wurden die Embryonen von dem Agarblöckchen auf das Deckgläschen transferiert und fixiert. Um den Innendruck der Embryonen zu verringern wurden sie darauf folgend je nach Luftfeuchtigkeit und Raumtemperatur 8 Minuten bis 12 Minuten getrocknet. Durch Überschichten mit Voltalef-Öl wurde ein weiteres Austrocknen der Embryonen verhindert.

2.15.1.2 Mikroinjektion der Embryonen

10x Injektionspuffer

1 mmol/l NaHPO₄ (pH = 7,4), 50 mmol/l KCl

Die zu injizierende DNA und das Helferplasmid p π 25.7wc wurden in einer Konzentration von 0,5 μ g/ μ l in 1x Injektionspuffer gelöst. 20 μ l der zu injizierenden DNA (0,5 μ g/ μ l) und 5 μ l des Helferplasids (0,5 μ g/ μ l) wurden vermischt und, um störende Schwebeteilchen zu sedimentieren, zentrifugiert (13000 UpM, 30 min, 4 °C). Die Mikroinjektionsnadeln wurden aus Borosilikatkapillaren (äußerer Durchmesser 1,0 mm; innerer Durchmesser 0,5 mm, mit Filament) mit einem Mikropipettenpuller (P-97 Flaming/Brown Micropipette Puller, Sutter Instruments) hergestellt. Die Injektionskapillare wurde mit 1 μ l der DNA-Lösung befüllt und in den Mikromanipulator eingespannt. Die Kapillare wurde mit dem Drucksystem des Mikroinjektors verbunden und zum Öffnen der Kapillare der vordere Teil unter Lupenkontrolle am Rand des Deckgläschens abgebrochen. Nach gezieltem Einführen der Nadel in das posteriore Ende der Embryonen wurde die DNA-Lösung injiziert. Embryonen, bei denen sich die Polzellen schon gebildet hatten und somit eine Keimbahntransformation nicht mehr möglich war, wurden durch seitliches Aufreißen mit der Injektionsnadel abgetötet.

Die Deckgläschen mit den injizierten Embryonen wurden in feuchte Kammern gelegt und bei Raumtemperatur inkubiert. Nach 24 Stunden bis 48 Stunden wurden geschlüpfte Larven mit der Präpariernadel abgesammelt und in Flaschen mit Zuchtmedium transferiert. Bis zum Schlüpfen der adulten Fliegen wurden die Flaschen bei 25 °C inkubiert.

2.15.1.3 Selektion transformierter Fliegen

Der P-Element Insertionsvektor pUAST codiert unter anderem für die Sequenz des *white*-Gens (rote Augenfarbe) als dominanten Selektionsmarker. Da die Insertion des P-Element-Konstruktes in die Keimbahn der injizierten Embryonen erfolgt, können transformierte Fliegen erst in der G1-Generation selektiert werden.

Die injizierten Tiere (G0-Generation) wurden unmittelbar nach dem Schlüpfen abgesammelt und mit *white*-Fliegen gekreuzt. Da die injizierten Embryonen ebenfalls aus einem *white*-Stamm stammen, kann man transformierte Fliegen in der G1-Generation anhand ihrer orangeroten Augenfarbe erkennen. Jedes selektierte transformierte Tier wurde wiederum mit *white*-Fliegen verpaart und die entstehenden heterozygoten Nachkommen untereinander weitergekreuzt. Die homozygoten Nachkommen, die in der Regel an der dunkleren Augenfarbe zu erkennen sind, wurden dann zur Etablierung einer stabilen transgenen Linie weitergezüchtet (Klemenz *et al.*, 1987).

2.15.2 Ektopische Expression mit dem GAL4/UAS-System

Die Expression von beliebigen Transgenen zu definierter Zeit und in definierten Geweben ist mit Hilfe des GAL4/UAS-Systems möglich. Die Methode beruht auf der transienten stadien- bzw. gewebespezifischen Expression des Hefe-Transkriptionsfaktors GAL4. Durch die Expression werden Transgene, die hinter GAL4-responsiven UAS-Promotorelementen (*upstream activating sequence*) inkloniert (z.B. in pUAST) und in die Keimbahn von *Drosophila* eingebracht wurden (2.15.1), selektiv eingeschaltet. Die beiden genetischen Elemente liegen als separate Konstrukte in unterschiedlichen transgenen Fliegenstämmen vor und wurden durch Kreuzung der GAL4-Aktivatorlinie (Treiber, siehe 2.8) mit der UAS-Linie (Effektor, siehe 2.8) in der resultierenden Filialgeneration kombiniert (Brand und Perrimon, 1993). In dieser Arbeit wurde das Gal4/UAS-System zur ektopischen Expression von *Pdu-twist* in *Drosophila twist* (*twi*) und *twist snail* (*twi sna*) mutanten Stämmen benutzt.

2.15.3 Fixierung von Embryonen und larvaler Organe für die Antikörperfärbung und *in situ* Hybridisierung

2.15.3.1 Sammeln und Fixieren von Fliegenembryonen

0,7 % NaCl-Lösung

0,7 % (w/v) NaCl, 0,02 % (v/v) Triton™ X-100 (Sigma, X100)

Zur Eiablage wurden die Fliegen auf mit Apfelsaftagar gefüllte Plastikflaschen gesetzt. Zur Fütterung wurde auf den Apfelsaftagar zusätzlich eine Portion Trockenhefe gegeben. Embryonen des gewünschten Entwicklungsstadiums (Stunden nach Eiablage) wurden mit einem Pinsel und 0,7 % NaCl-Lösung abgesammelt, in ein Edelstahlsieb überführt und gründlich mit 0,7 % NaCl-Lösung gewaschen. Die gesammelten Fliegenembryonen wurden zur Entfernung des Chorions in einer 1:1 mit Reinstwasser verdünnten Danklorix-Lösung (Colgate-Palmolive, Hamburg) unter Lupenkontrolle bis zur Auflösung des Chorions inkubiert. Nach gründlichem Spülen mit 0,7 % NaCl-Lösung wurden die Embryonen in ein Eppendorfreaktionsgefäß überführt und für 10 Minuten in 500 µl 4 % (v/v) Formaldehyd in PBS (F-PBS) und 500 µl Heptan unter kräftigem Schütteln auf dem Schüttler fixiert. Nach der Ausbildung der Phasengrenze und dem Absetzen der Embryonen wurden beide Phasen so gut wie möglich abgenommen und die Embryonen zweimal mit je 1 ml Heptan gewaschen. Zur Entfernung der Vitellinmembran wurden 500 µl frisches Heptan und 500 µl Methanol zugegeben und 2 Minuten bis 3 Minuten kräftig geschüttelt. Der Überstand und die nicht absinkenden Embryonen wurden verworfen, während die verbleibenden Embryonen dreimal mit jeweils 1 ml Methanol gewaschen wurden. Zuletzt wurden die fixierten Embryonen mit Methanol überschichtet und bei -20 °C bis zu ihrer weiteren Verwendung gelagert.

2.15.3.2 *Präparation und Fixierung von Speicheldrüsen aus Larven*

Zur Präparation von Speicheldrüsen wurden Larven im 3. Larvenstadium aus den Maismehlagarflaschen, die zur Stammhaltung benutzt wurden, mit der Federstahlpinzette abgesammelt und gut in PBS gewaschen. Die Präparation erfolgte in PBS mittels DUMONT-Pinzetten (DUMONT, Schweiz). Hierzu wurde mit einer Pinzette das Kopfskelett der Larve fest fixiert und mit einer anderen Pinzette Zug auf den Hautmuskelschlauch ausgeübt. So war es möglich das Kopfskelett zusammen mit den Speicheldrüsen von dem restlichen Larvenkörper zu trennen. Zur Fixierung wurden die präparierten Speicheldrüsen über Nacht bei 4 °C auf dem Schüttler in 4 % (v/v) Formaldehyd in PBS (F-PBS) inkubiert. Die fixierten Speicheldrüsen wurden dreimal jeweils 10 Minuten in PTW gewaschen

und in Methanol überführt. Nach 5 Minuten wurde das Methanol abgenommen, die Speicheldrüsen mit frischem Methanol überschichtet und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

2.15.4 Antikörperfärbung an Embryonen und larvalen Geweben von *Drosophila*

2x PTW:

2x PBS (pH = 7.5), 0,1 % (v/v) TweenTM20 (Sigma, P1379), sterilfiltrieren (0,2 µm, Nitrocellulose)

Zum Nachweis von Proteinepitopen in *Drosophila* Embryonen und larvalen Geweben wurde von fixierten Entwicklungsstadien oder Speicheldrüsen (2.15.3) das Methanol entfernt und dreimal 5 Minuten mit PTW rehydriert. Die rehydrierten Stadien oder Organe wurden über Nacht bei 4 °C auf dem Schüttelinkubator mit dem primären Antikörper in der jeweiligen Verdünnung inkubiert (zur Verdünnung der primären Antikörper siehe Tabelle 2.16). Der primäre Antikörper wurde abgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C gelagert. Es folgten 3 Waschschrte mit PTW (jeweils 10 Minuten) und eine einstündige Inkubation in 5 % (v/v) Ziegen Serum in PTW.

Für den immunfluoreszierenden Antigennachweis wurden die Embryonen oder Speicheldrüsen 1 Stunde in 5 % (v/v) Ziegen Serum in PTW geblockt und dann mit 200 µl entsprechendem (siehe 2.4) fluoreszenzgekoppelten sekundären Antikörper (Verdünnungen der sekundären Antikörper siehe Tabelle 2.16) für 2 Stunden im Dunkeln inkubiert. Es folgten 3 Waschschrte für 10 Minuten in PTW, wobei dem zweiten Waschschrte 10 µg/ml Hoechst 33342 (Sigma-Aldrich, 14533) zugegeben wurde. Die Dokumentation erfolgte entweder mit dem Epifluoreszenz-Mikroskop (Olympus BX 51, Olympus) mit dem für die Anregung des Fluorochroms benötigten Filtersatz oder mit dem konfokalen Laserscanmikroskop (Leica TSC SP5, Leica Microsystems). Für den immunhistochemischen Antigennachweis wurden die Embryonen oder Speicheldrüsen 2 Stunden mit dem entsprechenden biotinylierten sekundären

Antikörper (siehe Tabelle 2.16) in einer Verdünnung von 1:200 in PTW inkubiert und darauf folgend viermal 10 Minuten in PTW gewaschen. Die Signalverstärkung erfolgte mit dem Vectastain Elite ABC Kit Standard (Vector Laboratories, PK-6100) nach dem Protokoll des Herstellers. Darauf folgend wurden die Entwicklungsstadien und Organe in 500 µl PTW in ein Salznäpfchen überführt. Die Färbereaktion wurde durch die Zugabe von 20 µl DAB (3,3'-Diaminobenzidine, 25 mg/ml), 10 µl H₂O₂ (1 % (v/v) H₂O₂ in PTW) gestartet. Durch die Zugabe von 30 µl 1 % (w/v) CoCl₂ in PTW oder 30 µl 1 % (w/v) NiSO₄ in PTW konnte statt einer braunen auch eine graue Färbung erreicht werden. Nach dem Erreichen der gewünschten Signalintensität wurde die Färbelösung abgenommen und die gefärbten Entwicklungsstadien oder Organe in 70 % (v/v) Glycerin in PTW überführt. Die Dokumentation erfolgte mit dem Mikroskop (Olympus BX 51, Olympus) unter Einsatz von Differentialinterferenzkontrast.

Tabelle 2.16: Verdünnungen der verwendeten primären und sekundären Antikörpern (siehe 2.4)

Antikörper	Verdünnung
anti-PduTwist-8086 (Kaninchen)	1:100
anti-PduTwist-8087 (Kaninchen)	1:100
anti-Twist (Kaninchen)	1:2500
anti-Mef2 (Kaninchen)	1:500
anti-GFP (Kaninchen)	1:1000
anti-β-Galaktosidase (Maus)	1:1000
anti-Maus-IgG-Cy3	1:100
anti-Kaninchen-IgG-Cy2	1:40
anti-Kaninchen-IgG, biotinyliert	1:200
anti-Maus-IgG, biotinyliert	1:200

2.15.5 Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) und *in situ* Hybridisierung (ISH) an Embryonen und Larven von *Drosophila* mit DIG-markierten RNA-Sonden

2.15.5.1 Prähybridisierung und Hybridisierung

Hybridisierungslösung (HS)

50 % (v/v) Formamid (Roth, deionisiert, P040.11), 5x SSC, 50 µg/ml Heparin, 0,01 % (v/v) TweenTM20 (Sigma, P1379)

2x PTW:

2x PBS (pH = 7.5), 0,1 % (v/v) TweenTM20 (Sigma, P1379), sterilfiltrieren (0,2 µm, Nitrocellulose)

Die folgenden Arbeitsschritte wurden für fixierte Embryonen wie auch fixierte larvale und adulte Organe gleichermaßen durchgeführt. Nach Abziehen des Methanols wurden die Embryonen fünfmal 5 Minuten in PTW rehydriert und 20 Minuten in 4 % (w/v) Paraformaldehyd in PTW unter leichtem Schwenken zwischenfixiert. Nach drei Waschschritten in PTW (jeweils 5 Minuten) wurden die Keime kurz in einer 1:1 Mischung von Hybridisierungslösung und PTW inkubiert und dann mindestens eine Stunde bei 60 °C prähybridisiert. Am Ende der Inkubationszeit wurden 1 µl bis 5 µl nichtradioaktiv markierte Sonde (2.12.7.3) in 100 µl HS verdünnt (bei einer größeren Anzahl an Entwicklungsstadien in 200 µl) und 10 Minuten bei 80 °C denaturiert. Nachdem sich die Keime abgesetzt hatten, wurde der Überstand vorsichtig entfernt und die Hybridisierungslösung mit der verdünnten Sonde zugegeben. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 60 °C im Heizblock. Am folgenden Tag wurden die Embryonen dreimal 20 Minuten in 1 ml auf Hybridisierungstemperatur vorgewärmter HS und in 1 ml 50 % (v/v) HS in PTW für zwanzig Minuten bei 60 °C inkubiert. Durch zweimaliges Waschen in PTW wurden die Temperatur der Embryonen langsam auf Raumtemperatur angeglichen.

2.15.5.2 Detektion der nicht radioaktiv markierten Sonde

Detektionspuffer SB9.5:

100 mmol/l Tris-HCl (pH = 9,5), 100 mmol/l NaCl, 50 mmol/l MgCl₂, 0,1 % (v/v) Tween™20 (Sigma, P1379), 5 mmol/l Levamisol (Sigma, L9756)

BCIP-Lösung:

50 mg/ml 5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat (Roth, A155.1) in 100 % Dimethylformamid (Roth, CP79.1), Lagerung bei -20 °C im Dunkeln

NBT-Lösung:

75 mg/ml 4-Nitroblautetrazoliumsaz (Roth, 4421.3) in 70 % (v/v) Dimethylformamid (Roth, CP79.1), Lagerung bei -20 °C im Dunkeln

Die Detektion der DIG-markierten RNA-Sonde erfolgte über Immuno-Enzym-Assays, die beim kolorimetrischen Nachweis ein gefärbtes Präzipitat und beim fluoreszierenden Nachweis ein bei der entsprechenden Anregung fluoreszierendes Präzipitat bilden.

Um unspezifische Bindungen des anti-DIG-Antikörpers an Proteinepitope von *Drosophila* zu minimieren, wurden in der Zwischenzeit Wildtypembryonen zwei Stunden mit anti-DIG-AP (kolorimetrischer Nachweis) oder anti-DIG (fluoreszierender Nachweis) in einer Verdünnung von 1:1000 präabsorbiert. Die Embryonen wurden mit dem entsprechenden präabsorbierten Antikörper über Nacht bei 4 °C auf dem Schüttler inkubiert und am nächsten Tag dreimal 20 Minuten in PTW gewaschen.

Ab hier unterscheiden sich die Protokolle für die verschiedenen Nachweismöglichkeiten und werden getrennt behandelt.

Zum kolorimetrischen Nachweis der RNA-Sonde wurden die Embryonen in ein Salznäpfchen überführt, zweimal 5 Minuten in SB9.5 äquilibriert und dann in die Färbelösung (4,5 µl NBT/ml SB9.5 und 3,5 µl BCIP /ml SB9.5) überführt. Der Fortschritt der Färbung wurde unter der Lupe überwacht. War die gewünschte Signalintensität erreicht wurde die Färbung durch dreimaliges Waschen in PTW (jeweils 5 Minuten) gestoppt. Die Embryonen wurden in 70 % (v/v) Glycerin in

PTW überführt. Die Dokumentation erfolgte mit dem Mikroskop (Olympus BX 51, Olympus) unter Einsatz von Differentialinterferenzkontrast.

Zum fluoreszierenden Nachweis der RNA-Sonde wurden die Embryonen dreimal 20 Minuten in PTW gewaschen und für 2 Stunden mit biotinylierten anti-Schaf-IgG, (2.4) in einer Verdünnung von 1:200 in PTW inkubiert. Nach drei Waschschritten in PTW (jeweils 20 Minuten) wurde die Signalverstärkung mit dem Vectastain Elite ABC Kit Standard (Vector Laboratories, PK-6100) durchgeführt. Hierzu wurden 10 µl A und 10 µl B mit 980 µl PTW gemischt und für eine halbe Stunde inkubiert. Die Embryonen wurden eine halbe Stunde mit dem konstituierten AB-Komplex inkubiert und dann dreimal 10 Minuten in PTW gewaschen. Die eigentliche Nachweisreaktion wurde mit dem TSA™ Cyanine 3 Tyramide Reagent Pack (PerkinElmer, SAT704A001EA) durchgeführt. Hierzu wurden die Embryonen mit 100 µl bis 200 µl einer 1:50 Verdünnung der TSA™ Cyanine 3 Tyramide in Amplifikation Diluent für eine halbe Stunde inkubiert und danach sechsmal 10 Minuten in PTW gewaschen. Die Dokumentation erfolgte entweder mit dem Epifluoreszenz-Mikroskop (Olympus BX 51, Olympus) mit dem Filtersatz U-MWIG3 (Olympus) oder mit dem konfokalen Laserscanmikroskop (Leica TSC SP5, Leica Microsystems).

2.15.6 Kutikulapräparate

0,7 % NaCl-Lösung

0,7 % (w/v) NaCl, 0,02 % (v/v) Triton™ X-100 (Sigma, X100)

Hoyer's Medium

30 g Gummi arabicum (sprühgetrocknet, Roth, 4159.1) über Nacht mit 50 ml H₂O gerührt. Am nächsten Tag wurden 200 g Chloralhydrat (Roth, K318.1) unter ständigem Rühren in kleinen Mengen zugegeben und schließlich die Mischung mit 20 g Glycerin versetzt

Die Kutikula wildtypischer *Drosophila*-Embryonen zeigt in jedem zukünftigen Segment eine Reihe Kutikularborsten oder Zähnchenreihen. In Kutikula-Präparaten von Embryonen, die für ein oder mehrere Gene mutant sind, lassen

sich oft Phänotypen durch eine abweichende Anordnung der Kutikularstrukturen, deren Fehlen oder vermehrtes Vorkommen erkennen (Jürgens *et al.*, 1984; Nüsslein-Volhard *et al.*, 1984; Wieschaus *et al.*, 1984).

Hierzu wurden nach der gewünschten Entwicklungszeit Embryonen mit einem angefeuchteten Pinsel von der Oberfläche von Apfelsaftagarflaschen abgesammelt und in Edelstahldrahtkörbchen übertragen. Nach gründlichem Waschen mit 0,7 % NaCl-Lösung wurde das Chorion unter Lupenkontrolle durch Inkubation in einer mit Reinstwasser 1:1 verdünnter Danklorix-Lösung (Colgate-Palmolive, Hamburg) entfernt. Die Fixierung erfolgte in einer frisch angesetzten Mischung aus Glycerin und Eisessig (1:4) für ca. 75 Minuten im Wärmeschrank (60 °C). Danach wurden die Embryonen mit einem feinen Pinsel direkt auf einen Objektträger mit Hoyer's Medium überführt und mit einem Deckgläschen bedeckt. Das Klären der Präparate erfolgte für mindestens 24 Stunden bei 60 °C im Wärmeschrank. Die Auswertung und Dokumentation erfolgte mit dem Mikroskop (Olympus BX 51, Olympus) unter Verwendung von Differentialinterferenzkontrast.

2.15.7 Histochemische X-Gal-Blaufärbung an *Drosophila* Embryonen

0,7 % NaCl-Lösung

0,7 % (w/v) NaCl, 0,02 % (v/v) Triton™ X-100 (Sigma, X100)

Fixierlösung für Embryonen

0,1 ml 0,1 mol/l NaHPO₄, pH = 7,4, 0,9 ml 25 % (v/v) Glutaraldehyd (Sigma-Aldrich, G5882), 5 ml Heptan

X-Gal-Färbelösung

10 mmol/l NaHPO₄, pH = 7,4, 50 mmol/l NaCl, 1 mmol/l MgCl₂, 3,1 mmol/l K₃[Fe(CN)₆], 3,1 mmol/l K₄[Fe(CN)₆], 0,3 % (v/v) Triton™ X-100 (Sigma, X100)

Die histochemische X-Gal-Blaufärbung benutzt man zum Nachweis von β -Galaktosidase-Fusionsgenen oder Promotorkonstrukten mit β -Galaktosidase-Aktivität. Die aktive β -Galaktosidase setzt X-Gal und die Färbelösung zu einem blauen Präzipitat um.

Hierzu wurden nach der gewünschten Entwicklungszeit Embryonen mit einem angefeuchteten Pinsel von der Oberfläche von Apfelsaftagarflaschen abgesammelt und in Edelstahldrahtkörbchen übertragen. Nach gründlichem Waschen mit 0,7 % NaCl-Lösung wurde das Chorion unter Lupenkontrolle durch Inkubation in einer mit Reinstwasser 1:1 verdünnter Danklorix-Lösung (Colgate-Palmolive, Hamburg) entfernt. Verbliebene Hypochloridlösung wurde durch mehrmaliges Waschen in 0,7 % NaCl-Lösung entfernt und die Embryonen an der Luft getrocknet. Hierbei wurde darauf geachtet, dass die Oberfläche der Entwicklungsstadien nicht „wellig“ wurde. Das Körbchen mit den entchorionisierten und getrockneten Entwicklungsstadien wurde in ein trockenes Blockschälchen gesetzt, die Heptanphase der Fixierlösung zugegeben und für 10 Minuten bei Raumtemperatur fixiert. Darauf folgend wurden die fixierten Embryonen auf Zellstoff trockengetupft und das Heptan aus den Maschen geblasen. Zur Färbung wurden die Edelstahldrahtkörbchen mit den Embryonen für eine Stunde entweder bei Raumtemperatur oder bei 37 °C in einer Mischung aus 1 ml Färbelösung und 25 µl 8 % (w/v) X-Gal (Roth, 2315.3) in DMF inkubiert. Wenn die Intensität der Färbung den gewünschten Grad erreicht hatte wurde mehrmals mit PBS gewaschen. Die Auswertung und Dokumentation erfolgte mit dem Mikroskop (Olympus BX 51, Olympus) unter Verwendung von Differentialinterferenzkontrast.

2.16 Sequenzanalytische und phylogenetische Methoden

2.16.1 Sequenzanalyse

Die Sequenzen der von der Firma Seqlab Göttingen sequenzierten Proben (2.12.6) wurden durch einen (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>) BLASTX (Altschul *et al.*, 1997) mit anderen Aminosäuresequenzabfolgen in den Datenbanken des NCBI (National Center for Biotechnology Information) verglichen und identifiziert. Die weitere Bearbeitung und Analyse der Nukleinsäuresequenzen erfolgte mit dem Programm BioEdit (Hall, 1999). Mittels dieses Programms wurden

überlappende Sequenzen aligniert und vergleichend zu einer Gesamtsequenz (Contig) zusammengefügt.

2.16.2 Phylogenetische Analyse

Für die phylogenetische Analyse der klonierten cDNAs wurden aus den Datenbanken des NCBI die Aminosäuresequenzen der orthologen Proteine einer ausgewählten Anzahl von Spezies recherchiert und erhalten. Diese wurden zusammen mit der abgeleiteten Aminosäuresequenz des *Platynereis* Proteins mittels CLUSTALX (Thompson *et al.*, 1997) aligniert und auftretende Lücken entfernt. Teile dieser Alignments wurden mit dem Programm MEGA 3.1 (Kumar *et al.*, 2004) zur Erzeugung eines mit dem Neighbour-joining Algorithmus berechneten phylogenetischen Baumes benutzt.

3 Ergebnisse

Die Gene *twist* und *snail* wurden zuerst bei *Drosophila melanogaster* entdeckt und sind essentiell an der Spezifizierung mesodermaler Zellschicksale beteiligt (Simpson, 1983; Grau *et al.*, 1984; Leptin, 1991). Ortho- und Paraloge von *twist* und *snail* sind in vielen anderen Taxa, unter anderem auch bei Cnidariern (Spring *et al.*, 2000; Spring *et al.*, 2002), kloniert und charakterisiert worden. Es ist davon auszugehen, dass es sich um in der Evolution hoch konservierte Gene handelt. Die räumlichen und zeitlichen Expressionsmuster sind bei den analysierten Spezies allerdings sehr unterschiedlich, und die durchgeführten Untersuchungen beschränkten sich meist auf Vertreter der Deuterostoma und Ecdysozoa.

Die Klonierung der *Platynereis dumerilii twist* und *snail* cDNAs ermöglichte die entwicklungsbiologische Analyse dieser Transkriptionsfaktoren in einem ursprünglichen Vertreter der Lophotrochozoa. Zur Untersuchung der phylogenetischen Stellung von *Platynereis twist* und *snail* wurden phylogenetische Analysen der gewonnenen Sequenzdaten durchgeführt. Die räumliche und zeitliche Charakterisierung des Expressionsmusters erfolgte über RT-PCR-, Northern-Blot- und *in situ* Hybridisierungs-Analysen. Durch Cytochalasin B induzierten Furchungsarrest und RNAi vermittelte Analysen wurden *in vivo* Daten für eine funktionelle Untersuchung von *Platynereis twist* gesammelt.

Aufbauend auf diesen Ergebnissen wurde *Platynereis Twist* rekombinant exprimiert. Durch Immunisierung mit rekombinantem Protein wurden Pdu-Twist Antiseren hergestellt und an Entwicklungsstadien auf seine Spezifität geprüft.

Das GAL4/UAS-System ermöglicht eine ektopische Expression von beliebigen Genen zu beliebigen Zeitpunkten in *Drosophila melanogaster*. Um eine mögliche evolutive Konservierung der Twist-Funktion zu untersuchen, wurde *Platynereis twist* mit dem GAL4/UAS-System in *Drosophila twist* und *twist/snail*-Mutanten ektopisch exprimiert und die resultierenden Phänotypen analysiert.

3.1 Klonierung und Charakterisierung eines *Platynereis dumerilii twist* Homologs

3.1.1 Amplifizierung und Klonierung einer *Platynereis twist* cDNA

Alle bis jetzt identifizierten Twist Proteine enthalten in ihrer Aminosäuresequenz eine charakteristische bHLH-Domäne und ein hochkonserviertes sogenanntes WR-Motiv am C-Terminus (Spring *et al.*, 2000). Um ein Fragment der cDNA eines *Platynereis twist* Homologs zu amplifizieren bzw. zu klonieren, wurden die degenerierten Primer Twi3F und Twi3R entworfen. Ihre Sequenz codiert für Bereiche im bHLH-Motiv, die im Alignment der Twist Proteine anderer Spezies im Verlauf der Evolution konserviert worden sind. Durch Polymerasekettenreaktion mit diesen Primern und aus 48 Stunden RNA hergestellter cDNA als Matrize war es möglich ein 243 Bp großes Fragment zu klonieren (Pdtwi1.1), dessen Nukleinsäuresequenz eine hohe Homologie zu Sequenzen von anderen Twist Familienmitgliedern zeigte. Ausgehend von der Sequenzinformation dieses Fragmentes wurden die Primer PdTwiRACE F und PdTwiRACE R entworfen. Mit diesen Primern als genspezifischen Primern (GSP) konnte in einer 5'-RACE-Reaktion ein 632 Bp PCR-Fragment (Pd48.3, Sequenz im Appendix) und in einer 3'-RACE-Reaktion ein 1292 Bp großes PCR-Fragment (PdRACE7.1, Sequenz im Appendix) amplifiziert werden. Die Sequenzanalyse der beiden überlappenden RACE-Fragmente ermöglichte die Erstellung einer 1859 Bp großen, zusammenhängenden Nukleinsäuresequenz.

3.1.2 *Platynereis* Twist ist ein Mitglied der Twist Familie von bHLH-Transkriptionsfaktoren

Die weitere Analyse der Sequenz ergab zwischen Nukleotid 49 und einem TGA-Stopcodon bei Nukleotid 714 einen potentiellen offenen Leserahmen (ORF) von 666 Bp, der von einer 1,1 kBp großen nicht translatierten 3'-Region (3'-UTR) gefolgt wurde. Dieser große nicht translatierte 3'-Bereich ist charakteristisch für Gene, die ein Protein mit bHLH-Motiv codieren (Spring *et al.*, 2000). Der offene Leserahmen codiert für ein 222 Aminosäuren großes Polypeptid, das in der

BLASTX Analyse (Altschul *et al.*, 1997) eine große Homologie zu anderen bekannten Mitgliedern der Twist Familie zeigt. Diese Nukleinsäuresequenz stellt die cDNA des *P. dumerilii* Homologs von *twist* dar und wird im folgenden *Pdu-twist* (*Pdu-twi*) genannt. Polymerasekettenreaktion mit genomischer DNA als Matrize und der Primerkombination TwiFuF_cDNA und TwiFuR_cDNA, die beide die cDNA begrenzen, ergab ein Fragment von 1859 Bp, dessen Sequenz identisch mit der von *Pdu-twi* ist. Das *twist* Homolog von *Platynereis dumerilii* besitzt infolgedessen keine Introns in seiner genomischen Sequenz und *Pdu-twist* repräsentiert auch die Nukleinsäuresequenz des Gens.

A Pdu-Twi 222 Aminosäuren



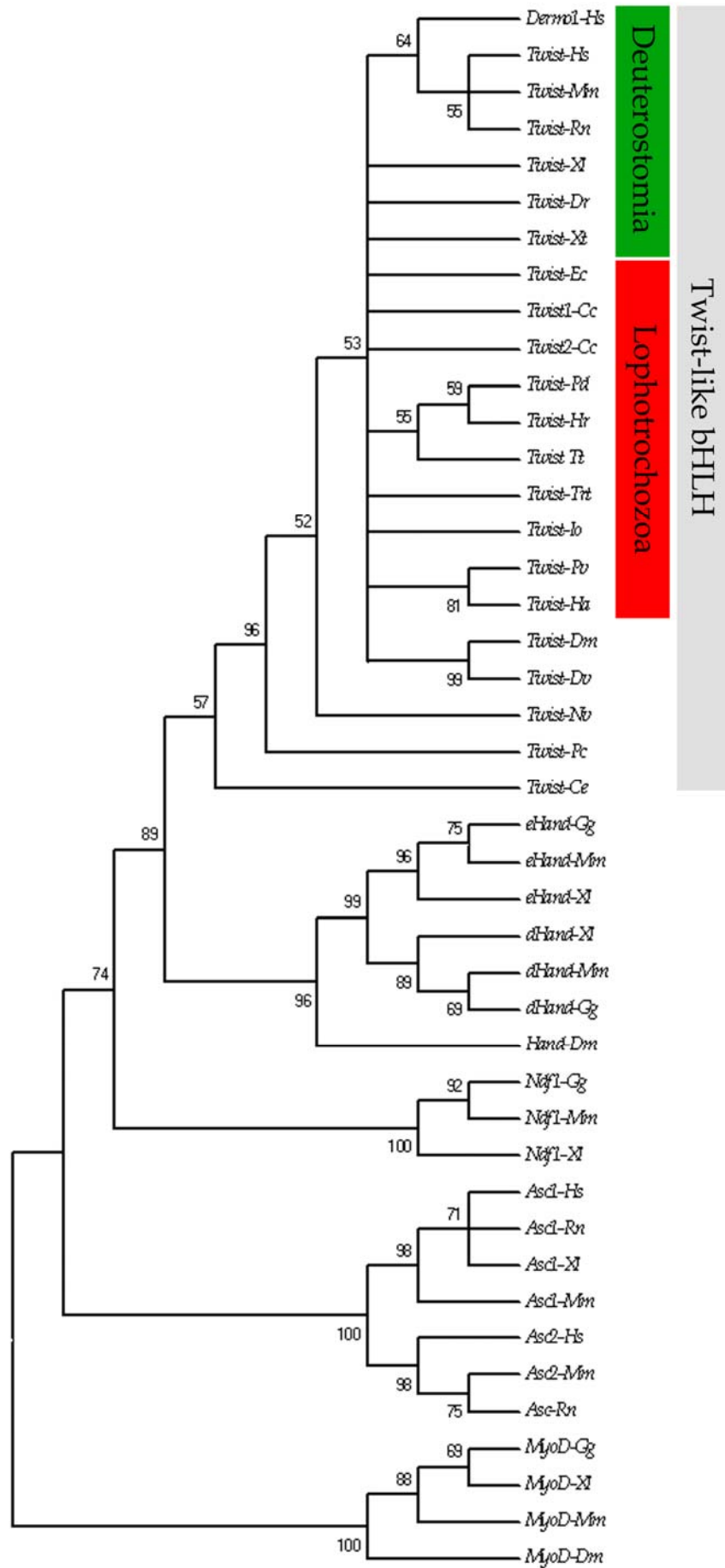
B

Twist-Pd	:LQNQRVLANVREERQRTQSLNDAFSAQLRKKIIPPLPSDKLSKIQLKLAATRYIDFLYQVLRD	: 178
Twist-Ec	:VHTQRVLANVREERQRTQSLNEAFAHLRKKIIPPLPSDKLSKIQLKLAATRYIDFLYQVLRD	: 226
Twist-Hr	:SLQQRVLANVREERQRTQSLNDAFSAQLRKKIIPPLPSDKLSKIQLKLAATRYIDFLYDQLENN	: 271
Twist-Tt	:QRVMANVREERQRTQSLNDAFTQLRFTIIPPLPSDKLSKIQLKLAATRYIDFLYQVLRND	: 58
Twist-Ha	:QRVMANVREERQRTQSLNDAFAQLRKKIIPPLPSDKLSKIQLKLAATRYIDFLYQVLRSD	: 58
Twist-Pv	:LQTQRVMANVREERQRTQSLNDAFAQLRKKIIPPLPSDKLSKIQLKLAATRYIDFLYQVLRSE	: 141
Twist-Xl	:LQSQRVMANVREERQRTQSLNEAFSSLRKKIIPPLPSDKLSKIQLKLAATRYIDFLCQVLRSD	: 130
Twist-Dr	:LQTQRVMANVREERQRTQSLNEAFASLRKKIIPPLPSDKLSKIQLKLAATRYIDFLCQVLRSD	: 135
Twist-Mm	:LQTQRVMANVREERQRTQSLNEAFAALRKKIIPPLPSDKLSKIQLKLAATRYIDFLYQVLRSD	: 170
Twist-Hs	:LQTQRVMANVREERQRTQSLNEAFAALRKKIIPPLPSDKLSKIQLKLAATRYIDFLYQVLRSD	: 166
Twist2-Hs	:LQSQRILANVREERQRTQSLNEAFAALRKKIIPPLPSDKLSKIQLKLAATRYIDFLYQVLRSD	: 124
Twist-Ce	:VQRACANRREERQRTKELNDAFTLLRKLIPSPMDKMSKIHLRLIATDYISFLDEMQRNG	: 78
Twist-Dm	: PSKTEETDEFSNQRVMANVREERQRTQSLNDAFKSLQQIIPPLPSDKLSKIQLKLAATRYIDFLCRMSSS	: 420
Twist-Pc	:THRVLANIREERQRTQALNQSFTSLRKKIIPPLPSDKLSKIQLRLAAMYIDFLRHVIRRG	: 109
Twist-Pd	: DASLVADHKLIPP.....SCSYVAHERLSYAFSVWRMEGAW.....M	: 216
Twist-Ec	: D....MEMKMP.....SCGYVAHERLSYAFSVWRMEGAWN.....N	: 259
Twist-Hr	: KQQQQHQHQHQHQHQHS.....MDEFANGGYVSGLNGSPVSSDKLGYAFSVWRMEGAWQ.....M	: 327
Twist-Tt	: D...ILSDSKMS.....SCNYVASERLSYAFSVWRMEGE.....	: 89
Twist-Ha	: Q....ADHKLST.....SCSYVASERLSYAFSVWRMEGE.....	: 88
Twist-Pv	: D....ADSKMVN.....SCSYMAHERLSYAFSVWRMEGA.....	: 171
Twist-Xl	: E....LDSKMA.....SCSYVAHERLSYAFSVWRMEGAW.....M	: 162
Twist-Dr	: E....LDSKMS.....SCSYVAHERLSYAFSVWRMEGAW.....M	: 167
Twist-Mm	: E....LDSKMA.....SCSYVAHERLSYAFSVWRMEGAW.....M	: 202
Twist-Hs	: E....LDSKMA.....SCSYVAHERLSYAFSVWRMEGAW.....M	: 198
Twist2-Hs	: E....MDNKMT.....SCSYVAHERLSYAFSVWRMEGAW.....M	: 156
Twist-Ce	: CKLYGHSIFDEK.....RGYNLQSAFNMWRGNGNYTPIAG	: 113
Twist-Dm	: DISLLKALEAQGPSAYGSASSLLSAAANGAEADLCLRKANGAPIIPPEKLSYLFVWRMEGDAQ.....H	: 487
Twist-Pc	: E....INMDSSD.....ETFSAQERLSYAFSVWRMEGDFYSRDK	: 145

Abbildung 3.1: (A) Schematische Darstellung von Pdu-Twist (B) Sequenz Alignment von *Platynereis* Twist mit Twist Proteinen anderer Spezies und Twist2-Hs (Dermo1-Hs) im Bereich der bHLH-Domäne und des WR-Motivs. Die größten Sequenzübereinstimmungen finden sich bei den Mitgliedern der Lophotrochozoa und der Vertebrata. **Abkürzungen:** Ce *Caenorhabditis elegans*, Dm *Drosophila melanogaster*, Dr *Danio rerio*, Ec *Enchytraeus coronatus*, Gg *Gallus gallus*, Ha *Helix aspersa*, Hr *Helobdella robusta*, Hs *Homo sapiens*, Mm *Mus musculus*, Pc *Podocoryne carnea*, Pd *Platynereis dumerilii*, Pv *Patella vulgata*, Tt *Transennella tantilla*, Xl *Xenopus laevis*.

Die vom offenen Leserahmen abgeleitete Aminosäuresequenz von Pdu-Twist besitzt zwischen den Aminosäuren 121 und 175 ein basisches DNA-bindendes und dimerisierendes Sequenzmotiv und ein C-terminales Motiv, das charakteristisch für die Mitglieder der Twist Familie ist (Abbildung 3.1 A), anderen Familien von bHLH Transkriptionsfaktoren aber fehlt. Nur in *D. melanogaster*, *H. robusta* und *C. elegans* Twist ist dieses Motiv nicht perfekt konserviert. Um die Beziehung von *Platynereis* Twist zu anderen Orthologen von Twist näher zu untersuchen, wurden die Sequenzen mit ClustalX (Thompson *et al.*, 1997) aligniert und die pairwise-similarity Werte berechnet. Die Analyse ergab, dass Pdu-Twist in seiner Sequenz die größte Übereinstimmung mit Mitgliedern der Twist-Familie aus den Stämmen der Lophotrochozoa (90-94 %) und Deuterostomia (89-90 %) besitzt. Die Sequenz des WR-Motivs (ERLSAYSVRMEG) entspricht derjenigen, die in fast allen Twist Orthologen zu finden ist (Abbildung 3.1 B). Eine mit dem Neighbour-Joining Algorithmus (Saitou und Nei, 1987) durchgeführte phylogenetische Analyse der Aminosäuresequenz der bHLH-Domäne von Pdu-Twist im Vergleich zu anderen Mitgliedern der Twist Familie und anderen Proteinen mit bHLH-Domäne, zeigte eine deutliche Clusterbildung von Pdu-Twist mit Proteinen, die durch *twist* und seine Orthologen kodiert werden. Andere Proteine, die ebenfalls eine bHLH-Domäne besitzen und die zur Vergleichsanalyse herangezogen wurden, grenzten sich deutlich von diesem Twist-like Cluster ab und bildeten eigene Cluster (Abbildung 3.2). Es handelt sich folglich bei Pdu-Twist um ein Mitglied der Twist-like Familie von bHLH-Transkriptionsfaktoren. Innerhalb des Clusters gruppiert sich Pdu-Twist bei den Lophotrochozoa und dort bei den Anneliden *Tubifex*, und *Helobdella* ein.

Abbildung 3.2 (nächste Seite): Neighbour-Joining Analyse der bHLH-Region von Pdu-Twist im Vergleich mit anderen bHLH-Proteinen. Die Bootstrap-Werte beruhen auf 1000 Replikationen und Äste mit einem Bootstrap-Wert < 50 % wurden kollabiert. Pdu-Twist clustert mit den anderen bekannten Twist Orthologen und dieser Cluster ist deutlich von den Clustern, die durch die anderen bHLH-Proteinfamilien gebildet werden zu unterscheiden. **Abkürzungen:** Cc *Capitella capitata*, Ce *Caenorhabditis elegans*, Dm *Drosophila melanogaster*, Dv *Drosophila viridis*, Dr *Danio rerio*, Ec *Enchytraeus coronatus*, Gg *Gallus gallus*, Ha *Helix aspersa*, Hr *Helobdella robusta*, Hs *Homo sapiens*, Mm *Mus musculus*, Pc *Podocoryne carnea*, Pd *Platynereis dumerilii*, Pv *Patella vulgata*, Rn *Rattus norvegicus*, Tt *Tubifex tubifex*, Trt *Transenella tantilla*, Xl *Xenopus laevis*



3.1.3 Die *Platynereis twist* mRNA ist schon in unbefruchteten Eizellen nachzuweisen und wird in allen Entwicklungsstadien exprimiert

Die genaue Kenntnis des zeitlichen und räumlichen Expressionsmusters ist eine unabdingbare Voraussetzung für die nähere Charakterisierung der entwicklungsbiologischen Funktion eines Gens.

Zur Erstellung eines zeitlichen Expressionsprofils und zur Abschätzung der Transkriptionsintensität von *Pdu-twist* zum jeweiligen Entwicklungszeitpunkt wurden RT-PCR und Northern Blot Analysen (Abbildung 3.3) durchgeführt. Die RT-PCR wurde zeitgleich mit für *Pdu-twist* spezifischen Primern und mit für *Pdu-actin* spezifischen Primern durchgeführt. Die jeweiligen Reaktionsansätze wurden mit derselben cDNA als Matrize und denselben Reaktionskomponenten durchgeführt. Durch einen Vergleich der relativen Amplifikationsintensitäten von *Pdu-twist* und *Pdu-actin* konnte eine Aussage über die Transkriptionsintensität von *Pdu-twist* gegeben werden.

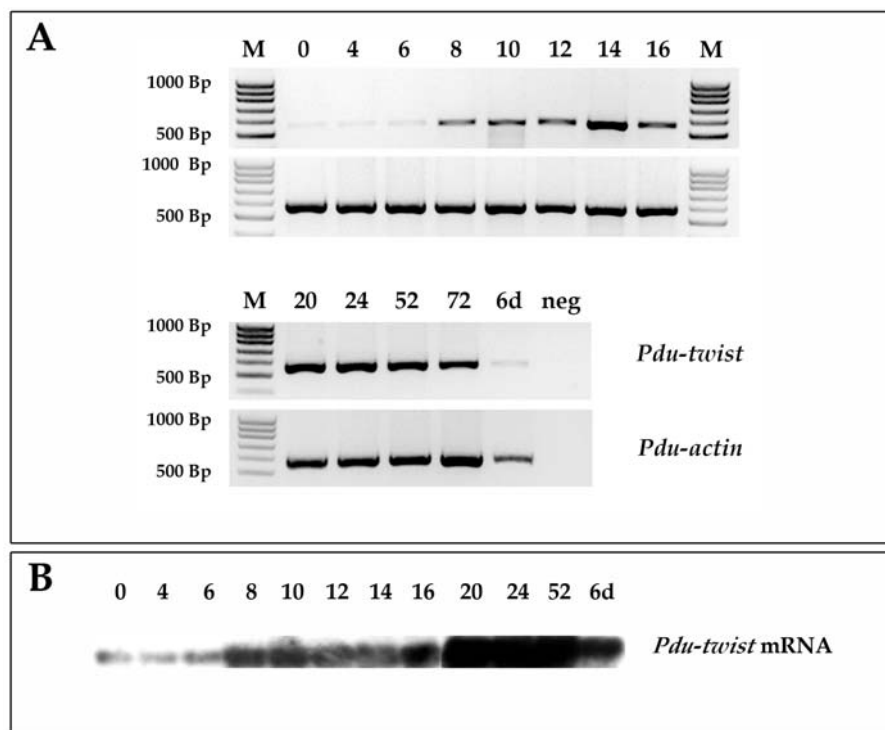


Abbildung 3.3: Die *Pdu-twist* Expression im Verlauf der Platynereisentwicklung. (A) RT-PCR Analyse von *Pdu-twist*. RT-PCR mit für *Pdu-twist* spezifischen Primern (oben) und *Pdu-actin* spezifischen Primern (unten). **(B)** Northern Blot Analyse der *Pdu-twist* Expression **Abkürzungen:** M 100 bp Ladder (Genecraft, GC-015-004), 0 unbefruchtete Eizellen, 4-72 Anzahl der Stunden nach der Befruchtung, 6d 6 Tage alter Jungwurm, Bp Basenpaare, neg Negativkontrolle ohne cDNA.

Die Northern Blot Analyse wurde mit Gesamt-RNA und dem 5'-RACE Fragment (3.1.1) als Nukleinsäuresonde durchgeführt. Sowohl die RT-PCR Analyse als auch die Northern Blot Analyse zeigen maternales Transkript in unbefruchteten Eiern und den darauffolgenden Stadien. Acht Stunden nach der Befruchtung ist die Midblastula Transition und das Einsetzen der zygotischen Transkription (Abbildung 3.3, 8) erfolgt. Es ist deutlich eine Aufregulierung der *Pdu-twist* Transkription zu beobachten und die *Pdu-twist* mRNA ist auch danach in allen untersuchten Stadien zu detektieren. Das Transkriptionsniveau steigt im Verlauf der weiteren Entwicklung zur Trochophora-Larve stetig an (Abbildung 3.3, 8-20). In der Trochophora-Larve und der Metatrochophora-Larve stabilisiert es sich auf einem konstant hohen Niveau. Ab 72 Stunden nach der Befruchtung, d.h. im Verlauf der Entwicklung zum dreisegmentigen Jungwurm, nimmt der relative Gehalt an *Pdu-twist* dann stetig ab (Abbildung 3.3, 24-6d).

3.1.4 Die Mesodermanlagen sich entwickelnder *Platynereis* Larven zeigen *Pdu-twist* Expression

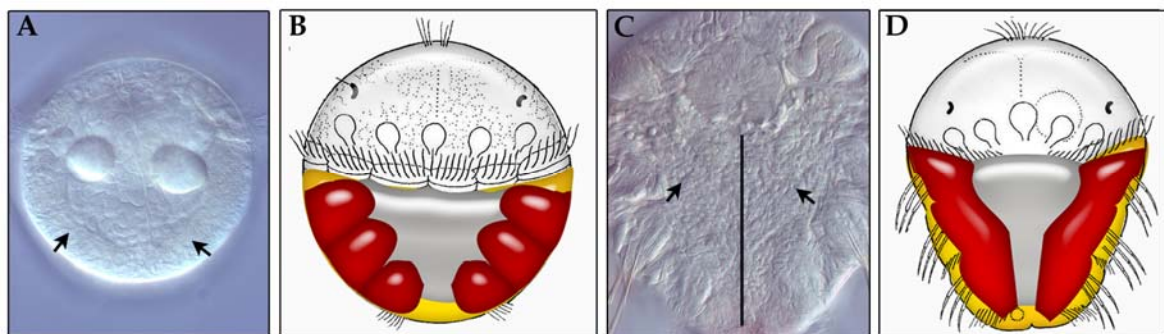


Abbildung 3.4: Trochophora und Metatrochophora von *P. dumerilii*. Lichtmikroskopische Aufnahmen mit Differentialinterferenzkontrast (DIK) von einer Trochophora (A) und einer Metatrochophora (C). Die Pfeile zeigen auf die Lokalisation der Mesodermanlagen. Entsprechende Schemazeichnungen mit den rot eingezeichneten Mesodermanlagen (B, D); Zeichnungen verändert nach Fischer (Fischer und Dorresteijn, 2004).

Zur Analyse der räumlichen Lokalisation der *Pdu-twist* Expression wurden *in situ* Hybridisierungen mit derselben Nukleinsäuresonde, die auch bei den Northern Blots zum Einsatz kam, durchgeführt. Hierbei konnte keine *Pdu-twist* Expression in Embryonen, die jünger als 20 Stunden waren nachgewiesen werden. Dies scheint ein methodisches Problem darzustellen, da sowohl die RT-PCR als

auch die Northern Blot Analysen andere Ergebnisse zeigen. Auch die Verwendung von *in situ* Hybridisierungsprotokollen anderer Spezies oder die Modifikation des vorhandenen *in situ* Hybridisierungsprotokolls erbrachte keine verwertbaren Ergebnisse. Das erste auswertbare Hybridisierungssignal trat mit dem Erreichen der Trochophora-Larve auf. Das präsumptive Mesoderm der *Platynereis* Larven besitzt eine Y-artige Form (Abbildung 3.4) und ist auf der dorsolateralen Seite der Larven lokalisiert (Dorresteiijn, 1990).

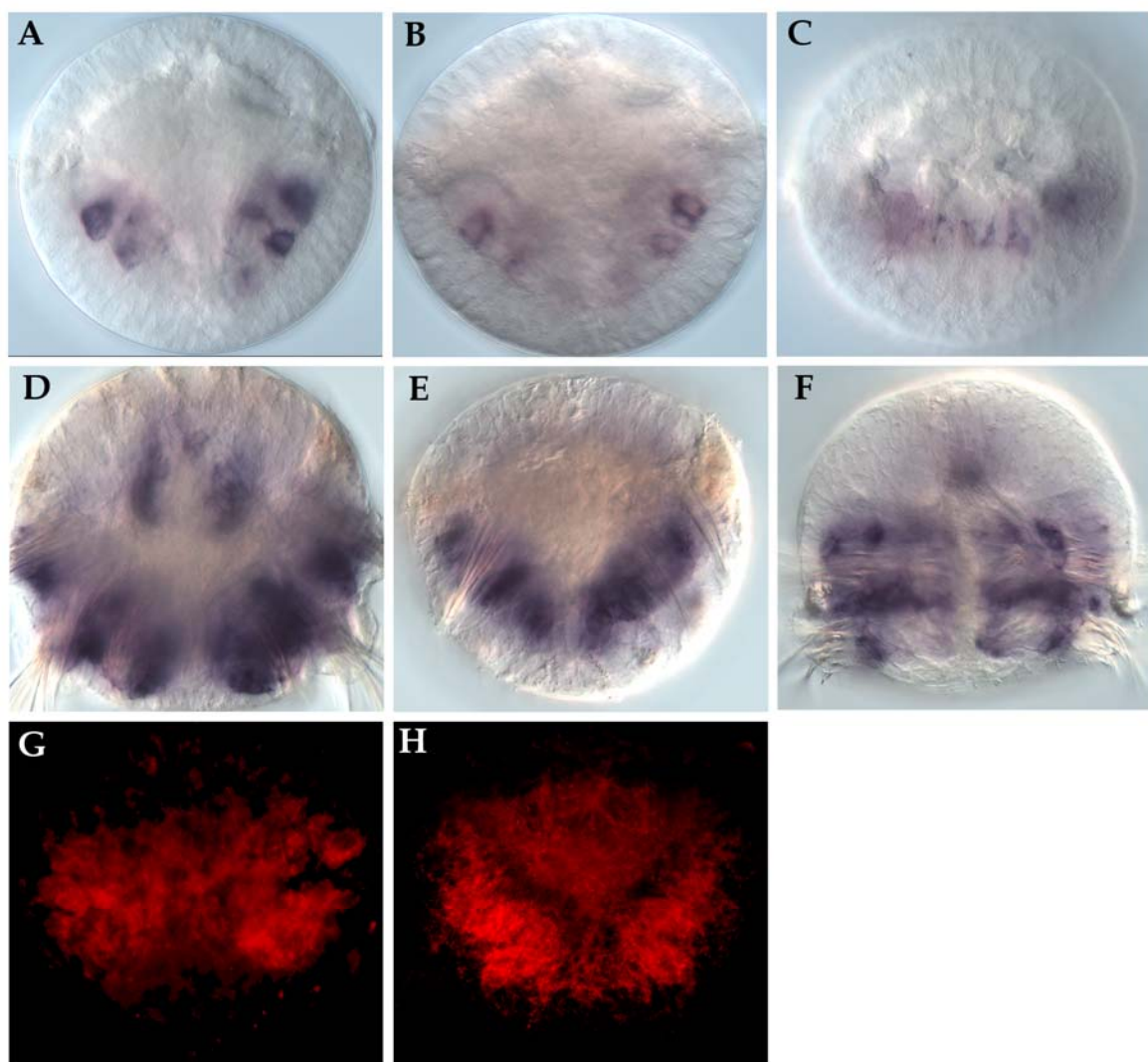


Abbildung 3.5: *In situ* Hybridisierung mit *Pdu-twist* (A-C) an 24 Stunden alten Trochophorae; (D-F) an 48 Stunden alten Metatrochophorae. (G, H) Projektionen konfokaler Bilderstapel von Fluoreszenz *in situ* Hybridisierungen mit *Pdu-twist* an einer Trochophora (G) und einer Metatrochophora (H). Das Hybridisierungssignal findet sich in den Mesodermanlagen der sich entwickelnden Larven. Bei den Metatrochophorae (G) sind zusätzliche Expressionsdomänen in den Hüllzellen des Stomodeums und in der Kopfregion (schwarze Pfeile) zu sehen. Ventrale (A, D), dorsale (B, E) und anteriore (C, F) Ansichten.

Die Expressionsdomänen von *Platynereis twist* in Trochophora- und Metatrochophora-Larven scheinen identisch mit den Mesodermanlagen der Larven zu sein (Abbildung 3.5). Neben den Expressionsdomänen in den Mesodermanlagen findet sich in den Metatrochophorae noch *Pdu-twist* Expression an der posterioren ventrocaudalateralen und später auch an der ventrocranialen und dorsocranialen Seite des Stomodeums. Es handelt sich hierbei wohl um die Hüllzellen des Stomodeums, die später in der Entwicklung die Schlundmuskulatur bilden, also um Vorläuferzellen der vegetativen Muskulatur. Eine weitere Expressionsdomäne findet sich in der Kopffregion. Hierbei handelt sich wahrscheinlich um die Vorläuferzellen der Retraktormuskulatur des Kiefers.

Zur genaueren Lokalisierung der Hybridisierungssignale wurden histologische Serienschritte aus in Araldit eingebetteten, *in situ* hybridisierten Larven angefertigt. Das Hybridisierungssignal ist sowohl in den Trochophorae (Abbildung 3.6 A, B), als auch in den Metatrochophorae (Abbildung 3.6 C-F) eindeutig in den Mesodermanlagen zu lokalisieren.

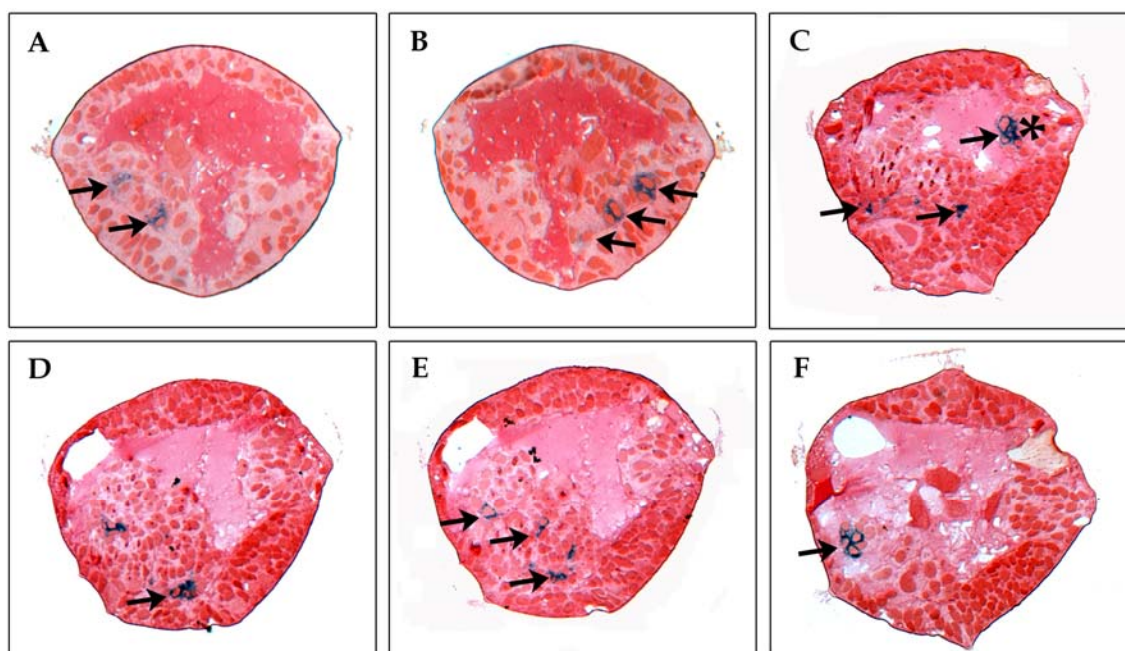


Abbildung 3.6: Histologische Analyse von *in situ* Hybridisierungen mit *Pdu-twist*. (A, B) Querschnitte einer Trochophora; (C-F) Sagittalschnitte einer Metatrochophora in verschiedenen Ebenen. Das Hybridisierungssignal (Pfeile) kann eindeutig in den Mesodermanlagen lokalisiert werden. In (C) kann man die Markierung der Hüllzellen des Stomodeums erkennen (Stern). Die Larven sind mit der Prätrochalregion nach oben hin orientiert.

Es handelt sich bei den markierten Zellen zum größten Teil um Zellen mit großem Zellkern, was auf mesenchymale Zellen mit geringem Determinations- oder Differenzierungsgrad hindeutet. Auch das Hybridisierungssignal in den, das Stomodeum umgebenden Hüllzellen, konnte histologisch bestätigt werden (Abbildung 3.6 C, Stern).

3.1.5 Eine Cell-lineage-Analyse ergibt einen Zusammenhang zwischen mesodermaler Zellspezifizierung und *Pdu-twist* Expression

Nach Vollendung des 16-Zellstadiums werden die Teilungszyklen von *Platynereis* deutlich asynchron. Zu einem Zeitpunkt, an dem andere Blastomeren noch einen Teilungszyklus zurückliegen, teilt sich die Makromere 3D in die Makromere 4D und die relativ großvolumige Mikromere 4d. Die Zelle 4d und ihre Nachkommen 4d¹ und 4d² sind die Gründerzellen der mesodermalen Zelllinie von *Platynereis* (Dorresteijn, 1990; Ackermann *et al.*, 2005).

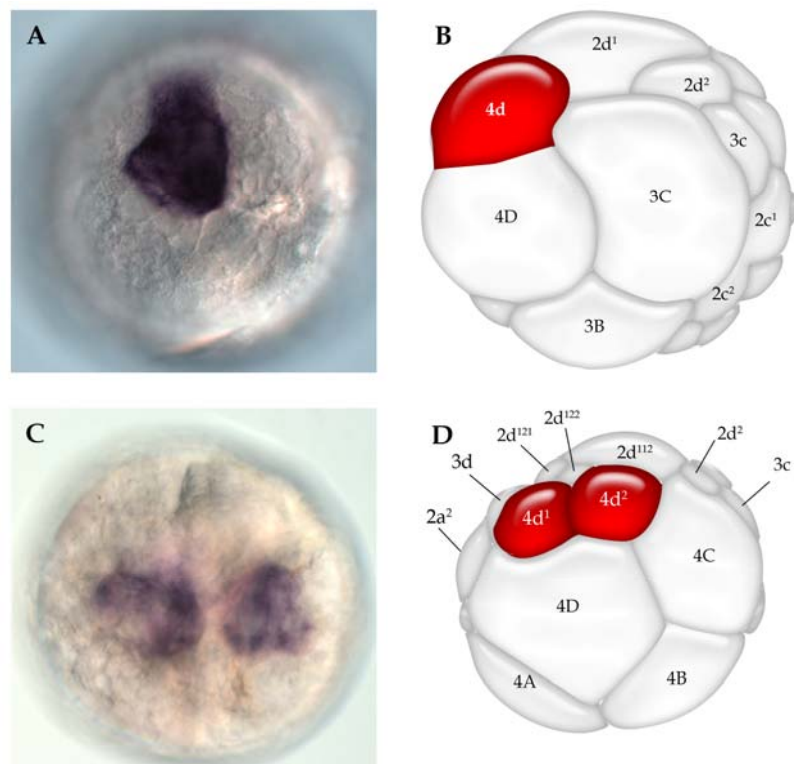


Abbildung 3.7: In situ Hybridisierung mit *Pdu-twist* an furchungsarretierten Embryonen. (A) Bei der Bildung von 4d arretierter Embryo. **(C)** Nach der Bildung von 4d¹ und 4d² arretierter Embryo. Beide Embryonen sind 24 Stunden alt und zeigen ein starkes Hybridisierungssignal in 4d **(A)** oder 4d¹ und 4d² **(C)**. **(B,D)** Schemazeichnungen der entsprechenden Entwicklungsstadien; Zeichnungen verändert nach Dorresteijn (Dorresteijn, 1990)

Durch Cytochalasin B Behandlung kann man in sich entwickelnden Embryonen einen Furchungsarrest auslösen, also die Cytokinese unterdrücken während die Karyokinese fortgesetzt wird. Die so arretierten Blastomeren sind vielkernig und enthalten die Kerne, sowie die Transkripte ihrer jeweiligen Ausgangszelllinie. Mit Cytochalasin B zum Zeitpunkt der Bildung von 4d oder von 4d¹ und 4d² furchungsarretierte *Platynereis* Embryonen zeigen nach 24 Stunden Entwicklung ein starkes *Pdu-twist* Hybridisierungssignal in 4d oder den beiden Tochterzellen 4d¹ und 4d² (Abbildung 3.7), was die Schlussfolgerung zulässt, dass *Platynereis twist* in der mesodermalen Zelllinie exprimiert wird.

3.1.6 *Platynereis twist* wird in späteren Entwicklungsstadien in der posterioren mesodermalen Wachstumszone und im Mesoderm sich differenzierender Segmente exprimiert

Nach drei bis vier Tagen Entwicklung hat sich der *Platynereis* Embryo zum dreisegmentigen Jungwurm entwickelt, (Abbildung 3.8 A-D), der zu einer zum größten Teil benthischen Lebensweise übergeht. Während der postlarvalen Lebensphase bis zur epitoken Metamorphose werden stetig neue Segmente von einer Sprossungs- oder Wachstumszone im Pygidium des Jungwurms gebildet (Fischer und Dorresteyn, 2004).

Platynereis twist Expression kann in dreisegmentigen Jungwürmern sowohl im dorsalen Kopfbereich in der sich bildenden Retraktormuskulatur der Kiefer (Abbildung 3.8 B) und im ventralen Kopfbereich in der sich differenzierenden Schlundmuskulatur (Abbildung 3.8 C), als auch in der posterioren mesodermalen Wachstumszone (Abbildung 3.8 D) gefunden werden. Die Zellen dieser Wachstumszone entstammen der Zelllinie des Mesoblasten 4d (Ackermann *et al.*, 2005), der auch bei den Furchungsarrest-Experimenten mit Cytochalasin B (3.1.5) *Pdu-twist* Expression zeigte.

In subadulten Würmern ist die *Pdu-twist* Expression auf mesodermale Zellen in dem sich gerade aus der Wachstumszone differenzierenden, jüngsten Segment beschränkt. Hierbei scheint die Expression in den weiter caudal gelegenen Zellreihen lokalisiert zu sein (Abbildung 3.8 E, F).

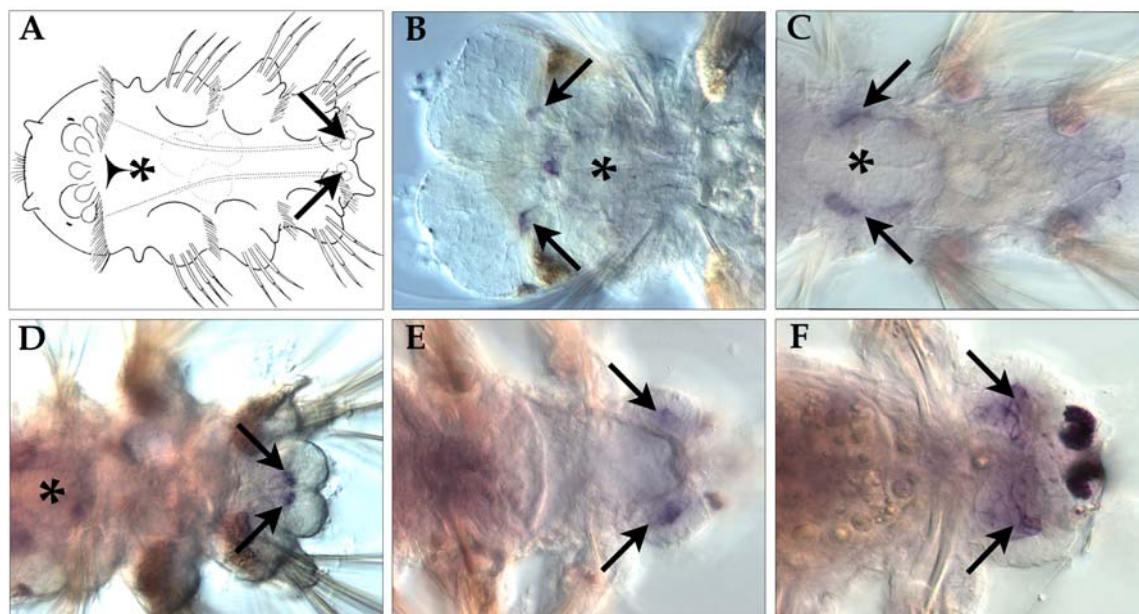


Abbildung 3.8: In situ Hybridisierung mit *Pdu-twist* an dreisegmentigen Jungwürmern (B-D) und sechs Tage alten subadulten Würmern (E, F). (A) Ventrale Schemazeichnung eines dreisegmentigen Jungwurms, der Stern markiert das Prostomium, die schwarzen Pfeile die Wachstumszone. (B) Dorsale Ansicht des Kopfbereichs. *Pdu-twist* Expression findet sich in den Retraktormuskeln des Kiefers und in der Hüllmuskulatur des Stomodaeums (C) Optischer Schnitt durch den Jungwurm. (D) Ventrale Ansicht des Jungwurms. (E, F) Verschiedene optische Ebenen der Wachstumszone des subadulten Wurms. Die Pfeile zeigen auf die Expressionsdomäne von *Pdu-twist*. Das Hybridisierungssignal findet sich in mesodermalen Zellen in dem sich gerade aus der Wachstumszone differenzierenden, jüngsten Segment. Zeichnung verändert nach Fischer und Dorresteijn (Fischer und Dorresteijn, 2004)

3.1.7 In Regeneraten wird *Platynereis twist* im Mesoderm sich differenzierender Segmente exprimiert

Subadulte *Platynereis dumerilii* besitzen die Fähigkeit, Segmente die am posterioren Ende amputiert wurden, zu regenerieren. Der Verlust der Segmente wird nach dem Wundverschluss durch die Bildung einer neuen Segmentproliferationszone kompensiert. Diese arbeitet umso schneller, je mehr Segmente amputiert wurden (Hofmann, 1966). Während des Regenerationsvorgangs werden neue Segmentanlagen in viel kürzeren Intervallen als bei der Normalentwicklung etabliert, so dass sich im sich bildenden Regenerat mehrere unterschiedlich weit differenzierte Segmente befinden. Die am weitesten differenzierten Segmente befinden sich hinter der Amputationstelle, während die als letzte gebildeten Anlagen anterior des Pygidiums lokalisiert sind.

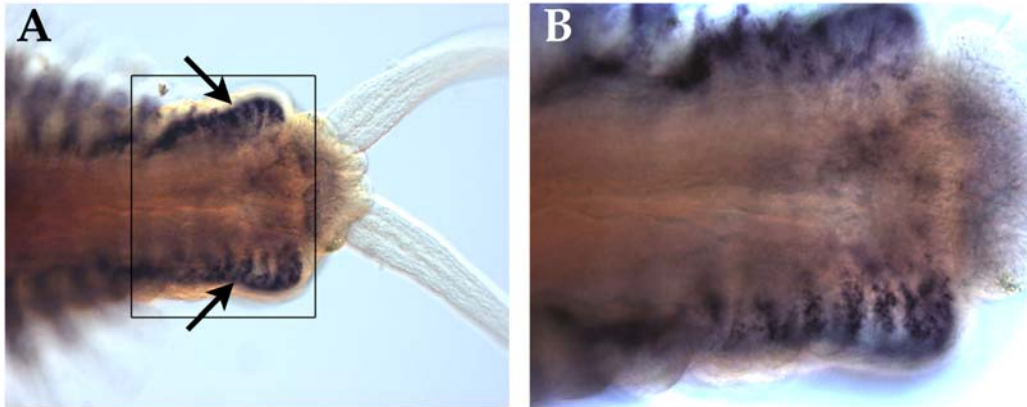


Abbildung 3.9: *In situ* Hybridisierung mit *Pdu-twist* an einer Woche alten posterioren Regeneraten von *Platynereis*. (B) zeigt eine Vergrößerung aus (A). Das Hybridisierungssignal ist in mesodermalen Zellen in den sich differenzierenden Segmenten lokalisiert (schwarze Pfeile). Jüngere Segmentanlagen zeigen eine stärkere Expression als schon weiter differenzierte Segmente.

Das *Pdu-twist* Hybridisierungssignal ist in den Regeneraten in mesodermalen Zellen, die sich in den sich differenzierenden Segmenten befinden, lokalisiert. Die jüngeren Segmentanlagen zeigen eine stärkere *Pdu-twist* Expression als die sich weiter anterior befindenden, weiter differenzierten Segmentanlagen (Abbildung 3.9 B).

3.1.8 Eine über parentale RNAi vermittelte funktionelle Analyse von *Pdu-twist* zeigt Phänotypen mit Gastrulationsdefekten

Das Prinzip der parentalen RNA Interferenz (pRNAi) wurde erstmals bei *Caenorhabditis elegans* beschrieben (Fire *et al.*, 1998) und wurde seither bei vielen eukaryotischen Tieren eingesetzt (Hutvagner und Zamore, 2002). Mit ihrer Hilfe ist es möglich durch die Injektion von dsRNA in die Gonaden eines Tieres, die Ziel-mRNA auch in den sich entwickelnden Embryonen selektiv zu degradieren.

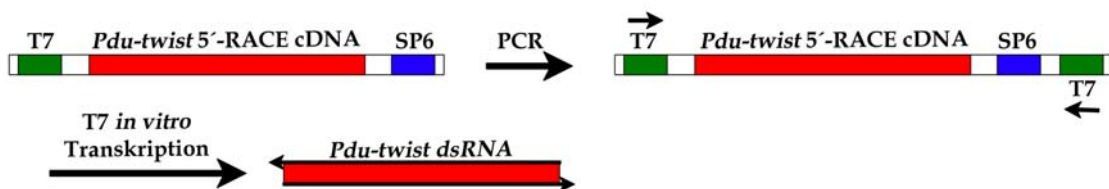


Abbildung 3.10: Synthesestrategie der *Pdu-twist* dsRNA. Ausgehend von der klonierten 5'-RACE cDNA wurde durch PCR mit SP6-T7 Primern ein Fragment mit 3' und 5' lokalisierten T7 Promotoren amplifiziert. Durch *in vitro* Transkription mit T7 Polymerase wurde *Pdu-twist* dsRNA synthetisiert.

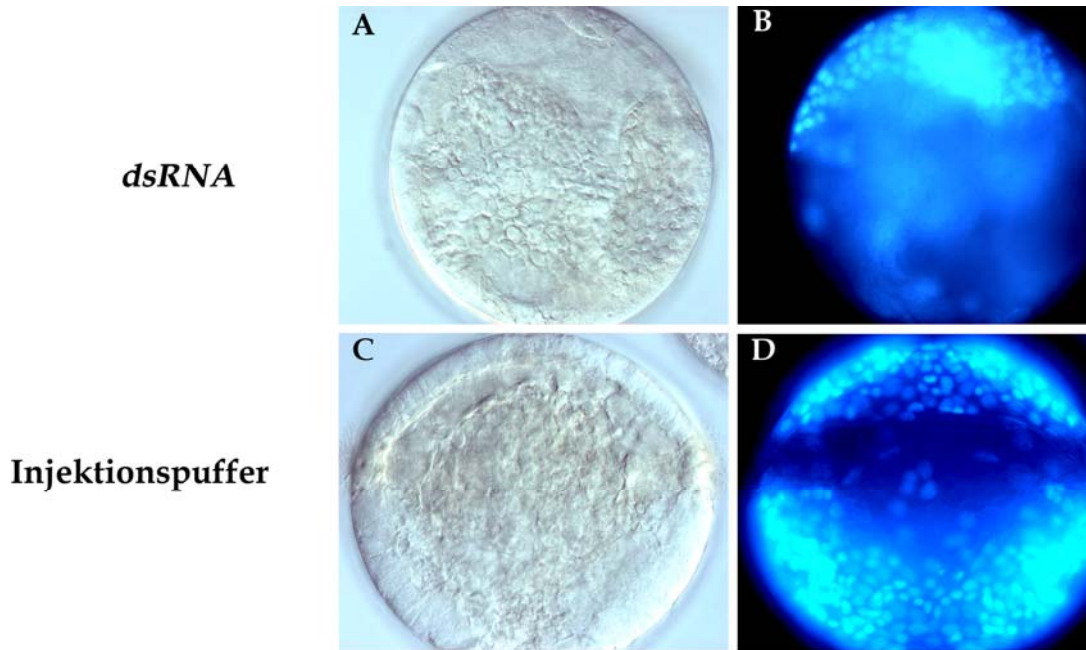


Abbildung 3.11: *Pdu-twist* pRNAi Phänotypen der Kategorie I zeigen schwere Gastrulationsdefekte. (A, B) Charakteristischer RNAi Phänotyp der Kategorie I. Die Mikromeren führen die epibolischen Gastrulationsbewegungen nicht aus. Die anhaltende Proliferation der Mikromeren unterbleibt ebenfalls. (C, D) Trochophora aus einem Gelege eines mit Injektionspuffer injizierten Weibchens. (A, C) DIK-Aufnahmen, (B, D) DAPI-Färbungen nach 24 Stunden Entwicklung.

Die Geschlechtsprodukte adulter *Platynereis* befinden sich nicht in definierten Gonaden, sondern flottieren in der Leibeshöhle. Durch die Injektion von doppelsträngiger *Pdu-twist* RNA in das Coelom adulter Weibchen und Kreuzung mit nicht injizierten Männchen war es möglich, embryonale Phänotypen zu induzieren, in denen kein *Pdu-twist* Transkript durch *in situ* Hybridisierung nachgewiesen werden konnte. Als Matrize für die Herstellung der dsRNA diente das 5'-RACE Fragment (Abbildung 3.10), das auch als Sonde für die als Kontrolle durchgeführte *in situ* Hybridisierung benutzt wurde. Durch die Injektion von *Pdu-twist* dsRNA in die Leibeshöhle geschlechtsreifer Weibchen ist es folglich möglich, auch in den sich aus dem Gelege entwickelnden Embryonen das *Pdu-twist* Transkriptionsniveau durch selektive Degradierung herunterzuregeln.

Die resultierenden Phänotypen der pRNAi Experimente lassen sich in drei Kategorien unterteilen:

Phänotypen der Kategorie I zeigen schwere Gastrulationsdefekte. Die Mikromeren, die normalerweise im Verlauf der epibolischen Gastrulation die Makromeren umschließen, führen in diesen Phänotypen keine geordneten

Gastrulationsbewegungen aus. Die während der epibolischen Gastrulation anhaltende Proliferation der Mikromeren unterbleibt ebenfalls. Embryonen aus Kontrollgelegen, bei denen die Weibchen mit Injektionspuffer injiziert wurden, besitzen deutlich mehr Zellen und zeigen eine korrekte Lokalisation der Nachfahren dieser Mikromeren (Abbildung 3.11).

Bei Phänotypen der Kategorie II (Abbildung 3.12 A, B) finden die epibolischen Gastrulationsbewegungen statt, aber die Zellen der mesodermalen Anlagen differenzieren und proliferieren nicht. Die Phänotypen der Kategorien I und II sind im Stadium der Trochophora letal.

Phänotypen der Kategorie III (Abbildung 3.12 D-F) entwickeln sich bis zum dreisegmentigen Jungwurm weiter, zeigen aber sowohl in der Achsenbildung, der Segmentierung, als auch bei der Morphogenese schwere Defekte. Es scheint, als würden das Mesoderm und seine Derivate nur unzureichend ausgebildet. Die Myogenese ist schwer beeinträchtigt.

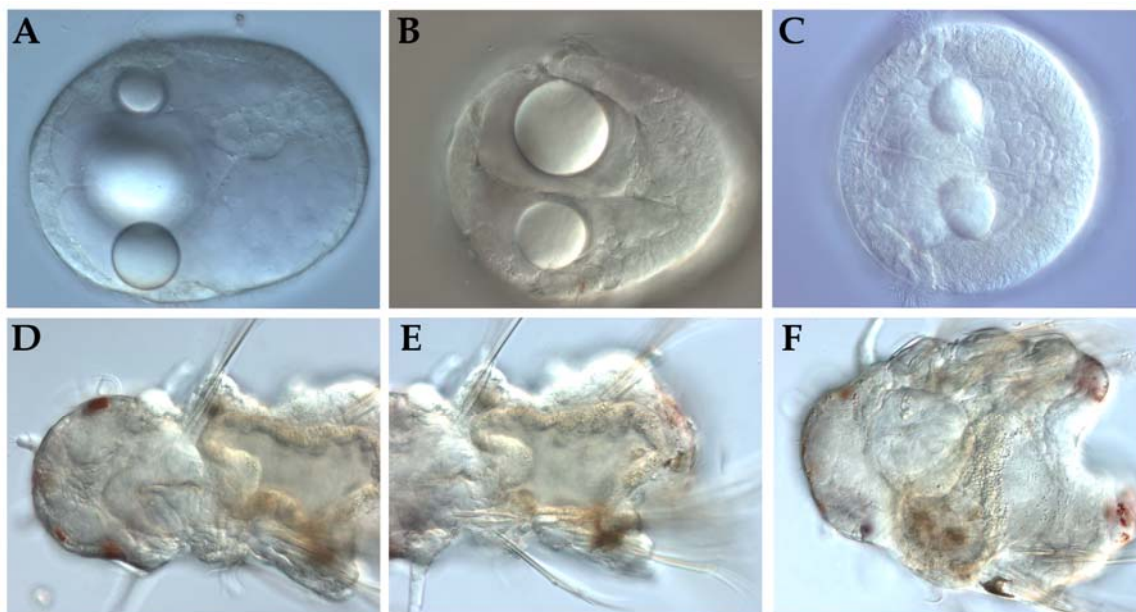


Abbildung 3.12: *Pdu-twist* RNAi Phänotypen der Kategorien II und III zeigen Defekte in der mesodermalen Differenzierung und in der Morphogenese. (A, B) Typische Vertreter der Kategorie II Phänotypen. Die epibolische Gastrulation hat stattgefunden, aber die mesodermalen Zellen differenzieren nicht. (C) Trochophora-Larve aus einem Kontrollgelege. (D-F) Eine Woche alte Phänotypen der Kategorie III. Diese entwickeln sich bis zum 3-segmentigen Jungwurm, zeigen aber bei der Segmentierung und Organogenese, insbesondere der Myogenese, schwere Defekte. (D, E) zeigen zwei unterschiedliche Aufnahmen desselben Phänotyps. (F) Phänotyp mit ektopischer Achseninduktion und verdoppelte Rumpfbildung. (A-F) dorsale Ansichten.

Das Auftreten und das prozentuale Verhältnis der verschiedenen Phänotyp Kategorien (I-III) in den jeweiligen RNAi-Experimenten zueinander variierte sehr stark, so dass eine statistische Auswertung nicht möglich war. Dies lässt sich durch eine stark variierende Penetranz der RNAi Methode bei *Platynereis* erklären.

Durch Injektion von *dsRNA* in das Blastem von regenerierenden Planarien (Sanchez Alvarado und Newmark, 1999) oder durch das Baden von amputierten Planarien in *dsRNA* (Orii *et al.*, 2003) ist es möglich spezifisch das Transkript für das die doppelsträngige RNA kodiert im Regenerationsblastem zu degradieren und die resultierenden Phänotypen zu analysieren.

Die Versuche durch Injektion von doppelsträngiger *Pdu-twist* RNA in das Blastem oder das Coelom regenerierender *Platynereis* eine RNAi in diesen auszulösen, zeigten keinen Effekt auf die Regenerationsleistung und die *Pdu-twist* Expression der injizierten Tiere. Sowohl das *Pdu-twist* Transkriptionsniveau als auch die Regenerationsleistung des Blastems blieben in den mit *Pdu-twist dsRNA* injizierten Tieren und den mit Injektionspuffer injizierten Tieren gleich und es konnte kein Einfluss der *dsRNA* Injektion auf die Mesodermbildung der regenerierten Segmente beobachtet werden.

3.2 Heterologe Expression von *Platynereis* Twist (Pdu-Twist) und Herstellung polyklonaler Antiseren gegen Pdu-Twist

Durch die Charakterisierung der zeitlichen und räumlichen Lokalisation von Pdu-Twist auf Proteinebene ist es möglich, die Widersprüche, die die Analyse der *Pdu-twist* Transkriptlokalisierung aufgeworfen hat, näher zu untersuchen. Hierzu wurde *Pdu-twist* heterolog in *Escherichia coli* exprimiert und durch die Immunisierung von Kaninchen mit dem isolierten, rekombinanten Pdu-Twist Protein Antiseren hergestellt.

3.2.1 Herstellung des Expressionsvektors pQE30-PduTwist

Der Vektor pQE-30 (Qiagen, Hilden) ist ein Expressionsvektor (2.2) mit einem IPTG-induzierbaren Promotor. Eine im Leserahmen des Vektors gerichtet einklonierte cDNA (Abbildung 3.13) wird nach der Induktion in *E. coli* potent als His-Fusionsprotein transkribiert und translatiert. Der N-terminal angefügte 6x His-Tag, eine Wiederholung von 6 Histidinen, ermöglicht die affinitätschromatographische Aufreinigung des Fusionsproteins an Nickelsäulen und den Nachweis des rekombinanten Proteins.

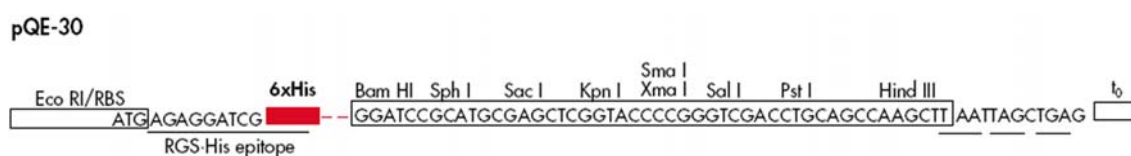


Abbildung 3.13: Die multiple Klonierungsstelle und der Leserahmen von pQE-30 (Qiagen, Hilden) © Qiagen. Eine im Leserahmen des Vektors gerichtet einklonierte cDNA wird nach der Induktion in *E. coli* potent als His-Fusionsprotein transkribiert und translatiert.

Da sich Teile des offenen Leserahmens von *Pdu-twist* sowohl auf dem 5'-RACE-, als auch auf dem 3'-RACE-Fragment (3.1.1) befanden und diese in ihrer Sequenz Überlappungen zeigen, war es möglich durch Fusions-PCR mit den Primern TwiFuF_cDNA, TwiFuR_cDNA und den 5'-RACE- und 3'-RACE-Fragmenten (3.1.1) als Matrize, die komplette *Pdu-twist* cDNA zu amplifizieren (Abbildung 3.14).

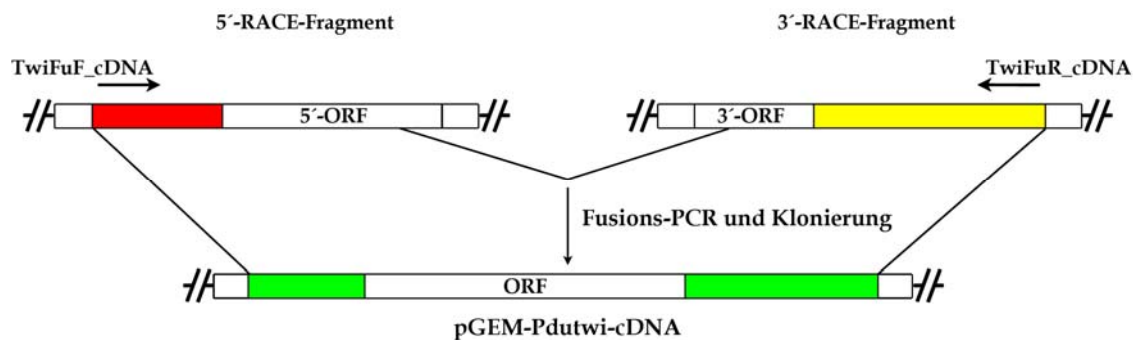


Abbildung 3.14: Fusions-PCR zur Klonierung der kompletten cDNA von *Pdu-twist*. Mit dem Primerpaar TwiFuF_cDNA und TwiFuR_cDNA war es möglich die überlappenden 5'- und 3'-RACE Fragmente zu der kompletten *Pdu-twist* cDNA zu fusionieren und in pGEM-T easy zu klonieren.

Das resultierende Fusionsamplifikat wurde in pGEM-T easy kloniert und der resultierende Vektor pGEM-Pdutwi-cDNA sequenziert. Die Sequenzanalyse ergab, dass durch die PCR und die Klonierung keine Artefakte in die Nukleinsäuresequenz eingebracht worden waren.

Die multiple Klonierungsstelle (Multiple Cloning Site, MCS) von pQE-30 enthält Schnittstellen für zwei Restriktionsenzyme (Abbildung 3.13), die keine Erkennungsstellen in der Nukleinsäuresequenz des *Pdu-twist* ORF besitzen. Es handelt sich hierbei um *Sac* I und *Hind* III.

Um den offenen Leserahmen von *Pdu-twist* für die Ligation mit kohesiven Enden zugänglich zu machen, wurde mit dem Primerpaar Pdu_twi_SacI/Pdu_twi_HindIII und pGEM-Pdutwi-cDNA als Matrize ein PCR-Fragment amplifiziert, das flankierend zur kodierenden Sequenz Schnittstellen für die Restriktionsenzyme *Sac* I und *Hind* III besitzt und dem das ATG-Startcodon des offenen Leserahmens fehlt. Dies ist notwendig, da der Expressionsvektor seinen eigenen Translationsstart besitzt und durch ein internes Startcodon verkürzte Fusionsproteine entstehen würden, die keinen 6x His-Tag besitzen.

Die Sequenzanalyse des in pGEM-T easy klonierten Amplifikats (Abbildung 3.15, pGEM-Pdutwi-ORF) ergab, dass durch die PCR und die Klonierung keine Artefakte in die Nukleinsäuresequenz eingebracht worden waren.

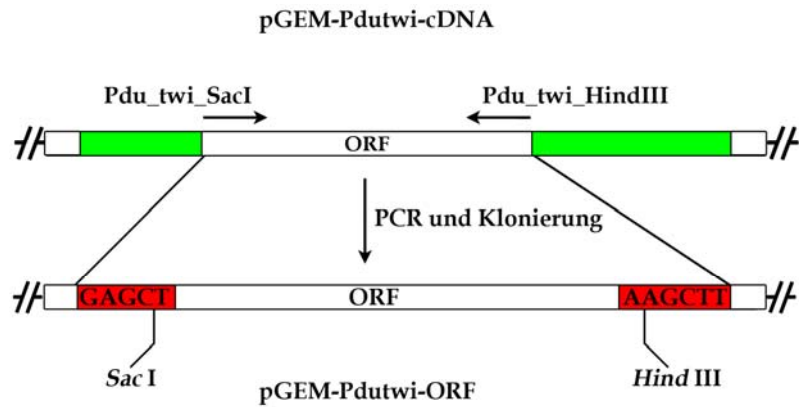


Abbildung 3.15: Amplifikation und Klonierung von pGEM-Pdutwi-ORF. Mit den Primern Pdu_twi_SacI und Pdu_twi_HindIII und pGEM-Pdutwi-cDNA als Matrize wurde ein PCR-Fragment amplifiziert, das flankierend zur kodierenden Sequenz Schnittstellen für die Restriktionsenzyme *Sac* I und *Hind* III besitzt und dem das ATG-Startcodon des offenen Leserahmens fehlt

Um den offenen Leserahmen von *Pdu-twist* gerichtet in den Leserahmen von pQE-30 einzubringen, wurden pGEM-Pdutwi-ORF und pQE-30 mit *Sac* I und *Hind* III restriktionsenzymatisch behandelt und das resultierende Pdutwi-ORF Restriktionsfragment und der geschnittene Expressionsvektor miteinander ligiert (Abbildung 3.16). Der klonierte Vektor pQE30-PduTwi wurde sequenziert.

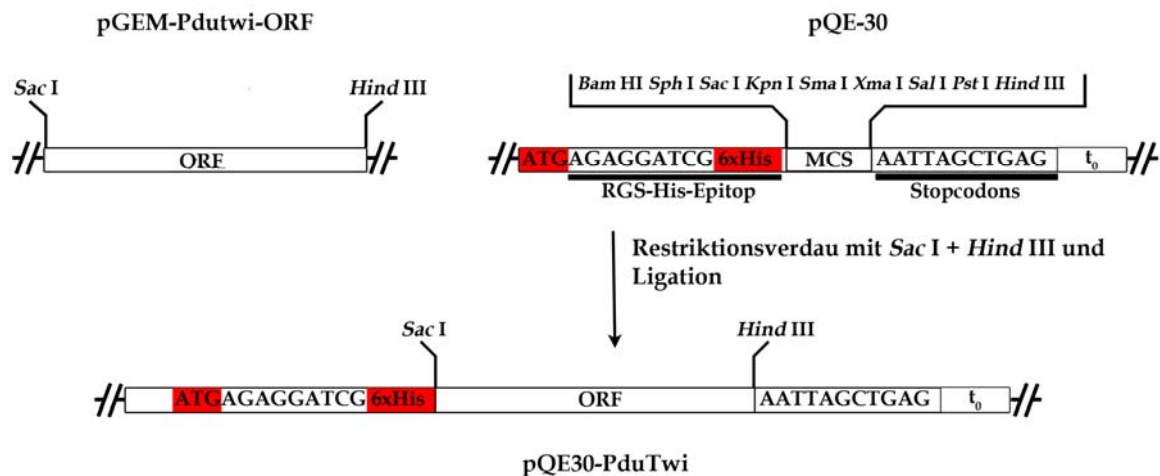


Abbildung 3.16: Klonierungsstrategie für den Expressionsvektor pQE30-PduTwi. Der offene Leserahmen von *Pdu-twist* (ORF) aus pGEM-Pdutwi-ORF wurde durch Restriktionsverdau mit *Sac* I und *Hind* III und nachfolgender Ligation gerichtet in den pQE-30 Leserahmen eingebracht. t₀ bezeichnet den Lambda t₀ Transkriptionsterminator.

Die Analyse der Nukleinsäuresequenz ergab, dass der Leserahmen von *Pdu-twist* durch die Ligation gerichtet in den Leserahmen des Expressionsvektors eingebracht wurde. Ebenfalls konnten in der Nukleinsäuresequenz des Leserahmens von pQE30-PduTwi keine erzeugten Artefakte detektiert werden.

3.2.2 Heterologe Expression von His-PduTwist

Die Expression von große Mengen rekombinanten Proteins mithilfe der pQE-30 Expressionsvektoren in *Escherichia coli* basiert auf dem T5-Promotor Transkriptions-Translations-System (Bujard *et al.*, 1987).

Das Promotor-Operator-Element besteht aus dem T5-Phagenpromotor, der von der *E. coli* RNA-Polymerase erkannt wird, und zwei *lac* Operatorsequenzen. Diese binden den *lac*-Repressor und unterdrücken die Transkription am T5-Promotor. Transformiert man pQE-30 in einen *E. coli* Stamm der die *lacI^q* Mutation besitzt und den Lac-Repressor überexprimiert, ist es möglich den Beginn der Transkription und Translation des rekombinanten Proteins präzise zu kontrollieren. Durch die Induktion mit Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG) wird der Lac-Repressor inaktiviert und die RNA-Polymerase beginnt mit der Transkription der stromabwärts gelegenen genetischen Elemente. Dies sind das RBSII-Element, eine Ribosomenbindestelle, der 6x His-Tag und die inklonierte cDNA. Das durch die darauffolgende Translation entstehende Fusionsprotein besitzt einen N-terminalen His-Tag und kann mit Antikörpern gegen dieses Epitop detektiert werden.

Der mit pQE30-PduTwist (3.2.1) transformierte Bakterienklon wurde bei Erreichen der logarithmischen Wachstumsphase mit 0,5 mmol/l IPTG oder 1,0 mmol/l IPTG induziert. Vor der Induktion und in definierten Zeitintervallen (120, 180 und 240 Minuten) nach erfolgter Induktion wurden Gesamtproteinextrakte gewonnen und auf das Vorhandensein von His-PduTwist durch SDS-PAGE und Western Blot Analyse untersucht (Abbildung 3.17).

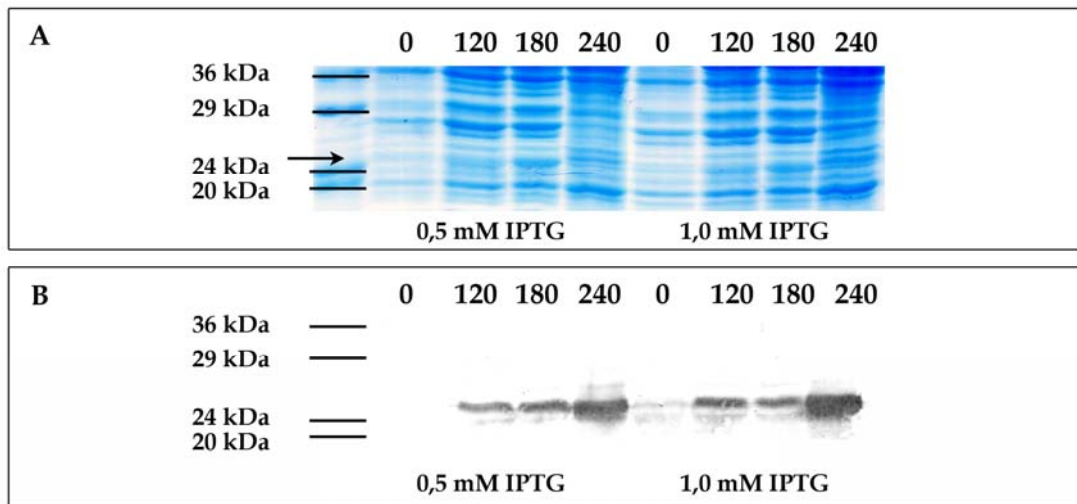


Abbildung 3.17: Heterologe Expression von His-PduTwist. (A) 12 % SDS-PAGE Gel und (B) Western Blot von Gesamtprotein aus mit pQE30-PduTwist transformierten und mit IPTG induzierten Bakterienkulturen zu verschiedenen Zeiten nach der Induktion. Die Detektion des His-Fusionsproteins erfolgte mit Anti-Penta-His (Qiagen, Hilden). 0 vor der Induktion 120-240 Minuten nach der Induktion. Nach der Induktion lässt sich eine Akkumulierung des ca. 26 kDa großen Fusionsproteins beobachten. Der Pfeil zeigt die ungefähre Position des Fusionsproteins im SDS-PAGE Gel.

Dieses sollte ein ungefähres Atomgewicht von 25,53 kDa besitzen (nach der Berechnung durch http://bioinformatics.org/sms/prot_mw.html) und im Western Blot der Proteinpräparationen mit einem Anti-His Antikörper nachzuweisen sein.

Bei den Präparationen aus nicht induzierten Bakterien, konnte keine oder nur ein geringe Expression eines solchen Proteins beobachtet werden, während in den auf die Induktion folgenden Stunden (120 Minuten bis 240 Minuten) eine stetige Zunahme eines rekombinanten Proteins mit dem passenden Molekulargewicht und einem im Western Blot zu detektierenden Signal in den Gesamtproteinextrakten beobachtet werden konnte. Dies stellte sich in den Coomassie-Blau gefärbten SDS-PAGE-Gelen nicht so deutlich dar wie im Western Blot. Eine Induktion mit 1,0 mmol/l IPTG scheint eine, wenn auch nur schwach ausgeprägte, potentere Transkriptionsinduktion darzustellen (Abbildung 3.17).

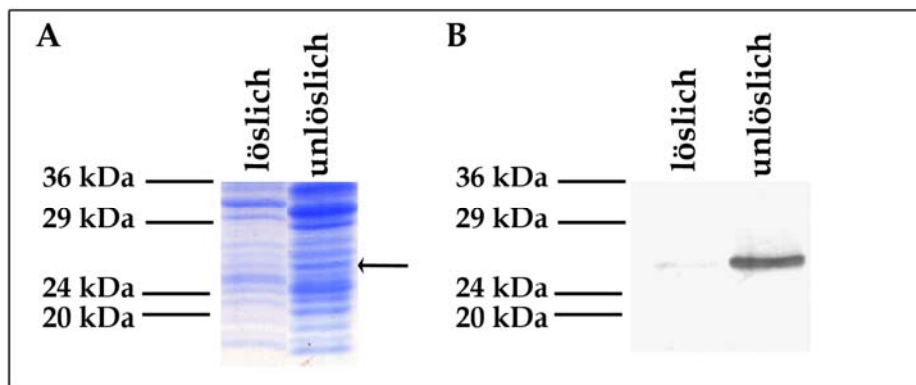


Abbildung 3.18: Rekombinantes His-PduTwist wird in *E. coli* in unlöslicher Form in Inclusion bodies eingelagert. (A) 12 % SDS-PAGE und (B) Western Blot Analyse von *E. coli*-Lysaten. Rekombinant exprimiertes His-PduTwist kann in nennenswerter Konzentration nur in der unlöslichen Fraktion von *E. coli*-Lysaten detektiert werden. Die Detektion des His-Fusionsproteins erfolgte mit Anti-Penta-His (Qiagen, Hilden). Die Induktion erfolgte mit 1,0 mmol/l IPTG und die Zellen wurden vier Stunden nach der Induktion geerntet.

Bei der heterologen Überexpression von Fusionsproteinen in Bakterien ist oft das Phänomen der Bildung von Einschlusskörpern, sogenannten „Inclusion bodies“, zu beobachten. Es handelt sich hierbei um Aggregate unlöslichen, rekombinanten Proteins, die im Cyto- oder Periplasma abgelagert werden (Strandberg und Enfors, 1991). Die Mechanismen, die zur Bildung von Einschlusskörpern führen, sind nur ansatzweise verstanden, dennoch kann aufgrund der Aminosäuresequenz des rekombinanten Proteins eine Vorhersage getroffen werden (Wilkinson und Harrison, 1991). Die Analyse ist online unter <http://www.biotech.ou.edu/> verfügbar.

Für His-PduTwist ergab sich eine Wahrscheinlichkeit von 91,4 %, dass das rekombinante, überexprimierte Protein in Einschlusskörper eingelagert werden wird. Die Analyse der löslichen und der unlöslichen Fraktionen aus Lysaten induzierter, pQE30-PduTwist rekombinanter *E. coli* mittels SDS-PAGE und Western Blot ergab, dass das Fusionsprotein in nennenswerter Konzentration nur in der unlöslichen Fraktion, also in Form von Einschlusskörpern, zu detektieren ist (Abbildung 3.18).

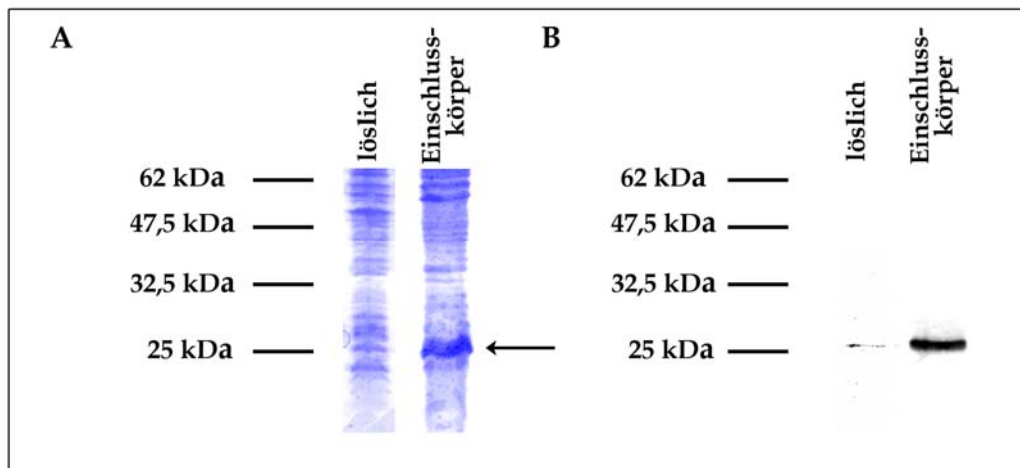


Abbildung 3.19: Rekombinant exprimiertes His-PduTwist lässt sich durch die Aufreinigung der Einschlusskörper anreichern. (A) 12 % SDS-PAGE und (B) Western Blot Analyse von *E. coli*-Lysat und aufgereinigten Einschlusskörpern. Durch die Aufreinigung erfolgt eine Anreicherung des rekombinanten Proteins. Die Detektion des His-Fusionsproteins erfolgte mit Anti-Penta-His (Qiagen, Hilden). Die Induktion erfolgte mit 1,0 mmol/l IPTG und die Zellen wurden vier Stunden nach der Induktion geerntet.

Eine Aufreinigung der Einschlusskörper ist mit Hilfe von Detergentien möglich (2.13.2). Eine SDS-PAGE der aufgereinigten Einschlusskörper zeigte ebenso wie die Western Blot Analyse eine deutliche Anreicherung des rekombinanten Proteins (Abbildung 3.19). Für eine Immunisierung enthält die Präparation aber nach wie vor zu viele Kontaminationen. Zur weiteren Aufreinigung wurden die Einschlusskörper in stark denaturierenden Puffern gelöst und His-PduTwist affinitätschromatographisch aufgereinigt.

3.2.3 Affinitätschromatographische Aufreinigung von His-PduTwist

His-Fusionsproteine können über Nickel-Chelat Affinitätschromatographie aufgereinigt werden (IMAC, Immobilized Metal Affinity Chromatography) (Porath *et al.*, 1975). Hierfür werden Chromatographiesäulen mit immobilisierten Ni²⁺-Ionen benutzt. Die Histidine der His-Fusionsproteine chelieren die Nickelionen und die Fusionsproteine werden selektiv auf der Säule gebunden.

Rekombinantes His-Fusionsprotein in *E. coli* Einschlusskörpern ist unlöslich in Salzlösungen oder nicht-ionischen Detergentien. Um die Proteine in Lösung zu bekommen, ist meistens eine vollständige Denaturierung notwendig.

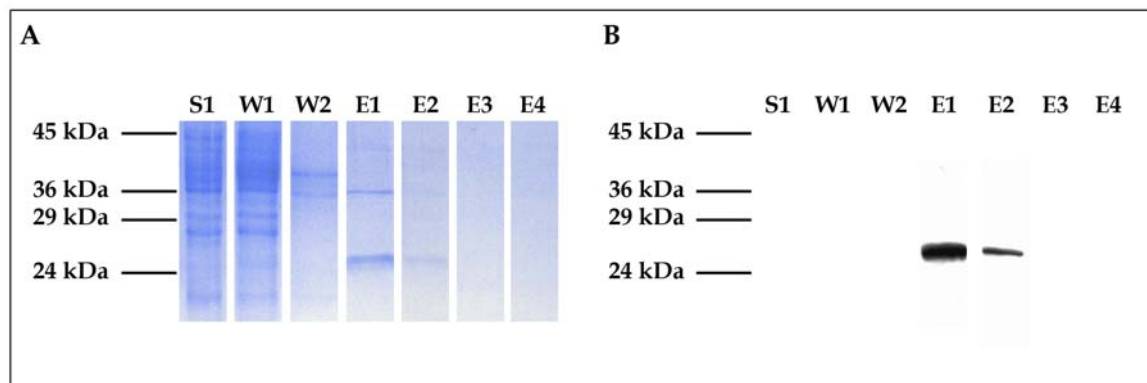


Abbildung 3.20: Chromatographische Aufreinigung von His-PduTwist durch Nickel-Chelat Affinitätschromatographie (IMAC) aus solubilisierten Einschlusskörpern. (A) 12 % SDS-PAGE und (B) Western Blot Analyse der gesammelten Fraktionen (S1-E4). S1 Säulendurchlauf nach dem Auftrag der Probe, W1-W2 Waschfraktionen, E1-E4 Elutionsfraktionen. His-PduTwist konnte in den ersten beiden Elutionsfraktionen aufgereinigt werden. Die Detektion des His-Fusionsproteins erfolgte mit Anti-Penta-His (Qiagen, Hilden).

Nach der Chromatographie wurden die Fusionsproteine mit Imidazol eluiert und Elutionsfraktionen mit jeweils 5 ml Elutionsvolumen gesammelt. Der Säulendurchlauf der aufgetragenen Probe, die Waschfraktionen und die Elutionsfraktionen wurden durch SDS-PAGE und Western Blot Analyse auf das Vorhandensein von His-PduTwist untersucht. Rekombinantes Fusionsprotein lässt sich sowohl im Polyacrylamidgel als auch im Western Blot nur in den ersten beiden Elutionsfraktionen nachweisen (Abbildung 3.20).

Das aufgereinigte His-PduTwist liegt in den Eluaten in denaturierter und biologisch inaktiver Form vor und muss vor der Immunisierung gegen absteigende Konzentrationen von Harnstoff dialysiert werden. Zur Aufreinigung von His-PduTwist für die Immunisierung wurden die ersten beiden Elutionsfraktionen vereinigt und dialysiert.

3.2.4 Herstellung polyklonaler Antiseren gegen Pdu-Twist

Durch die Injektion von Antigenen in Kaninchen kann eine polyklonale IgG Immunantwort gegen das Antigen hervorgerufen werden. Durch mehrfache Immunisierung mit dem Antigen kann man die Antikörper gegen das injizierte Antigen anreichern und durch Exsanguation der Tiere die Immunsere gewinnen.

Zwei Kaninchen wurden durch die Firma Peqlab mehrfach mit dem dialysierten Fusionsprotein His-PduTwist immunisiert und die Immunsereen Anti-Pdu-Twist-6067 und Anti-Pdu-Twist-6068 gewonnen.

3.2.5 Western Blot Analyse der Immunsereen Anti-Pdu-Twist-6067 und Anti-Pdu-Twist-6068

Die gewonnenen polyklonalen Immunsereen Anti-Pdu-Twist-6067 und Anti-Pdu-Twist-6068 wurden durch Western Blot Analysen verschiedener Gesamtproteinextrakte auf ihre Spezifität hin untersucht.

3.2.5.1 Anti-Pdu-Twist-6067 und Anti-Pdu-Twist-6068 detektieren rekombinant exprimiertes Pdu-Twist

Die polyklonalen Antiseren wurden durch Immunisierung von Kaninchen mit rekombinant exprimierten aufgereinigten PduTwist gewonnen (3.2.4). Dieses wird im Western Blot sowohl durch Anti-Pdu-Twist-6067, als auch durch Anti-Pdu-Twist-6068 als spezifisches Signal detektiert (Abbildung 3.21 B).

3.2.5.2 Anti-Pdu-Twist-6067 und Anti-Pdu-Twist-6068 detektieren in Drosophila ektopisch überexprimiertes Pdu-Twist

Mithilfe des GAL4-Systems ist es möglich ein spezifisches genetisches Element, das stromabwärts der UAS-Bindemotive liegt, überzuexprimieren.

Um die Spezifität der gewonnenen Immunsereen zu überprüfen, wurde das Transgen *UAS-Pdu-twist* ektopisch mit dem *sgs* (salivary gland secretion) Promotorkonstrukt *sgs-GAL4* in den Speicheldrüsen des ersten Larvenstadiums von *Drosophila* und mit der Enhancertrap-Linie *rP298-GAL4* (Menon und Chia, 2001) in den Gründerzellen (Founderzellen) der Muskulatur exprimiert.

In Gesamtproteinextrakten sowohl aus den mit *sgs-GAL4*, als auch den mit *rP298-GAL4* getriebenen *UAS-Pdu-twist* Linien, konnte im Western Blot ektopisch exprimiertes Pdu-Twist mithilfe der Immunsereen Anti-Pdu-Twist-6067 und Anti-Pdu-Twist-6068 nachgewiesen werden (Abbildung 3.21 B).

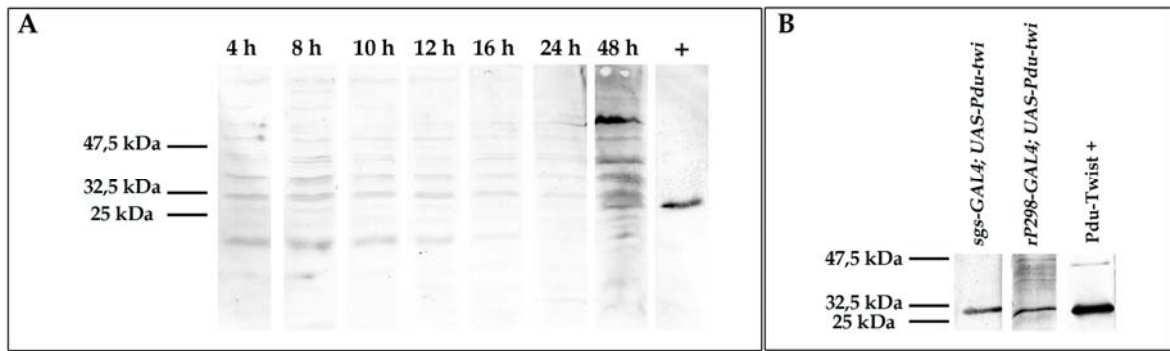


Abbildung 3.21: Western Blot Analyse der gewonnenen Immunsereen Anti-Pdu-Twist-6067 und Anti-Pdu-Twist-6068. (A) Analyse von Gesamtproteinextrakten aus unterschiedlich weit entwickelten Embryonalstadien (4 h-48 h) von *Platynereis*. Sowohl Anti-Pdu-Twist-6067 als auch Anti-Pdu-Twist-6068 zeigen keine deutliche Bande im Western Blot der Extrakte (gezeigt ist die Analyse von Anti-Pdu-Twist-6067). Als Positivkontrolle diente aufgereinigtes PduTwist (B) Analyse von Gesamtproteinextrakten aus Pdu-Twist ektopisch exprimierenden *Drosophila* und aufgereinigtem rekombinant exprimiertem Pdu-Twist. Sowohl Anti-Pdu-Twist-6067 als auch Anti-Pdu-Twist-6068 zeigen eine deutliche Bande im Western Blot der Extrakte (gezeigt ist die Analyse von Anti-Pdu-Twist-6067). Die Verdünnung der Antiseren betrug 1:1000. Als sekundärer Antikörper kam anti-rabbit-AP in einer Verdünnung von 1:25000 zum Einsatz.

3.2.5.3 *Anti-Pdu-Twist-6067 und Anti-Pdu-Twist-6068* detektieren kein *Pdu-Twist* in Gesamtproteinextrakten aus *Platynereis* Entwicklungsstadien

Die Western Blot Analyse von Gesamtproteinextrakten aus *Platynereis* Entwicklungsstadien unterschiedlichen Alters mit den Immunsereen ergab keine eindeutig auswertbaren Ergebnisse. Sowohl Anti-Pdu-Twist-6067 als auch Anti-Pdu-Twist-6068 detektieren multiple Banden in den gelelektrophoretisch aufgetrennten Proteinextrakten. Hierbei kann aber keine Bande nach ihrer Intensität oder ihrem Molekulargewicht eindeutig als *Pdu-Twist* charakterisiert werden (Abbildung 3.21 A).

3.2.6 Immunhistochemische Färbungen mit Anti-Pdu-Twist-6067 und Anti-Pdu-Twist-6068 detektieren kein *Pdu-Twist* in *Platynereis* Entwicklungsstadien

Für eine *in situ* Analyse der Spezifität der Immunsereen gegen *Pdu-Twist* wurden immunhistochemische Färbungen an *Platynereis* Trochophorae durchgeführt. *In situ* Hybridisierungen zeigen *Pdu-twist* Transkriptlokalisierung in den Mesodermanlagen der Larven (3.1.4, Abbildung 3.22), somit ist davon

auszugehen, dass das Pdu-Twist Protein mit Pdu-Twist spezifischen Antiseren ebenfalls in diesen Anlagen nachweisbar ist.

Im Vergleich der Färbungen mit Pdu-Twist-6067 und Pdu-Twist-6068 mit den entsprechenden Präimmunsereen Präimmun-6067 und Präimmun-6068, sind keine Unterschiede zu erkennen, so dass davon ausgegangen werden muss, dass die Immunsereen keine Spezifität für Pdu-Twist aufweisen.

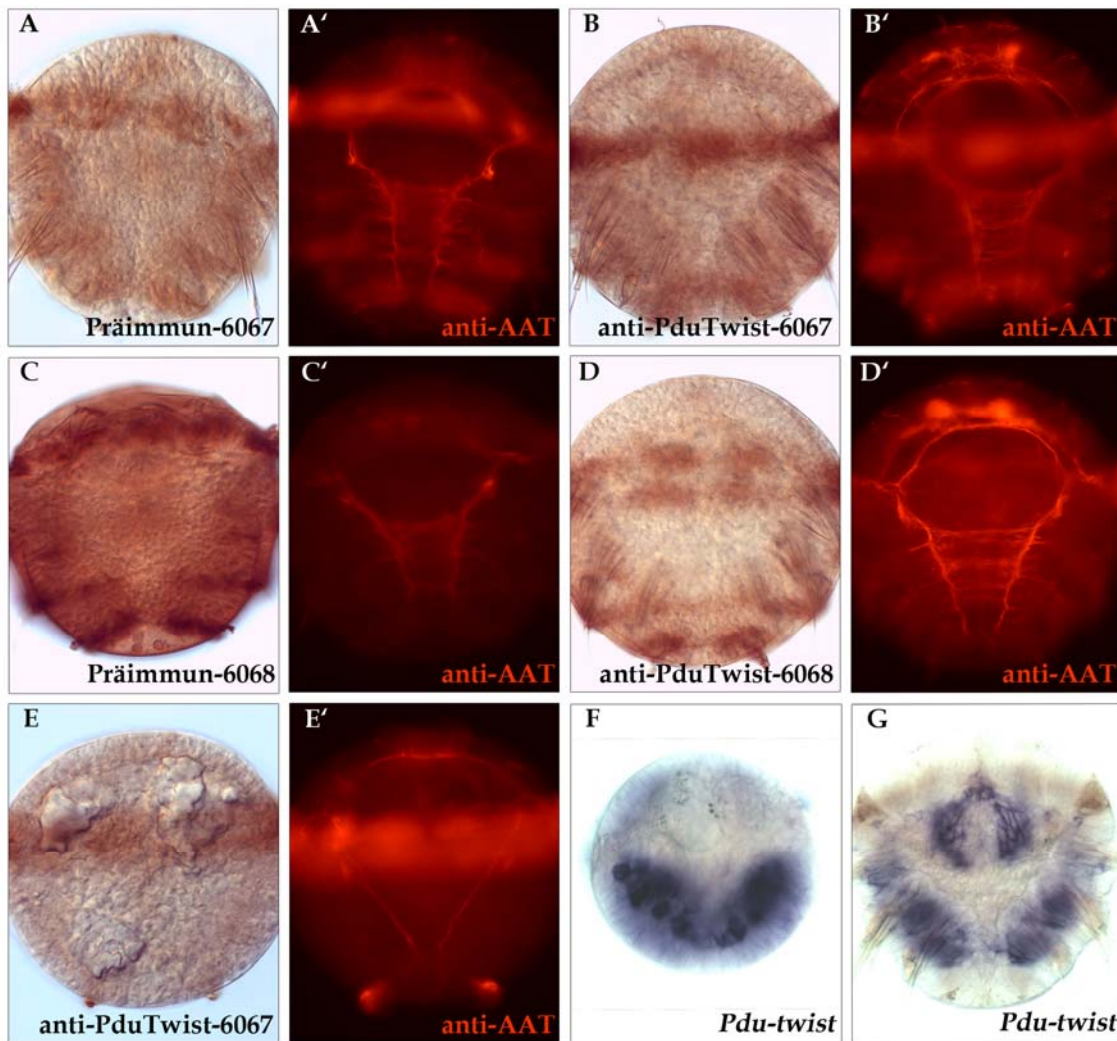


Abbildung 3.22: Immunhistochemische Antikörperfärbungen an *Platynereis* Trochophorae mit Anti-Pdu-Twist-6067 und Anti-Pdu-Twist-6068 zeigen kein spezifisches Signal. (A, B) Immunhistochemische Färbungen an 48 Stunden alten, (E) an 24 Stunden alten Trochophorae mit dem Präimmunserum von 6067 und Anti-Pdu-Twist-6067. (C, D) Immunhistochemische Färbungen an 48 Stunden alten Trochophorae mit dem Präimmunserum von 6068 und Anti-Pdu-Twist-6068. (A'-E') Simultan durchgeführten Kontrollfärbungen mit Anti-acetyliertem-Tubulin (anti-AAT). (F) *Pdu-twist* Transkriptlokalisierung in der 24 Stunden alten, (G) die in der 48 Stunden alten Trochophora. Im Vergleich der Färbungen mit dem Präimmunserum und den Färbungen mit den entsprechenden Immunsereen kann keine spezifische Anfärbung von Pdu-Twist durch die Immunsereen festgestellt werden.

3.3 Ektopische Expression von *Platynereis twist* in *Drosophila melanogaster*

Bei dem GAL4/UAS-System handelt es sich um ein *in vivo* System, welches aus zwei transgenen Fliegenlinien besteht: einer sogenannten GAL4-Treiber-Linie und einer UAS-Linie. In der GAL4-Treiber-Linie wird ein natürlicherweise nicht vorkommender Transkriptionsfaktor (GAL4) aus der Hefe unter der Kontrolle eines spezifischen Promotors exprimiert. Kreuzt man die Treiber-Linie mit einer bestimmten UAS-Linie, so bindet GAL4 an die UAS-Sequenzen und induziert so die Expression des gewünschten Gens. Auf diese Weise ermöglicht dieses System die durch den Promotor der Treiber-Linie spezifizierte räumlich und zeitlich gerichtete Expression eines bestimmten DNA-Abschnitts oder Gens *in vivo* (Brand und Perrimon, 1993).

Um eine eventuell vorhandene, in der Evolution konservierte funktionelle Komponente der Twist Transkriptionsfaktoren aus verschiedenen Spezies zu untersuchen wurde UAS-*Pdu-twist* unter der Kontrolle von *twist*-GAL4 ektopisch in *Drosophila melanogaster twist* und *twist snail*- Mutanten exprimiert und die resultierenden Phänotypen analysiert.

3.3.1 Herstellung und Klonierung von pUAST-*Pdu-twist*

Ektopisch exprimiertes GAL4 aktiviert die Transkription eines Zielgens welches hinter UAS-Elementen lokalisiert ist. Der P-Element-Vektor pUAST (Vektorkarte 7.7) besitzt fünf tandem-repitierte UAS-Elemente, gefolgt von der Hsp70 TATA-Box, einem Transkriptionsinitiationsmotiv, einer multiple Klonierungsstelle und dem kleinen SV40 Intron gefolgt von einem Polyadenylierungssignal. Diese genetischen Elemente sind in einen P-Element Vektor (pCaSpeR3), der die P-Element-Enden (P5' und P3') und das *white*⁺ Gen als Selektionsmarker besitzt eingebettet (Abbildung 3.24).

Um die *Pdu-twist* cDNA in pUAST einzubringen, wurde zunächst durch Fusions-PCR mit den Primern TwiFuF_cDNA, TwiFuR_cDNA und den in ihrer Sequenz überlappenden 5'-RACE- und 3'-RACE-Fragmenten als Matrize, die komplette *Pdu-twist* cDNA zu amplifiziert.

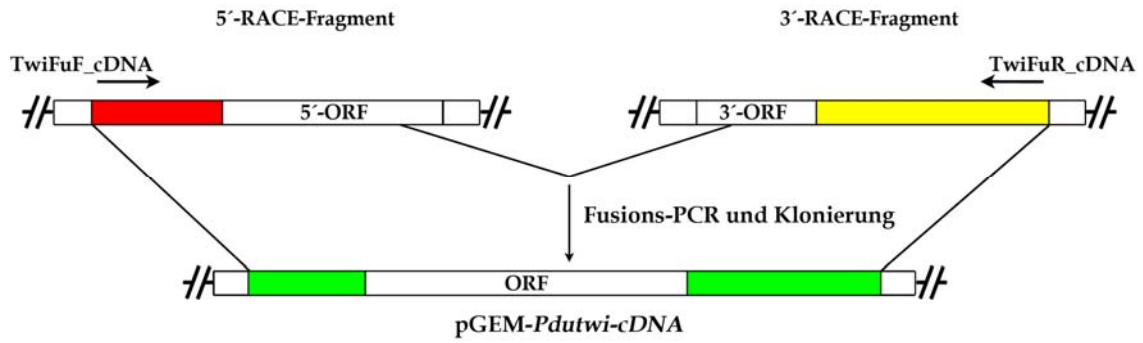


Abbildung 3.23: Fusions-PCR zur Klonierung der kompletten cDNA von *Pdu-twist*. Mit dem Primerpaar TwiFuF_cDNA und TwiFuR_cDNA war es möglich die überlappenden 5'- und 3'-RACE Fragmente zu der kompletten *Pdu-twist* cDNA zu fusionieren und in pGEM-T easy zu klonieren.

Das resultierende Fusionsamplifikat wurde in pGEM-T easy kloniert (Abbildung 3.23) und der resultierende Vektor pGEM-*Pdutwi-cDNA* sequenziert. Die Sequenzanalyse ergab, dass durch die PCR und die Klonierung keine Artefakte in die Nukleinsäuresequenz eingebracht worden waren. Der Klonierungsvektor pGEM-T easy besitzt flankierend zu der einklonierten rekombinanten DNA Schnittstellen für die Restriktionsendonuklease *Eco* RI. Die multiple Klonierungsstelle von pUAST besitzt ebenfalls eine Schnittstelle für *Eco* RI. Durch einen Restriktionsverdau von pGEM-*Pdutwi-cDNA* und pUAST mit *Eco* RI und nachfolgender Ligation des *Eco* RI *Pdutwi-cDNA* Restriktionsfragments mit dem restriktionsenzymatisch behandelten pUAST, ist eine ungerichtete Einbringung von *Pdutwi-cDNA* in pUAST möglich.

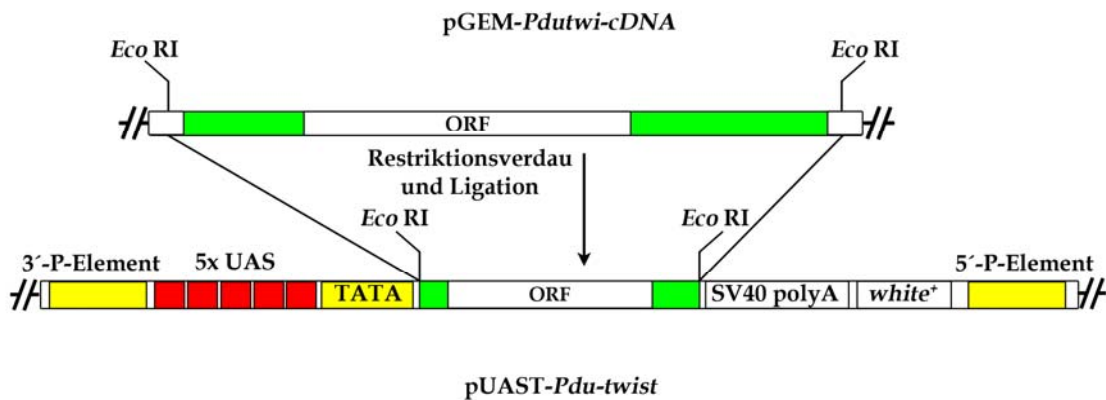


Abbildung 3.24: Klonierungsstrategie für pUAST-*Pdu-twist*. Durch einen Restriktionsverdau von pGEM-*Pdutwi-cDNA* und pUAST mit *Eco* RI und nachfolgender Ligation des *Pdutwi-cDNA* Restriktionsfragments mit dem restringierten pUAST, ist eine ungerichtete Einbringung von *Pdutwi-cDNA* in pUAST möglich.

Der klonierte Vektor pUAST-*Pdu-twist* wurde sequenziert und auf die korrekte Orientierung der *Pdu-twist* cDNA überprüft. Es konnten sieben Klone mit korrekter Orientierung und ohne Sequenzartefakte isoliert werden (pU2-pU9). Aus pU2 wurde pUAST-*Pdu-twist* für die folgende Injektion gewonnen.

3.3.2 Herstellung keimbahntransformierter *Drosophila* und Etablierung transgener Stämme

In P-Element-Vektoren einklonierte cDNAs lassen sich durch Injektion der Vektoren in das Polplasma sich entwickelnder *Drosophila* Embryonen stabil in deren Keimbahn integrieren (Rubin und Spradling, 1982; Spradling und Rubin, 1982). Der P-Element Insertionsvektor pUAST codiert unter anderem für die Sequenz des *white*-Gens als dominanten Selektionsmarker. Da die Insertion des P-Element-Konstruktes in die Keimbahn der injizierten Embryonen erfolgt, können transformierte Fliegen erst in der G1-Generation selektiert werden (Klemenz *et al.*, 1987).

Es konnten acht Stämme mit unabhängigen Insertionen von pUAST-*Pdu-twist* etabliert werden. Bei sieben dieser Stämme befand sich die P-Elementinsertion auf dem zweiten (UAS-Pdutwi1a-2a, UAS-Pdutwi4a und UAS-Pdutwi6a-8a) bei einem Stamm auf dem X (UAS-Pdutwi5a) und bei einem Stamm auf dem dritten (UAS-Pdutwi3a) Chromosom. Da sowohl *twist* als auch *snail* auf dem zweiten Chromosom von *Drosophila* liegen, konnte für die ektopische Expression von *Pdu-twist* in *twi* und in *twi sna* mutanten Stämmen nur die Linie UAS-Pdutwi3a (P-Element-Insertion auf dem dritten Chromosom) benutzt werden.

Tabelle 3.1 Lokalisation der P-Elementinsertionen von UAS-*Pdu-twist* bei den etablierten transgenen Linien

Linie	1a	2a	3a	4a	5a	6a	7a	8a
Chromosom	II.	II.	III.	II.	X	II.	II.	II.

3.3.3 Ektopische Expression von *Pdu-twist* in den Speicheldrüsen des ersten Larvenstadiums und den Gründerzellen der Muskulatur von *Drosophila melanogaster*

Um die Funktionalität des GAL4/UAS-Expressionssystems mit dem Transgen *UAS-Pdu-twist* zu überprüfen, wurde es ektopisch mit dem *sgs* (salivary gland secretion) Promotorkonstrukt *sgs-GAL4* in den Speicheldrüsen des ersten Larvenstadiums und mit der Enhancertrap-Linie *rP298-GAL4* (Menon und Chia, 2001) in den Founderzellen der Muskulatur exprimiert.

Sowohl in den mit *sgs-GAL4* als auch in den mit *rP298-GAL4* getriebenen *UAS-Pdu-twist* Linien konnte ektopisch exprimiertes *Pdu-twist* nachgewiesen werden (Abbildung 3.25). Der Nachweis wurde durch RT-PCR mit *Pdu-twist* spezifischen Primern und Gesamt-RNA als Matrize (3.1.3), *in situ* Hybridisierungen mit dem *Pdu-twist* 5'-RACE Fragment (3.1.1) als Sonde, Antikörperfärbungen und Western Blot Analysen von Gesamtprotein mit anti-Pdu-Twist-6087 (3.2.4) geführt.

Hierbei muss aber die Einschränkung gemacht werden, dass in den mit *sgs-GAL4* getriebenen *UAS-Pdu-twist* Linien sowohl mit RT-PCR Analysen und *in situ* Hybridisierungen, als auch mit Antikörperfärbungen und Western Blot Analysen *Pdu-twist* bzw. Pdu-Twist nachgewiesen werden konnte. In den mit *rP298-GAL4* getriebenen *UAS-Pdu-twist* Linien allerdings nur in den RT-PCR und Western Blot Analysen. Sowohl Fluoreszenz *in situ* Hybridisierungen, als auch Antikörperfärbungen erbrachten keine verwertbaren Ergebnisse.

Aus diesen Analysen folgt, dass das GAL4/UAS-System auch für die ektopische Überexpression von *Platynereis twist* in *Drosophila melanogaster* verwendet werden kann.

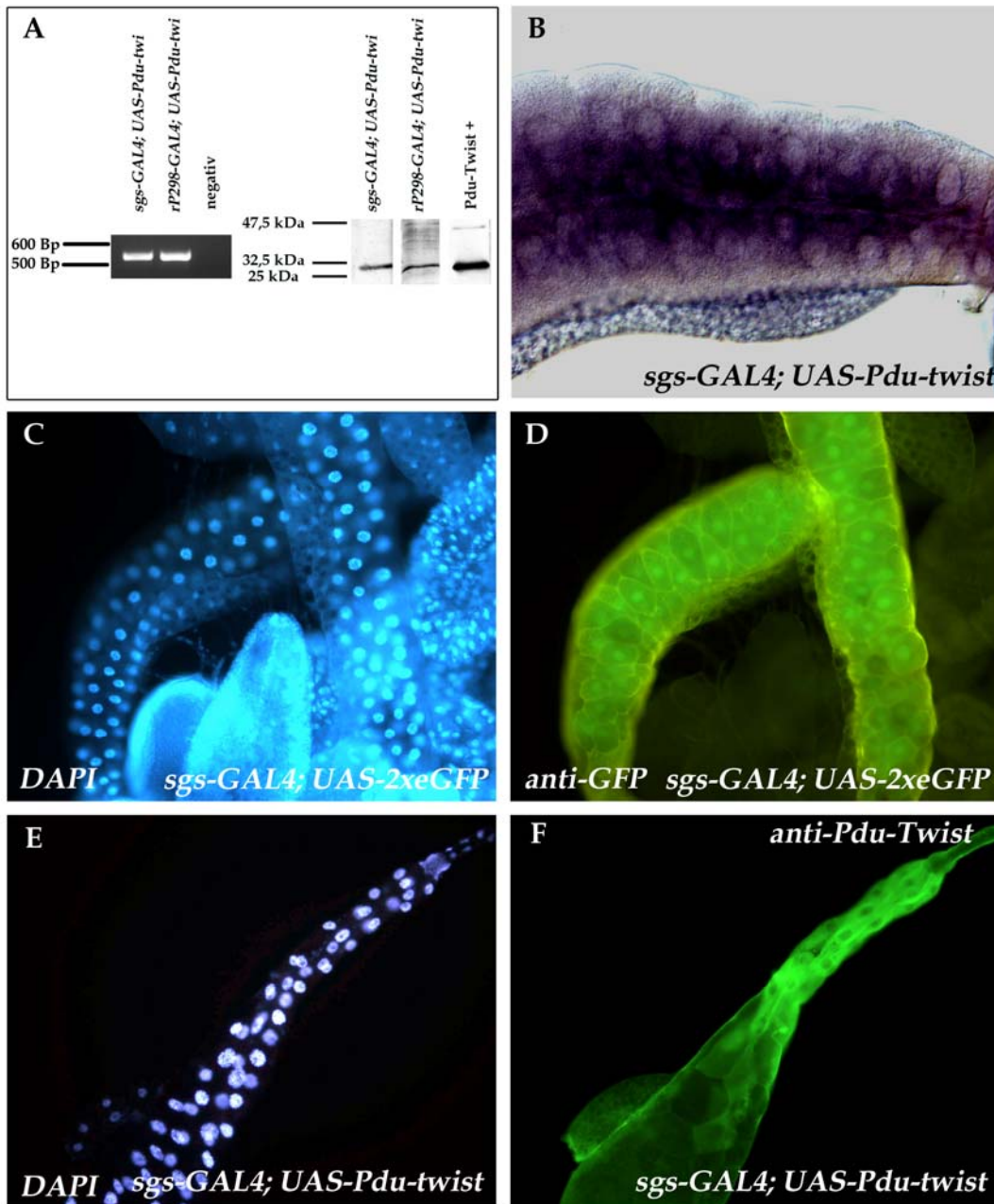


Abbildung 3.25: Ektopische Expression von *Pdu-twist* in Speicheldrüsen erster Larven und Muskelvorläuferzellen von *Drosophila melanogaster*. (A) RT-PCR und Western-Blot Analysen der ektopischen *Pdu-twist* Expression. Sowohl in der RT-PCR als auch im Western Blot kann ektopische Expression von *Pdu-twist* in den mit *sgs-GAL4* oder mit *rP298-GAL4* getriebenen *UAS-Pdu-twist* Linien nachgewiesen werden. (B) *In situ* Hybridisierung mit dem 5'-RACE Fragment als *Pdu-twist* Sonde. Es ist ein deutliches Hybridisierungssignal in den Speicheldrüsenzellen zu erkennen. (C, D) Expressionskontrolle des *sgs-GAL4* Treiberstammes mit *UAS-2xeGFP*. Deutlich ist eine GFP-Expression in den Kernen der Speicheldrüsen zu erkennen. (E, F) Ektopische Expression von *Pdu-Twist* in Speicheldrüsen erster Larven. Die Detektion fand mit anti-*Pdu-Twist*-6067 statt. Es ist ein deutliches Signal im Zytoplasma der Speicheldrüsenzellen zu erkennen. *In situ* Hybridisierungen mit *Pdu-twist* spezifischen Sonden und Antikörperfärbungen mit anti-*Pdu-Twist*-6067 an mit *rP298-Gal4* getriebenen *UAS-Pdu-twist* Linien blieben trotz positivem Ergebnis bei der RT-PCR und Western-Blot Analyse ohne verwertbares Ergebnis.

3.3.4 Ektopische Expression von *Pdu-twist* in *twist* und *twist snail*-mutanten Stämmen von *Drosophila melanogaster* und Analyse der resultierenden Phänotypen

Während der Embryonalentwicklung von *Drosophila* entsteht das Mesoderm aus der ventralen Region des Embryos. Eine Gruppe maternaler Gene, die Gene der *dorsal* Gruppe und *cactus*, etablieren durch den nukleären Konzentrationsgradienten des Dorsal Proteins vermittelt, Positionswerte entlang der dorsoventralen Achse (Roth *et al.*, 1989; Rushlow *et al.*, 1989; Steward, 1989). Das Dorsal Protein in den Kernen reguliert die Aktivierung oder Repression zygotischer Gene.

Zwei dieser Gene, *twist* und *snail*, sind bei der Bildung des Mesoderms beteiligt (Nüsslein-Volhard *et al.*, 1984). Embryonen aus *twist* und *snail* mutanten Stämmen gastrulieren abnormal, bilden kein Mesoderm oder mesodermale Derivate und sterben am Ende der Embryogenese (Simpson, 1983; Grau *et al.*, 1984). Die lateralen und dorsalen Teile der Embryonen sind von dem mutanten Phänotyp nicht betroffen.

Durch die ektopische Expression von *Pdu-twist* in *twist* und *twist snail*-Embryonen wurde überprüft, ob eine Rettung oder Abschwächung des mutanten Phänotyps durch das Protein eines anderen, evolutiv entfernten Mitglied der Twist-Familie möglich ist. Dies würde für eine evolutionäre Konservierung der Funktion der Twist-like Transkriptionsfaktoren sprechen.

Zur Herstellung der *Pdu-twist* ektopisch exprimierenden *twist* und *twist snail*-mutanten Embryonen wurden zwei heterozygot *twi* oder heterozygot *twi sna*-mutante Linien benutzt. Diese besaßen zusätzlich entweder den *twi-GAL4* Treiber (Baylies und Bate, 1996) auf dem X-Chromosom (beide dankenswerterweise von Dr. Anne Holz zur Verfügung gestellt) oder das Transgen *UAS-Pdu-twist* (3.3.2) auf dem dritten Chromosom. Diese beiden Linien wurden gekreuzt (Abbildung 3.26) und die homozygot mutanten, *Pdu-twist* exprimierenden Embryonen auf ihren Phänotyp hin untersucht. Hierzu wurden Kutikula-Präparate der Embryonen angefertigt und auf eine eventuelle Rettung oder Abschwächung des Phänotyps gegenüber dem mutanten Phänotyp hin analysiert (Abbildung 3.27).

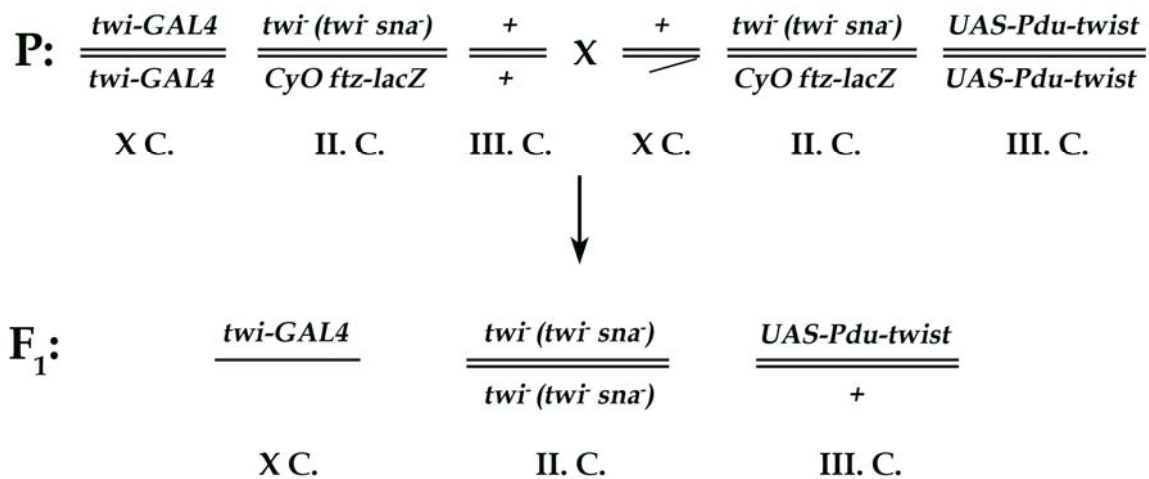


Abbildung 3.26: Kreuzungsschema der für die ektopische Expression von *Pdu-twist* verwendeten Linien. In der F₁-Generation entstanden *twi* bzw. *twi sna* homozygot mutante Tiere, die alle zusätzlich unter der Kontrolle von *twi-GAL4* das Transgen *UAS-Pdu-twist* exprimierten. Diese unterschieden sich phänotypisch eindeutig von heterozygoten, phänotypisch wildtypischen Tieren und embryonal letalen, homozygoten Balancertieren X C. X-Chromosom, II. C. zweites Chromosom, III. C. drittes Chromosom, P Parentalgeneration, F₁ Filialgeneration

Die Kutikula wildtypischer *Drosophila*-Embryonen zeigt in jedem zukünftigen Segment eine Reihe Kutikularborsten oder Zähnchenreihen. In Kutikula-Präparaten von Embryonen, die für ein oder mehrere Gene mutant sind, lassen sich oft Phänotypen durch eine abweichende Anordnung der Kutikularstrukturen, deren Fehlen oder vermehrtes Vorkommen erkennen (Jürgens *et al.*, 1984; Nüsslein-Volhard *et al.*, 1984; Wieschaus *et al.*, 1984). Kutikula-Präparate von *twist* mutanten und *twist snail* doppelmutanten Embryonen zeigen eine anomale Anordnung dieser Zähnchenreihen, die durch die abnormale Gastrulation entsteht. Die Kutikularborsten liegen nicht nur auf einer Seite des Embryos, sondern man kann sie auf beiden Seiten beobachten (Abbildung 3.27).

Die Kutikula-Präparate von *twi* oder *twi sna* mutanten Embryonen aus den Rettungsexperimenten, in denen unter der Kontrolle des *twist*-Promotors ektopisch *Pdu-twist* exprimiert wurde, zeigten ebenfalls den mutanten Phänotyp. Es konnte keine Rettung oder Abschwächung des mutanten Phänotyps festgestellt werden (Abbildung 3.27).

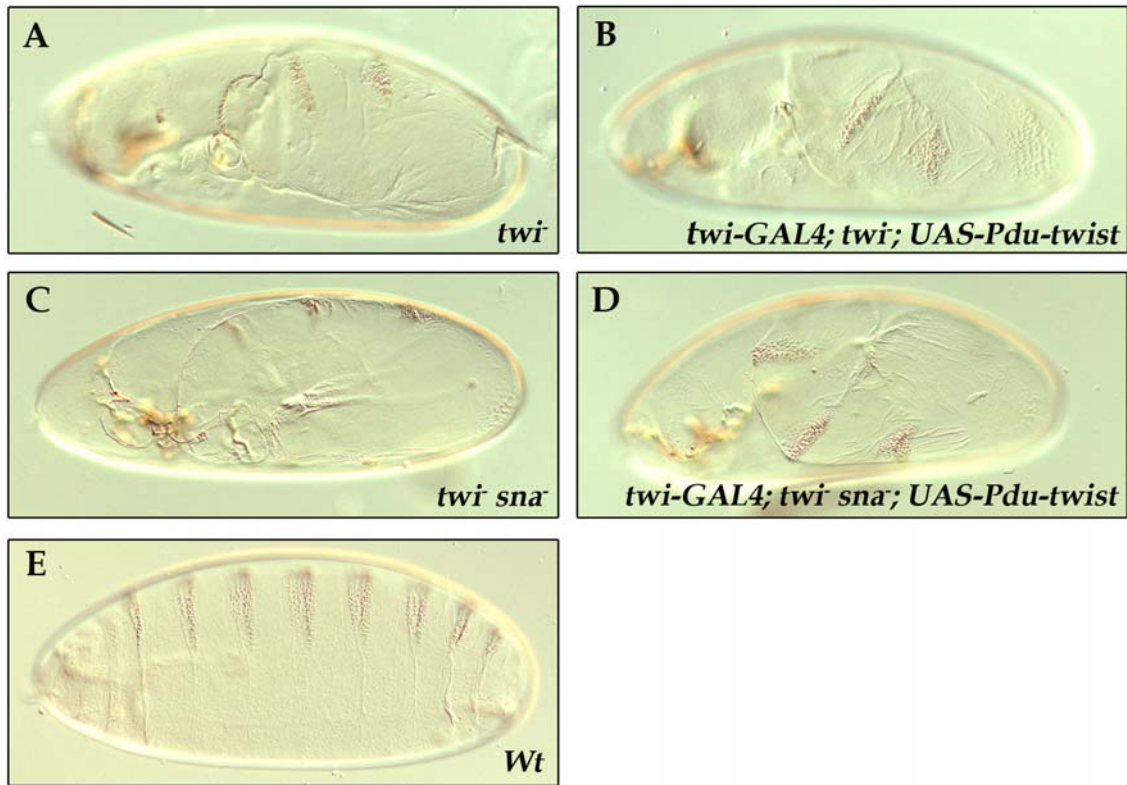


Abbildung 3.27: Kutikula-Präparate der aus der ektopischen Expression von *Pdu-twist* resultierenden Phänotypen. (A, C) Kutikula-Präparate des mutanten Phänotyps. (B, D) Kutikula-Präparate des jeweiligen Rettungsexperiments. (E) Kutikula-Präparat aus einem wildtypischen (Wt) Embryo. Bei den Rettungsexperimenten konnte weder eine komplette Rettung, noch eine Abschwächung des mutanten Phänotyps festgestellt werden.

Mit *twi-GAL4* als Treiber ektopisch exprimiertes *Pdu-twist* ist also nicht ausreichend um den Phänotyp des Wildtyps in den mutanten Embryonen zu wiederherzustellen. Obwohl die Kutikula-Präparate der Rettungsexperimente keine Rettung des mutanten Phänotyps zeigen, wäre es möglich, dass *Pdu-twist* mesoderm-spezifische Gene anschaltet, die aber aufgrund des mutanten Hintergrundes nicht in der Lage sind die Kutikula-Morphologie des Wildtyps zu erzeugen.

Hierbei kommen als Kandidaten die direkten Zielgene von Twist in Frage. Der bHLH-Transkriptionsfaktor Mef2 (myocyte enhancing factor 2) ist ein direktes Zielgen von *Drosophila* Twist in Muskelvorläuferzellen. Twist bindet an das E-Box Motiv im Enhancer von *Mef2* und aktiviert dessen Promotor hierdurch. Ektopische Expression von Twist in *Drosophila* resultiert auch in ektopischer Transkription von *Mef2*. In *twist* mutanten Embryonen wird die Transkription von *Mef2* nicht

initiiert und es ist kein Mef2 Protein im Embryo nachzuweisen (Cripps *et al.*, 1998; Gajewski *et al.*, 1998).

Zur Überprüfung, ob mit *twi*-GAL4 exprimiertes UAS-*Pdu-twist* die Fähigkeit besitzt, die *Mef2* Transkription und Translation zu initiieren, wurden sowohl an *twist* oder *twist snail* mutanten Embryonen, als auch an mutanten Embryonen, die das Transgen UAS-*Pdu-twist* exprimieren, mit einem Mef2 spezifischen Antikörper Immunfluoreszenzfärbungen durchgeführt (Abbildung 3.28).

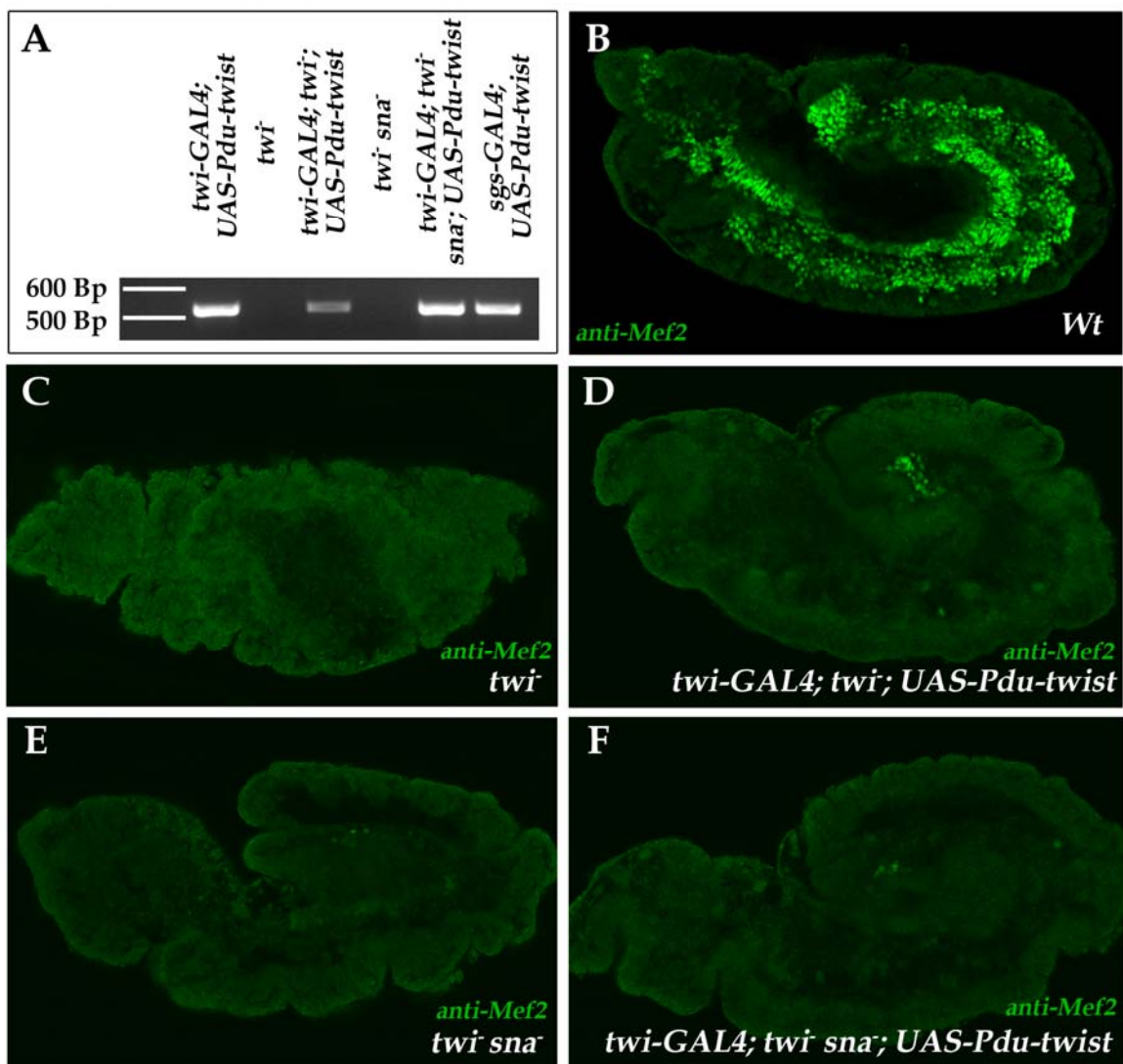


Abbildung 3.28: Ektopisch exprimiertes *Pdu-twist* kann in *twist* und *twist snail* mutanten Embryonen keine Expression von Mef2 induzieren. (A) RT-PCR Analyse der *Pdu-twist* Expression. Das Transgen UAS-*Pdu-twist* wird in allen mit GAL4 getriebenen Linien exprimiert. (B) Wildtypische Expression von Mef2. (C, E) In *twist* und *twist snail* mutanten Embryonen kann keine Mef2 Expression nachgewiesen werden. (D, F) Auch in *twist* und *twist snail* mutanten Embryonen, die das Transgen UAS-*Pdu-twist* unter der Kontrolle von *twi*-GAL4 exprimieren, kann keine Mef2-Expression beobachtet werden. Der Nachweis von Mef2 erfolgte immunfluoreszierend mit anti-Mef2.

Weder in den mutanten Embryonen, noch in den das Transgen exprimierenden mutanten Embryonen, konnte Mef2-Expression nachgewiesen werden. Dies legt die Schlussfolgerung nahe, dass eine ektopische Expression von *Platynereis twist* in *Drosophila* Mutanten nicht ausreichend ist, um die Zielgene, die normalerweise von *Drosophila* Twist angeschaltet werden, zu aktivieren.

Sowohl in den mutanten Phänotypen als auch den *Pdu-twist* ektopisch exprimierenden mutanten Embryonen lassen sich vereinzelt Mef2 positive Zellen detektieren. Herkunft und Grund der Mef2-Aktivierung in diesen Zellen sind völlig unklar. Es könnte sich um eine Kreuzreaktion des Antikörpers oder um eine Twist unabhängige, womöglich ektopische, Aktivierung handeln.

Zusammenfassend kann man feststellen, dass mit *twi-GAL4* exprimiertes UAS-*Pdu-twist* weder in der Lage ist den morphologischen Phänotyp der *twist* oder *twist snail* mutanten Embryonen zu retten, noch ausreichend ist die Zielgene, die durch *Drosophila* Twist in der wildtypischen Situation angeschaltet werden, in diesen Mutanten zu aktivieren.

3.4 Klonierung und Charakterisierung eines *Platynereis dumerilii snail* Homologs

3.4.1 Amplifizierung und Klonierung einer *Platynereis snail* cDNA

Das erste Mitglied der Snail-Familie, *snail*, wurde zuerst in *Drosophila melanogaster* beschrieben (Grau *et al.*, 1984), wo es essentiell für die Bildung des Mesoderms ist (Nüsslein-Volhard *et al.*, 1984; Alberga *et al.*, 1991). Inzwischen sind bei vielen Spezies *snail* Homologe und Paraloge beschrieben (Nieto, 2002).

Mitglieder der Snail-Familie kodieren für Transkriptionsfaktoren des sogenannten Zink-Finger-Typs. Allen gemeinsam ist eine ähnliche Organisation aus einer hochkonservierten carboxyterminalen Region, die vier oder fünf Zink-Finger besitzt und einer eher variablen aminoterminalen Region. Die Zink-Finger sind vom C₂H₂-Typ und agieren als sequenzspezifische DNA-Bindemotive (Knight und Shimeld, 2001). Die Finger bestehen strukturell gesehen aus zwei β -Faltblättern, die von einer aminoterminalen α -Helix gefolgt werden. Diese bindet an die große Furche der DNA. Die zwei konservierten Cysteine und Histidine (C₂H₂) koordinieren das Zinkion in den Zink-Fingern.

Um ein Fragment der cDNA eines *Platynereis snail* Homologs zu amplifizieren und zu klonieren, wurden die degenerierten Primer SnaF1 und SnaR1, sowie SnaR2 und SnaF2 entworfen. Ihre Sequenz codiert für Bereiche in den Zink-Fingern, für die ein Alignment der Snail Proteine anderer Spezies einen hohen Grad an Konservierung anzeigt. Durch Polymerasekettenreaktion mit SnaF1 und SnaR1 und aus 48 Stunden RNA hergestellter cDNA als Matrize war es möglich ein 180 Bp großes Fragment zu klonieren (Sna4), dessen Nukleinsäuresequenz eine hohe Homologie zu Sequenzen von anderen Snail Familienmitgliedern zeigte. Ausgehend von der Sequenzinformation dieses Fragmentes wurden die Primer, sowie Pd_snail_F_2 und Pd_Snail_R_2 entworfen. Mit den Primern PdSnaRACE F und PdSnaRACE R als genspezifischen Primern (GSP) und Pdsnail_F_2 und Pdsnail_R_2 als „nested“ genspezifischen Primern (NGSP) konnte in einer 5'-RACE-Reaktion ein 1173 Bp PCR-Fragment (Sna5_1200, Sequenz siehe Appendix) und in einer 3'-RACE-Reaktion ein 1305 Bp großes PCR-Fragment (Sna3_1200,

Sequenz siehe Appendix) amplifiziert werden. Die Sequenzanalyse der beiden überlappenden RACE-Fragmente ermöglichte die Erstellung einer 2456 Bp großen, zusammenhängenden Nukleinsäuresequenz.

3.4.2 *Platynereis* Snail ist ein Mitglied der Snail-Familie von Zink-Finger Transkriptionsfaktoren

Die weitere Analyse der Sequenz ergab zwischen Nukleotid 138 und einem TGA-Stopcodon bei Nukleotid 1407 einen potentiellen offenen Leserahmen (ORF) von 1269 Bp. Der offene Leserahmen codiert für ein 423 Aminosäuren großes Polypeptid, das eine große Homologie zu anderen bekannten Mitgliedern der Snail Familie zeigt (BLASTX) (Altschul *et al.*, 1997). Dies lässt die Folgerung zu, dass diese Nukleinsäuresequenz die cDNA des *P. dumerilii* Homologs von *snail* darstellt. Sie wird im folgenden *Pdu-snail* (*Pdu-sna*) genannt.

Die vom offenen Leserahmen abgeleitete Aminosäuresequenz von Pdu-Snail besitzt insgesamt fünf DNA-bindende C₂H₂ Zink-Finger Sequenzmotive (zwischen den Aminosäuren 283 bis 305, 314 bis 337, 340 bis 367, 368 bis 395 und 396 bis 423). Ebenfalls kann ein N-terminales Motiv, eine sogenannte SNUG Domäne, das charakteristisch vor allem für die Vertebraten *snail* Gene ist detektiert werden (Abbildung 3.29 A). Man findet es aber ebenfalls in Echinodermen, Cephalochordaten (Langeland *et al.*, 1998), einem der *snail* Gene von *Patella* (Lespinet *et al.*, 2002) und *Drosophila scratch* (Roark *et al.*, 1995). Um die Beziehung von *Platynereis* Snail zu anderen Ortho- und Paralogen von Snail näher zu untersuchen, wurden die Sequenzen der Zink-Finger Region mit ClustalX (Thompson *et al.*, 1997) aligniert (Abbildung 3.29 B) und die pairwise-similarity Werte berechnet. Die Analyse ergab, dass Pdu-Snail in seiner Sequenz die größte Übereinstimmung mit Mitgliedern der Snail-Familie aus den Stämmen der Lophotrochozoa (88-93 %) und Vertebrata zeigt. Die Sequenz des SNUG-Motivs entspricht bis auf eine Substitution dem Konsensus (MPRSFLIKK). Diese findet sich aber auch bei den anderen Vertretern der Lophotrochozoen (Abbildung 3.29 C).

A Pdu-Sna 423 Aminosäuren

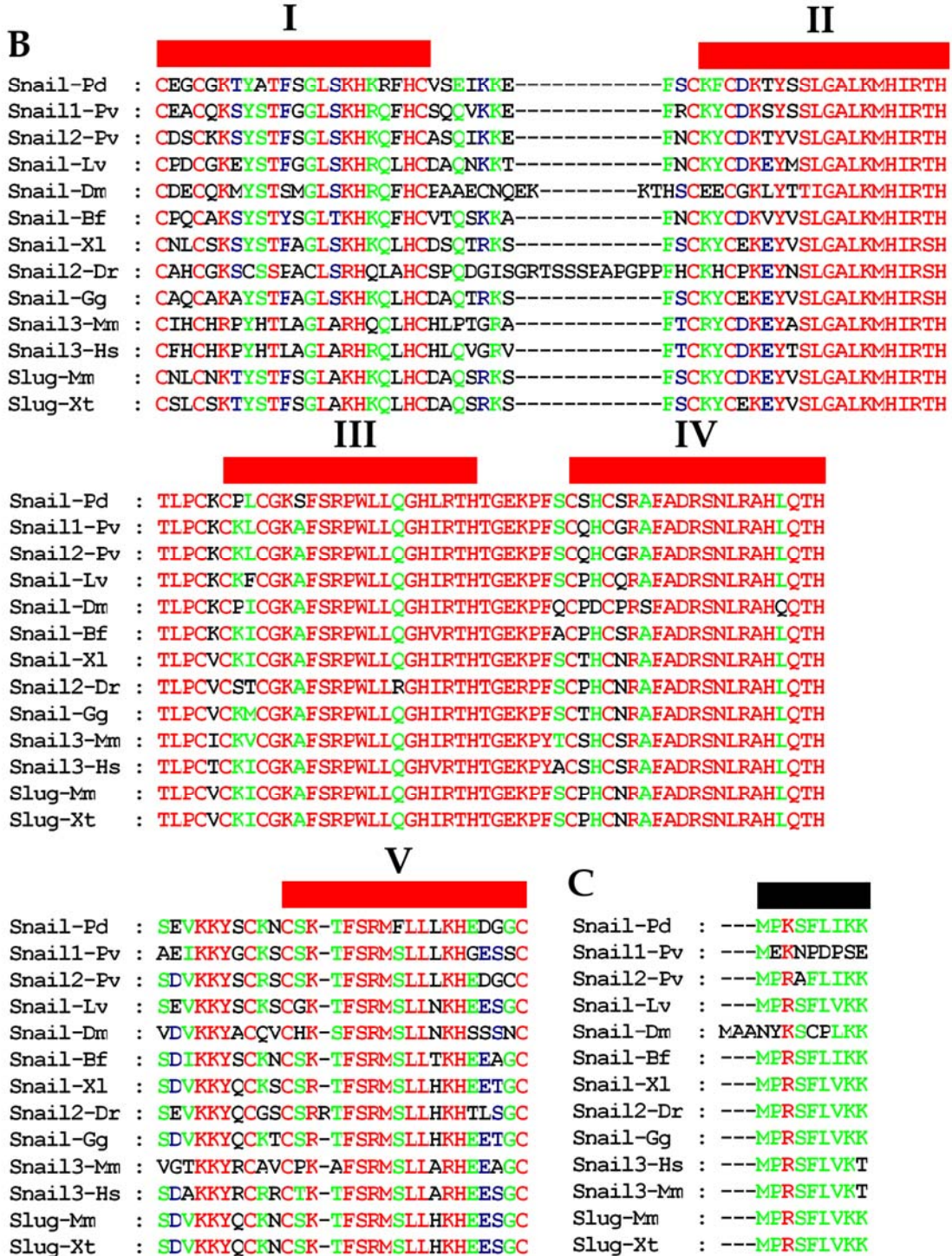
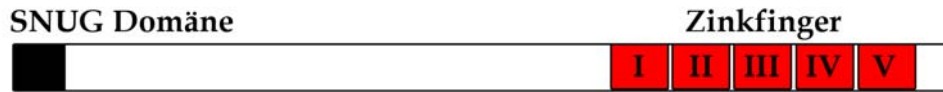


Abbildung 3.29: (A) Schematische Darstellung von Pdu-Sna. (B, C) Sequenz Alignment von *Platynereis* Snail mit Snail Proteinen anderer Spezies im Bereich der (B) Zink-Finger-Domänen (I-V) und der (C) SNUG Domäne. Die größten Sequenzübereinstimmungen finden sich bei den Mitgliedern der Lophotrochozoa und der Vertebrata. **Abkürzungen:** Bf *Branchiostoma floridae* Dm *Drosophila melanogaster*, Dr *Danio rerio*, Gg *Gallus gallus*, Hs *Homo sapiens*, Lv *Lytechinus variegatus*, Mm *Mus musculus*, Pd *Platynereis dumerilii*, Pv *Patella vulgata*, Xl *Xenopus laevis*, Xt *Xenopus tropicalis*

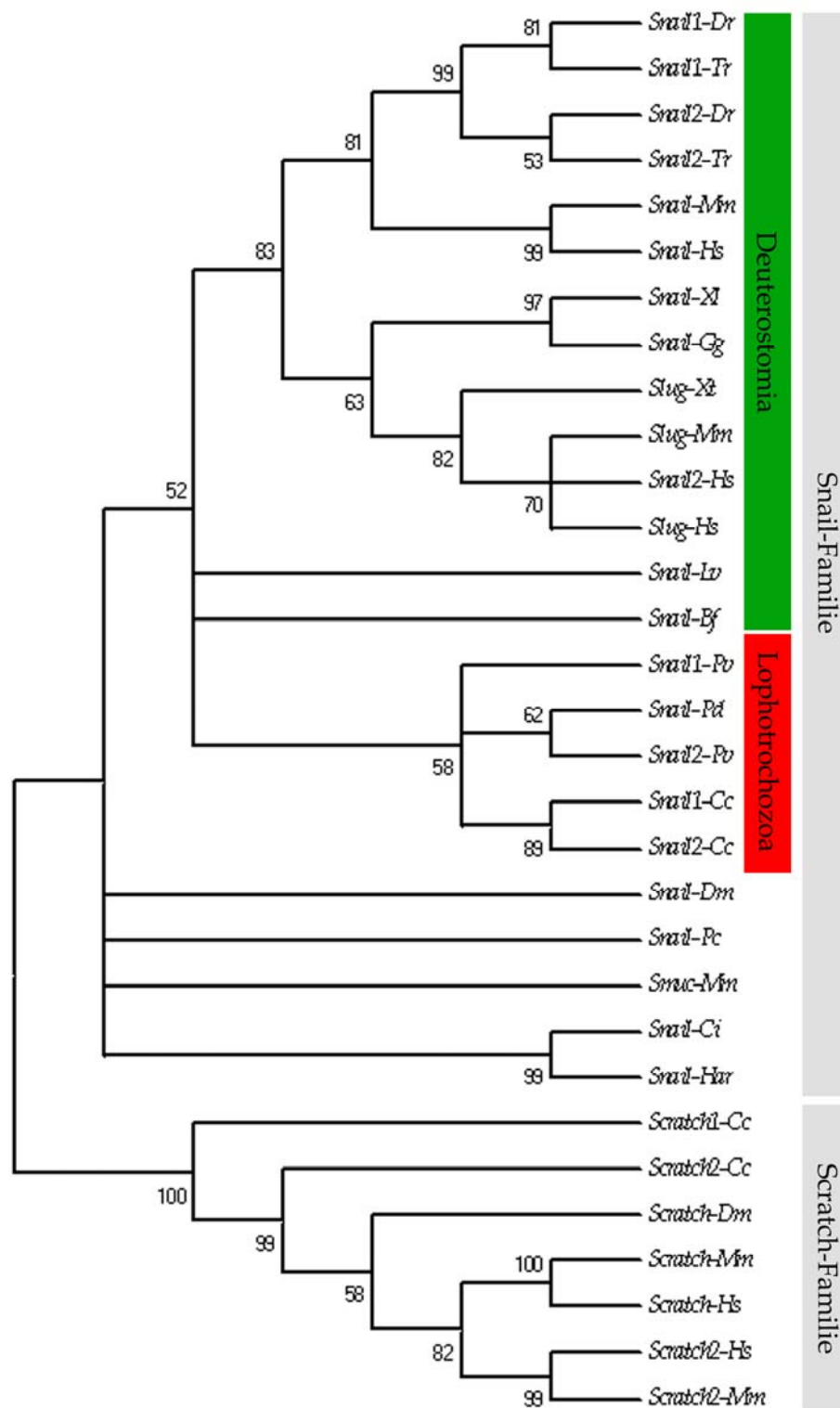


Abbildung 3.30: Neighbour-Joining Analyse der Zink-Finger-Region von Pdu-Snail im Vergleich mit anderen Zink-Finger-Proteinen. Die Bootstrap-Werte beruhen auf 1000 Replikationen und Äste mit einem Bootstrap-Wert < 50 % wurden kollabiert. Pdu-Snail clustert mit den *Patella vulgata* und *Capitella capitata* Snail Proteinen. **Abkürzungen:** **Bf** *Branchiostoma floridae*, **Cc** *Capitella capitata*, **Ce** *Caenorhabditis elegans*, **Ci** *Ciona intestinalis*, **Dm** *Drosophila melanogaster*, **Dr** *Danio rerio*, **Ec** *Enchytraeus coronatus*, **Gg** *Gallus gallus*, **Har** *Halocynthia rorezi*, **Hro** *Helobdella robusta*, **Hs** *Homo sapiens*, **Mm** *Mus musculus*, **Pc** *Podocoryne carnea*, **Pd** *Platynereis dumerilii*, **Pv** *Patella vulgata*, **Tr** *Takifugu rupripes*, **Xl** *Xenopus laevis*, **Xt** *Xenopus tropicalis*

Eine mit dem Neighbour-Joining Algorithmus (Saitou und Nei, 1987) durchgeführte phylogenetische Analyse der Aminosäuresequenz der Zink-Finger-Domänen von Pdu-Snail im Vergleich zu anderen Mitgliedern der Snail-, Slug- und Scratch-Familien, zeigt eine deutliche Eingruppierung von Pdu-Snail bei den Snail-Proteinen von *Patella vulgata* und *Capitella capitata*, also bei zwei weiteren Vertretern aus dem Stamm der Lophotrochozoa (Abbildung 3.30).

Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass es sich bei Pdu-Snail um einen Vertreter der Snail-Familie von Zink-Finger-Transkriptionsfaktoren handelt. Bei den anderen bisher untersuchten Vertretern der Lophotrochozoa (Goldstein *et al.*, 2001; Lespinet *et al.*, 2002; Dill *et al.*, 2007) wurden bis dato immer zwei Paraloge von *snail* gefunden. Dies scheint für *Platynereis* nicht zuzutreffen.

3.4.3 Die *Platynereis snail* mRNA ist schon in unbefruchteten Eizellen nachzuweisen und wird in allen Entwicklungsstadien bis zum subadulten Jungwurm exprimiert

Für die nähere Charakterisierung der entwicklungsbiologischen Funktion eines Gens ist die genaue Kenntnis des zeitlichen und räumlichen Expressionsmusters eine unabdingbare Voraussetzung.

Durch RT-PCR und Northern Blot Analysen (Abbildung 3.31) wurde ein zeitliches Expressionsprofil von *Pdu-snail* erstellt und eine Abschätzung der Transkriptionsintensität von *Pdu-sna* zum jeweiligen Entwicklungszeitpunkt zu getroffen.

Die RT-PCR wurde zeitgleich mit für *Pdu-sna* spezifischen Primern und mit für *Pdu-actin* spezifischen Primern durchgeführt. Die jeweiligen Reaktionsansätze wurden mit derselben cDNA als Matrize und denselben Reaktionskomponenten durchgeführt. Durch einen Vergleich der relativen Amplifikationsintensitäten von *Pdu-snail* und *Pdu-actin* konnte eine Aussage über die Transkriptionsintensität von *Pdu-snail* gegeben werden. Die Northern Blot Analysen wurden mit dem 5'-RACE Fragment (3.1.1) als Sonde durchgeführt.

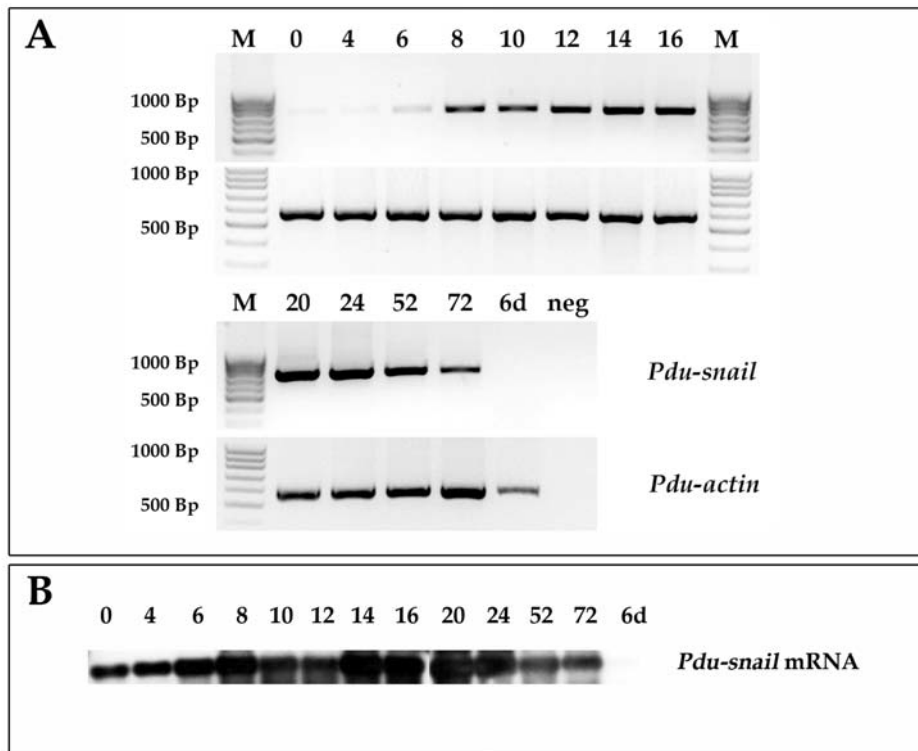


Abbildung 3.31: Die *Pdu-snail* Expression im Verlauf der Platynereisentwicklung. (A) RT-PCR Analyse von *Pdu-snail*. RT-PCR mit für *Pdu-snail* spezifischen Primern (oben) und *Pdu-actin* spezifischen Primern (unten). **(B)** Northern Blot Analyse der *Pdu-snail* Expression. **Abkürzungen:** M 100 bp Ladder (Genecraft, GC-015-004), 0 unbefruchtete Eizellen, 4-72 Anzahl der Stunden nach der Befruchtung, 6d 6 Tage alter Jungwurm, Bp Basenpaare, neg Negativkontrolle ohne cDNA

Platynereis *snail* mRNA kann sowohl in den Northern Blot, als auch den RT-PCR Analysen schon in Gesamt-RNA aus unbefruchteten Eizellen nachgewiesen werden und besitzt somit einen maternalen Effekt. Auch in den folgenden untersuchten Entwicklungsstadien ist sie nachweisbar. Nach der Midblastula-Transition (Abbildung 3.31, 8) erfolgt eine stetige Aufregulierung des *Pdu-snail* Transkriptionsniveaus, das seinen Höhepunkt in der frühen Trochophora-Larve erreicht (Abbildung 3.31, 8-20). Im weiteren Verlauf der Entwicklung zur Metatrochophora und dem dreisegmentige Jungwurm nimmt die Transkriptionsaktivität stetig ab (Abbildung 3.31, 24-72). Im subadulten Wurm ist keine *Pdu-snail* mRNA mehr nachweisbar (Abbildung 3.31, 6d).

3.4.4 Die Mesodermanlagen sich entwickelnder *Platynereis* Larven zeigen *Pdu-snail* Expression

Die räumliche Lokalisation der *Pdu-snail* Expression wurde durch *in situ* Hybridisierungen mit derselben Nukleinsäuresonde, die auch bei den Northern Blots zum Einsatz kam, analysiert. Hierbei konnte, wie schon im Falle von *Pdu-twist* keine *Pdu-snail* Expression in Embryonen, die jünger als 20 Stunden waren nachgewiesen werden, obwohl die RT-PCR als auch die Northern Blot Analysen andere Ergebnisse zeigen. Versuche, das Transkript durch veränderte Protokolle zu detektieren, scheiterten ebenso wie bei der Analyse von *Pdu-twist*.

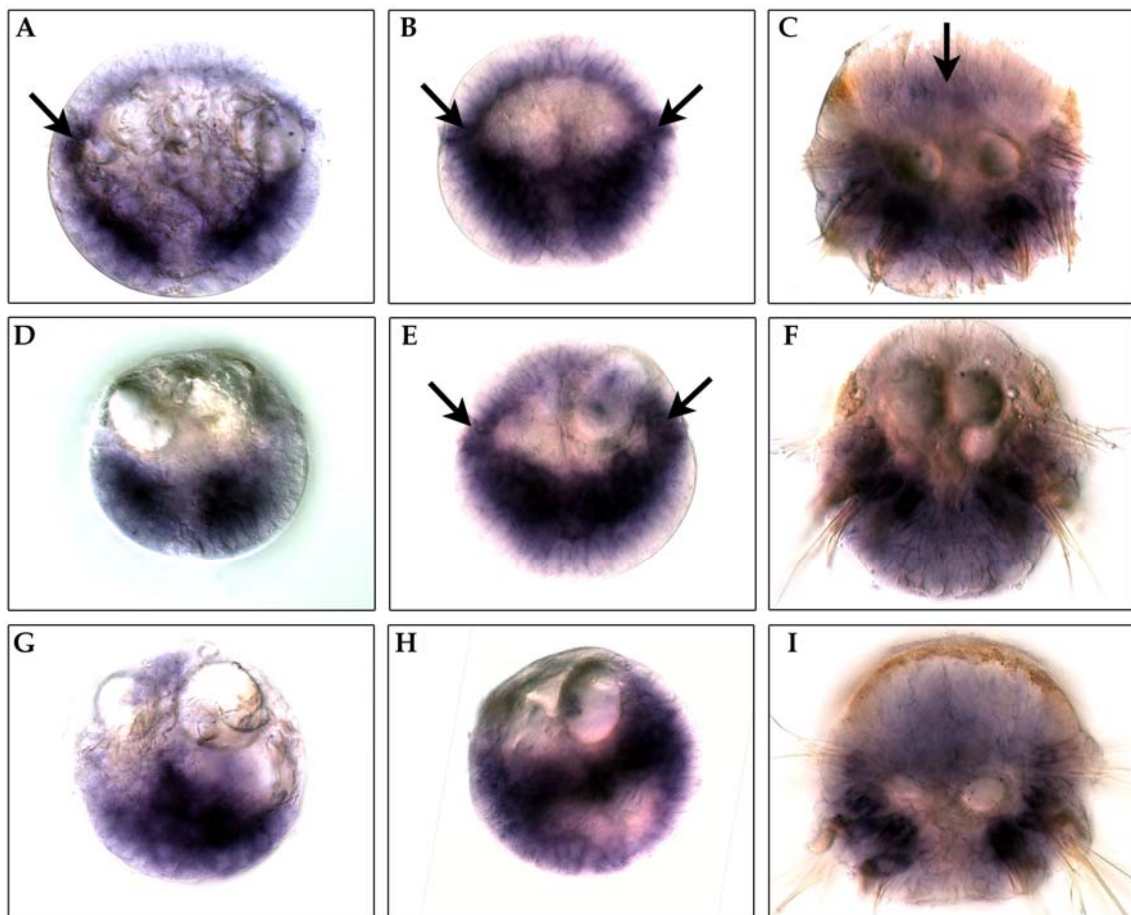


Abbildung 3.32: *In situ* Hybridisierungen mit *Pdu-snail*. (A, D, G) 20 Stunden alte Trochophorae. (B, E, H) 24 Stunden alte Trochophorae. (C, F, I) 52 Stunden alte Metatrochophorae. Das Hybridisierungssignal findet sich in den Mesodermanlagen der sich entwickelnden Larven. Neben diesem Signal sind zusätzliche Expressionsdomänen in der prätrochalen Region (schwarze Pfeile) zu sehen. (A-C) Ventrale, (D-F) dorsale, (G, H) laterale und (I) eine anteriore Ansicht.

Das erste auswertbare Hybridisierungssignal trat mit dem Erreichen der Trochophora-Larve auf. Ein erstes Hybridisierungssignal kann in zwanzig Stunden alten Trochophorae detektiert werden (Abbildung 3.32 A, D, G). Es ist in den Zellen der Mesodermanlagen und auch in einigen prätrochalen Zellen unbestimmter Herkunft der sich entwickelnden Larve lokalisiert (Abbildung 3.32, schwarze Pfeile). Die 24 Stunden alte Trochophora zeigt ein starkes Hybridisierungssignal im sich differenzierenden Mesoderm und *Pdu-snail* positiven prätrochale Zellen (Abbildung 3.32 B, E, H). Es könnte sich hierbei um Zellen der Kopfniere handeln. Bei der 52 Stunden alten Metatrochophora ist *Pdu-snail* Expression ebenfalls in den Mesodermanlagen zu finden, die Intensität des Hybridisierungssignals nimmt aber ab (Abbildung 3.32 C, F, I). In der Kopffregion sind einzelne *Pdu-sna* positive Zellen zu finden.

Bei der Analyse der Expression der *snail* Homologen und Paralogen in anderen Vertretern der Lophotrochozoa (Goldstein *et al.*, 2001; Lespinet *et al.*, 2002; Dill *et al.*, 2007) wurde immer eine ektodermale Expressionskomponente detektiert. Die Analyse des *Platynereis* Homologs zeigt, dass wahrscheinlich weder im Nervensystem noch im Neuroektoderm oder dem Endoderm *Pdu-snail* positive Zellen zu finden sind. Im Entwicklungsstadium der Trochophora sind diese offensichtlich auf die Mesodermanlagen und die vereinzelt in prätrochalen Region auftretenden Zellen beschränkt.

3.5 *Pdu-twist* und *Pdu-snail* werden während der Embryonalentwicklung von *Platynereis dumerilii* koexprimiert

3.5.1 Die mRNAs von *Pdu-twist* und *Pdu-snail* sind schon in unbefruchteten Eizellen hinterlegt und können in allen Entwicklungsstadien der Embryonalentwicklung nachgewiesen werden

Die durchgeführten entwicklungsbiologischen Analysen mittels RT-PCR und Northern Blot belegen, dass sowohl *Pdu-twist* als auch *Pdu-snail* mRNA in unbefruchteten Eizellen aus *Platynereis* Weibchen hinterlegt ist. Nach dem Beginn der zygotischen Transkription kommt es bei beiden Transkripten zu einer starken Aufregulierung des Transkriptionsniveaus, was für eine zusätzliche zygotische Komponente spricht, und während der fortschreitenden Embryonalentwicklung sind sie beide in allen untersuchten Entwicklungsstadien simultan nachweisbar (Abbildung 3.33).

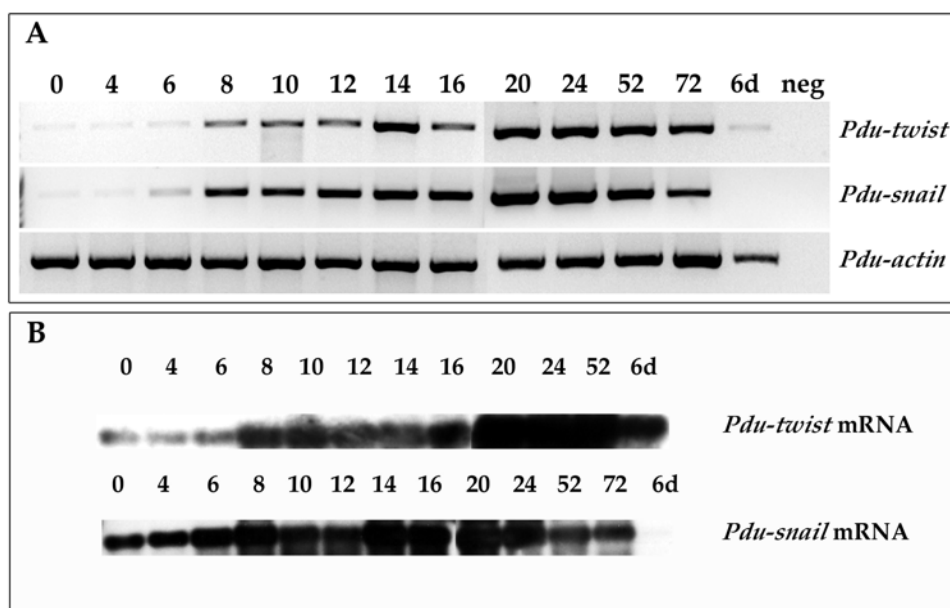


Abbildung 3.33: *Pdu-twist* und *Pdu-snail* werden während der Embryonalentwicklung koexprimiert. (A) RT-PCR Analyse der Transkripte. (B) Northern Blot Analyse der Transkripte. **Abkürzungen:** 0-72 Anzahl der Stunden nach der Befruchtung, 6d 6 Tage alter Jungwurm, neg Negativkontrolle ohne cDNA.

Da die *in situ* Hybridisierung in Entwicklungsstadien vor dem Erreichen der Trochophora keine verwertbaren Ergebnisse liefert, kann jedoch keine Aussage getroffen werden ob in diesen die zeitliche Koexpression auch mit einer räumlichen Kolo­kalisierung einhergeht.

3.5.2 *Pdu-twist* und *Pdu-snail* besitzen in den Mesodermanlagen der sich entwickelnden Trochophora gemeinsame Expressionsdomänen

Die Analyse der Transkriptlokalisierung von *Pdu-twist* und *Pdu-snail* in 24 Stunden alten Trochophorae mittels doppelter *in situ* Hybridisierung (Abbildung 3.34) zeigt eine eindeutige Kolo­kalisierung der Transkripte in den Zellen der Y-förmig angelegten Mesodermanlagen der sich entwickelnden Larve.

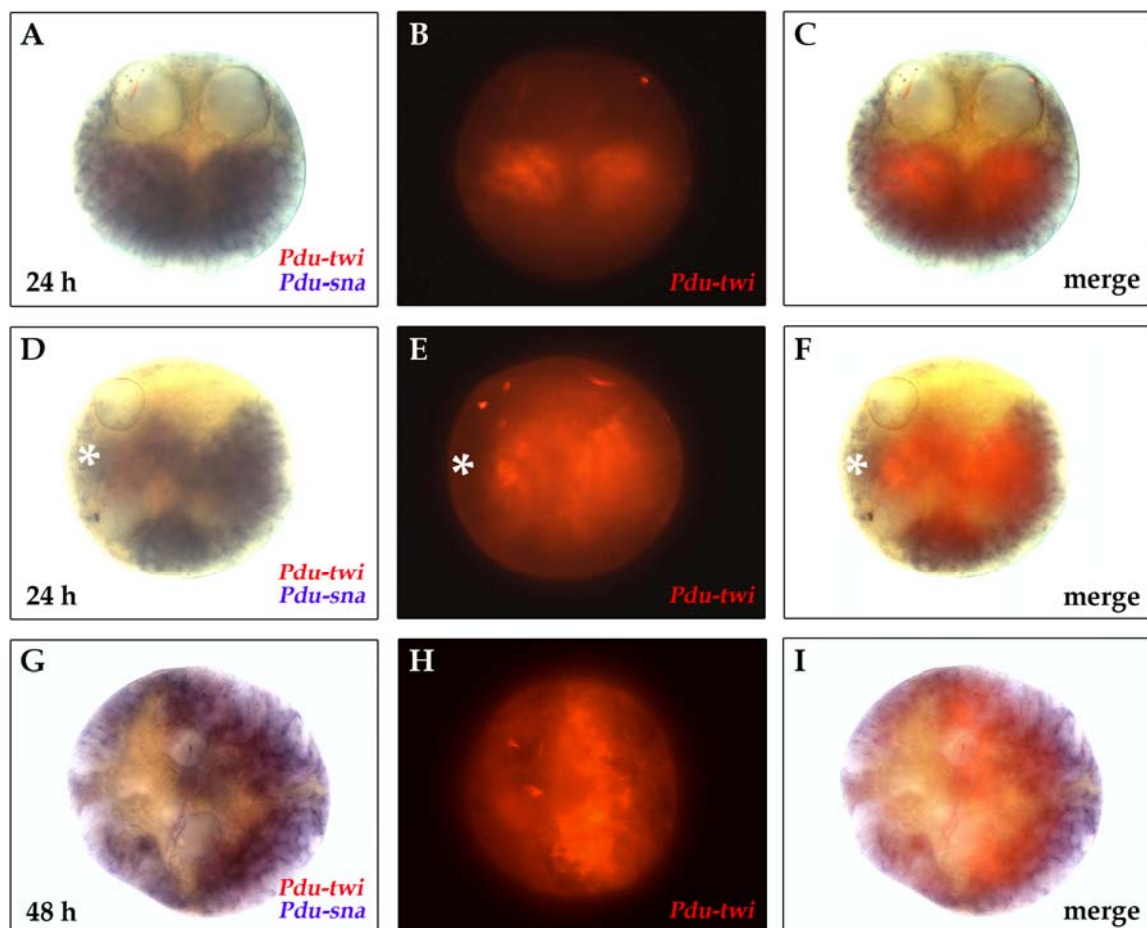


Abbildung 3.34: *Pdu-snail* und *Pdu-twist* haben gemeinsame Expressionsdomänen in den Mesodermanlagen sich entwickelnder Trochophorae. Doppel *in situ* Hybridisierung mit *Pdu-twist* (orange) und *Pdu-snail* (violett) an (A-F) 24 Stunden alten Trochophorae und (G-H) 48 Stunden alten Metatrochophorae. Beide Transkripte sind in den Mesodermanlagen der Larve kolokalisiert. (A-C) Dorsale, (D-F) laterale und (G-H) ventrale Ansicht

Während der weiteren Determination und Differenzierung des Mesoderms im Verlauf der Entwicklung zur Metatrochophora bleibt die Koexpression von *Pdu-twi* und *Pdu-sna* im Mesoderm bestehen (Abbildung 3.34 G-I).

Im weiteren Verlauf der Platynereisentwicklung bis zum dreisegmentigen Jungwurm konnte keine zusätzliche Kolokalisation der Expression festgestellt werden. Die Expression von *Pdu-twist* in den Muskelvorläuferzellen der 72 Stunden alten Trochophorae und in der Wachstumszone sechs Tage alter subadulter Würmer (Abbildung 3.4, Abbildung 3.8), ist für *Pdu-twist* exklusiv und spielt womöglich eine Rolle bei der Muskeldifferenzierung. Auch in regenerierenden *Platynereis* konnte keine Kolokalisation von *Pdu-snail* und *Pdu-twist* dargestellt werden. Auch hier scheint es sich um eine für *Pdu-twist* eigene Funktion zu handeln. Dies deutet auf eine Rolle der beiden Gene bei der Mesodermdetermination und Mesodermdifferenzierung in der Larve hin.

4 Diskussion

4.1 Eine evolutive Analyse von *Platynereis dumerilii*

Twist und Snail

4.1.1 Struktur und Funktion von *Platynereis dumerilii* Twist

Twist kodiert für einen Transkriptionsfaktor, der in *Drosophila melanogaster* für die normale Mesodermentwicklung unerlässlich ist. In seiner Sequenz enthält das Protein ein basisches helix-loop-helix-Motiv (bHLH) als funktionelle Domäne (Thisse *et al.*, 1987a; Thisse *et al.*, 1988).

Das bHLH-Motiv wurde zuerst in den DNA-bindenden Proteinen E12 und E47 in der Maus identifiziert (Murre *et al.*, 1989) und findet sich auch in der Aminosäuresequenz einer Vielzahl von Proteinen, die bei entwicklungsbiologischen Prozessen eine große Rolle spielen (Jan und Jan, 1993). Die zwei amphipathischen Helices werden durch eine Schleife mit variabler Länge verbunden, die eine wichtige Rolle in der Stabilität der Tertiärstruktur des bHLH-Motivs besitzt. Während der von basischen Aminosäuren dominierte aminoternale Teil der bHLH-Motivsequenz ein Teil der ersten Helix ist und für die DNA-Bindung benötigt wird, ist die HLH-Domäne notwendig und hinreichend, um eine Proteindimerisierung zu initiieren. (Kadesch, 1993).

Drosophila Twist stellt das Gründungsmitglied einer Unterfamilie von bHLH-Proteinen dar, der Mitglieder aus allen drei Überstämmen angehören. Eine phylogenetische Analyse der bHLH-Sequenzen der Twist Homologen und Orthologen zeigt einen Identitätsgrad zu *Drosophila* Twist, der zwischen 59 % und 85 % beträgt. Der Konservierungsgrad des bHLH-Motivs ist innerhalb der Vertebraten am höchsten, so zeigen die Aminosäuresequenzen von Mensch, Maus, Frosch, Zebrafisch und Branchiostoma, der im allgemeinen als der älteste gemeinsame Vorfahre der Vertebraten gilt, eine Homologie zwischen 85 % bis 100 %. (Castanon und Baylies, 2002). Die Analyse von Sequenzmutationen in der bHLH-Domäne, zeigt die funktionelle Wichtigkeit dieses Sequenzmotivs auf. So

sind z.B. Menschen, die Punktmutationen in der bHLH-Domäne des *Htwist* Gens auf 7p21 tragen, von dem Saethre-Chotzen Syndrom, das durch Brachyzephalie, maxillare Hypoplasie, gering- bis mäßiggradige Syndaktylien an Händen und Füßen und weiteren fakultativen Fehlbildungen charakterisiert wird, betroffen (El Ghouzzi *et al.*, 1997; Howard *et al.*, 1997).

In dem aus der Neighbour-Joining Analyse hervorgehendem Stammbaum (Abbildung 3.2) zeigt die Familie der Twist-like Transkriptionsfaktoren eine eindeutige systematische und somit wahrscheinlich auch funktionelle Abgrenzung von den Familien anderer bHLH-Transkriptionsfaktoren. Der phylogenetische Ast der Twist Homologen und Orthologen zeigt neben einer ausgeprägten Polytomie aber auch eine Clusterbildung der Vertreter der einzelnen Überstämme der Chordata, der Lophotrochozoa, der Ecdysozoa und sogar der Cnidaria. Einzig das Twist Homolog von *Caenorhabditis elegans* zeigt eine atypische Stellung an der Wurzel des phylogenetischen Baums der Familie. Dies stellt wahrscheinlich ein bei schnell evolvierenden Spezies nicht unübliches Artefakt der Neighbour-Joining Analyse dar, die sogenannte „long branch attraction“ (Bergsten, 2005).

In der traditionellen Klassifikation der bHLH Proteine, erfüllt die Twist-like Familie von bHLH-Transkriptionsfaktoren die Spezifizierungen der Klasse B. bHLH-Transkriptionsfaktoren der Klasse B werden gewebespezifisch exprimiert und bilden normalerweise Heterodimere mit bHLH-Transkriptionsfaktoren der Klasse A (Jan und Jan, 1993).

Das Potential des bHLH-Motivs als Dimerisierungsmotiv weist auf ein Regulationspotential des Transkriptionsfaktors über die Dimerisierung mit verschiedenen Partnern hin. Dies lässt sich bei anderen Familien von Klasse B bHLH-Transkriptionsfaktoren, die in Verbindung mit verschiedenen Dimerisierungspartnern transkriptionelle Aktivatoren oder Repressoren bilden, beobachten (Campuzano *et al.*, 1985; Cronmiller *et al.*, 1988; Ellis *et al.*, 1990; Garrell und Modolell, 1990; Cabrera *et al.*, 1994). *Drosophila Twist* bildet Homodimere mit sich selbst und ebenfalls Heterodimere mit dem E-Protein Homolog Daughterless (Da). Als Homodimer determiniert Twist während der Gastrulation mesodermales

Schicksal und die darauffolgende Festlegung von mesodermalen Zellen als Zellen der somatischen Muskulatur. Als Heterodimer mit Da wirkt er als Repressor der Gene, die für somatische Myogenese notwendig sind (Castanon *et al.*, 2001). Eine in der Evolution entstandene strukturelle Veränderung in der Aminosäuresequenz des bHLH Dimerisierungsmotivs könnte auf eine entstandene funktionelle und regulative Diversifikation der Twist Homologen in den einzelnen Überstämmen hindeuten, die sich eventuell in der Wahl der Dimerisierungspartner und somit auf die Rolle als transkriptioneller Aktivator oder Repressor auswirkt.

Platynereis Twist findet sich in dem Cluster, der durch die Vertreter der Lophotrochozoen gebildet wird, in systematischer Nähe zu den Twist Homologen zweier weiterer Anneliden, den Oligochaeten *Tubifex tubifex* und *Helobdella robusta*. *Helobdella robusta* zeigt als einzige bisher analysierte Spezies maternales *Hr-twist* Transkript (Soto *et al.*, 1997). Dies trifft auch auf die mRNA von *Pdu-twist* zu. Da weder die zeitliche noch die räumliche Verteilung von Hr-Twist und Pdu-Twist während der Embryonalentwicklung analysiert sind, lässt sich keine Aussage darüber treffen, ob die *Pdu-twi* und *Hr-twi* mRNAs schon maternal translatiert werden und funktionelles Protein vorliegt. Dennoch könnte die nahe phylogenetische und strukturelle Verwandtschaft der bHLH-Domänen der beiden Homologen und die in beiden Spezies vorhandene inäquale Spiralfurchung während der Frühentwicklung einen Hinweis auf eine eventuell vorhandene funktionelle Komponente der beiden bHLH-Motive der Twist Homologen geben, die schon in der befruchteten Eizelle und den darauffolgenden Embryonalstadien Einfluss auf Zellschicksale bei der Entwicklung des Embryos nimmt. Eine Regulation dieser Einflussnahme wäre über die Wahl unterschiedlicher Dimerisierungspartner in den verschiedenen Zelllinien möglich. Ebenso wäre ein zelluläres Lokalisationssignal im bHLH-Motiv denkbar, dass die Proteine inäqual auf die embryonalen Quadranten verteilt wo sie dann in der entsprechenden Zelllinie als Aktivator oder Repressor tätig werden können.

In den analysierten Twist Homologen existiert noch eine weitere konservierte Domäne, das WR-Motiv (Spring *et al.*, 2000). Es befindet sich zwischen 20 bis 55

Aminosäuren C-terminal der bHLH-Domäne. Es ist in den Cnidariern, den meisten Lophotrochozoen und den Vertebraten am höchsten, in *Drosophila*, *Branchiostoma* und *Helobdella* weniger hoch konserviert. *Caenorhabditis* Twist zeigt fast kein erkennbares WR-Motiv. Obwohl die genaue Funktion des Sequenzmotivs unklar ist, gibt es Hinweise auf eine wichtige Rolle bei der Funktion des Transkriptionsfaktors. Menschen, die eine Nonsensemutation im *Htwist* Gen direkt vor dem WR-Motiv tragen, zeigen eine abgeschwächte Form des Saethre-Chatzen Syndroms. Dies könnte auf eine Funktion der C-terminalen Region bei der allgemeine Funktionalität des Transkriptionsfaktors, der mRNA-Stabilität oder der korrekten Faltung des Proteins hindeuten (Gripp *et al.*, 2000).

Das WR-Motiv von *Platynereis dumerilii* entspricht dem, das man auch in den Twist Homologen der Vertebraten findet (Abbildung 3.1). Während die Twist Proteine der anderen untersuchten Anneliden im Vergleich zu dem in Vertebraten gefundenen Sequenzmotiv identisches WR-Motiv besitzen, findet sich in der Spezies, deren bHLH-Domäne die größte Homologie zu Pdu-Twist zeigt, nämlich *Helobdella robusta*, ein N-terminal degeneriertes WR-Motiv. Ebenfalls besitzt *Hr-twist* 5'- und 3'- der bHLH-Domäne sogenannte CAX-rich-streches, die für Sequenzmotive kodieren, für die ein Zusammenhang mit der transkriptionellen Aktivierung vermutet wird (Dymlacht *et al.*, 1989). Diese Sequenzmotive findet man auch bei *Drosophila* Twist. Bei *Platynereis* Twist sind sie jedoch nicht zu detektieren. Bei *Helobdella* handelt es sich allerdings um ein Mitglied einer Unterklasse der Clitellata, den Hirudinea. Diese wird als hoch abgeleitet angesehen, da ihre adulte Morphologie und Physiologie von denen andere Anneliden stark abweicht, was auch durch molekulare Stammbaumanalysen bekräftigt wird (Struck *et al.*, 2007). Der Furchungsmodus der Embryonalentwicklung stellt aber sowohl bei den Polychaeta, als auch den Hirudinea eine inäquale Spiralfurchung dar. Dies könnte darauf hinweisen, dass das WR-Motiv bei den Anneliden erst nach der frühen Embryogenese, z.B. bei der Determination und Differenzierung des Mesoderms, einen funktionellen Aspekt erfüllt. Ebenfalls ist es sehr wahrscheinlich, dass die Regulation der funktionellen

Aktivität von Pdu-Twist über Homo- und Heterodimerbildung im sich entwickelnden *Platynereis* Embryo vermittelt wird.

4.1.2 Struktur und Funktion von *Platynereis dumerilii* Snail

Das erste Mitglied der Snail-Familie, *snail*, wurde bei einem EMS-Screen in *Drosophila melanogaster* (Grau *et al.*, 1984; Nüsslein-Volhard *et al.*, 1984) beschrieben. Dort ist es für die Bildung der ventralen Furche und die nachfolgende Gastrulation, also für die Bildung des Mesoderms, im *Drosophila* Embryo notwendig (Alberga *et al.*, 1991). *Snail* kodiert für einen Transkriptionsfaktor des sogenannten Zink-Finger-Typs, der fünf Zink-Finger vom C₂H₂-Typ besitzt, welche als sequenzspezifische DNA-Bindemotive dienen (Boulay *et al.*, 1987; Knight und Shimeld, 2001).

Die Konsensus-Bindestelle der Snail-Transkriptionsfaktoren enthält eine Kernsequenz von sechs Basen, CAGGTG (Mauhin *et al.*, 1993; Fuse *et al.*, 1994; Inukai *et al.*, 1999; Batlle *et al.*, 2000; Cano *et al.*, 2000; Kataoka *et al.*, 2000). Dieses Sequenzmotiv entspricht der sogenannten E-Box, dem Bindemotiv von bHLH-Transkriptionsfaktoren, was nahelegt, dass die Snail Proteine mit ihnen um die Bindestellen im Promotor konkurrieren. Durch die Bindung an die E-Box-Motive in den Promotoren der Zielgene sind die Snail Proteine in der Lage als transkriptionelle Repressoren zu fungieren (Hemavathy *et al.*, 1997; Fujiwara *et al.*, 1998; Nakayama *et al.*, 1998; Batlle *et al.*, 2000; Cano *et al.*, 2000; LaBonne und Bronner-Fraser, 2000; Mayor *et al.*, 2000)

Der Besitz von vier oder fünf Zinkfingern des oben beschriebenen Typs ist charakteristisch für die Mitglieder der Snail-Superfamilie. Mitglieder dieser Familie von Zink-Finger Transkriptionsfaktoren sind sowohl bei den Deuterostomiern, als auch bei Lophotrochozoen und weiteren Ecdysozoen beschrieben.

Die Repressorfunktion wird jedoch nicht nur durch die DNA-Bindung der Zinkfinger vermittelt. In der aminoterminalen Region gibt es mindestens zwei weitere Sequenzmotive, die mit der Repressorfunktion assoziiert sind. Eines davon ist die sogenannte SNAG Domäne, die ursprünglich als die

Repressordomäne des Zinkfinger Protoonkogens Gfr1 beschrieben wurde (Grimes *et al.*, 1996). Dieses Motiv wird in Säugetierzellen für die Repressoraktivität der Snail-Proteine benötigt (Nakayama *et al.*, 1998).

Die SNAG-Domäne ist in allen Snail Ortho- und Paralogen der Vertreter der Vertebraten vorhanden. Man findet ein homologes Sequenzmotiv aber auch in den Aminosäuresequenzen der Snail Proteine von *Lytechinus variegatus*, *Branchiostoma floridae*, einem der *Patella* Paralogen sowie bei dem Anneliden *Capitella capitata*.

Drosophila Snail enthält keine SNAG-Domäne, besitzt aber ebenfalls Repressoraktivität. Diese wird durch eine Interaktion mit dem Ko-Repressor CtBP (Carboxy-terminal Binding Protein) erreicht (Nibu *et al.*, 1998). Die Konsensus Sequenzmotive für die CtBP-Bindung sind auch in anderen Mitgliedern der *Drosophila* Snail-Familien vorhanden (allerdings nicht in *scratch*) und finden sich degeneriert in den Vertretern der Vertebraten. In der Aminosäuresequenz der Snail Proteine der Lophotrochozoen finden sich keine CtBP-Bindemotive.

Platynereis Snail gruppiert sich in dem aus der Neighbour-Joining Analyse hervorgehenden phylogenetischen Stammbaum zusammen mit den *Capitella* und *Patella* Snail Homologen zu einem Lophotrochozoen-Ast der Snail-Familie ein (Abbildung 3.30). Das SNAG-Motiv ist bis auf eine Substitution mit der Konsensussequenz MPRSFLVKK, identisch. Diese Substitution findet sich allerdings auch bei den anderen analysierten *snail* Orthologen aus Lophotrochozoen. Ebenfalls wie die Vertreter der anderen Lophotrochozoen besitzt *Pdu-Snail* keine CtBP-Bindemotive. Zusammenfassend kann man postulieren, dass *Platynereis* Snail alle Eigenschaften der Snail-Superfamilie von Repressoren aufweist und es ist somit durchaus möglich, dass *Platynereis* Snail ebenfalls als spezifischer Repressor bestimmter Zielgene während der Embryonalentwicklung von *Platynereis* fungiert.

4.2 Die Rolle von *Platynereis dumerilii twist* und *snail* während der frühen Embryonalentwicklung

4.2.1 *Pdu-twist* und *Pdu-snail* sind maternal in *Platynereis* Eizellen hinterlegt

Platynereis twist mRNA lässt sich zunächst als maternales Transkript in unbefruchteten Eizellen nachweisen (3.1.3). Die einzige untersuchte Spezies, die außer *Platynereis* eine maternale *twist* Komponente besitzt stellt der Egel *Helobdella robusta* (Soto *et al.*, 1997) dar. Bei den anderen untersuchten Organismen wirken *twist* und seine Homologen immer als zygotische Effektorgene.

Twist wurde zuerst als zygotisches Gen, das für eine fehlerfreie Gastrulation und Mesodermbildung im *Drosophila* Embryo notwendig ist, identifiziert (Simpson, 1983; Thisse *et al.*, 1987a; Thisse *et al.*, 1988). *Twist* mutante Embryonen gastrulieren abnorm, bilden kein mesodermales Keimblatt und sterben am Ende der Embryogenese (Simpson, 1983). Die Transkription von *twist* wird zygotisch durch das Produkt des *dorsal* Gens aktiviert (Thisse *et al.*, 1987b; Roth *et al.*, 1989). *Dorsal* kodiert für ein maternal zu Verfügung gestelltes Protein aus der Rel/NFκB-Familie, das bei der dorsoventralen Achsendetermination eine wichtige Rolle spielt (Anderson, 1987; Roth *et al.*, 1989). In den ventralen Zellen des *Drosophila* Embryos wird das Dorsal Protein in hohen Dosen in den Kern transportiert, wo es mit dem *twist* Promotor in Wechselwirkung tritt und die Transkription von *twist* initiiert (Simpson, 1983; Jiang *et al.*, 1991; Pan *et al.*, 1991; Thisse *et al.*, 1991). Die maternale Expression der *Pdu-twi* mRNA könnte ein Hinweis darauf sein, dass die Aktivierung der *Pdu-twist* Transkription während der *Platynereis* Oogenese unabhängig von einem Gen der *dorsal*-Klasse ist. Dies wird dies ebenso für das maternale *Hro-twi* Transkript vermutet, da Dorsal Protein in *Helobdella robusta* erst in der Mitte der Embryogenese nachgewiesen werden kann (Soto *et al.*, 1997; Goldstein *et al.*, 2001). Da es ist bis jetzt noch nicht gelungen ist ein *Platynereis* Dorsal Homolog zu identifizieren lässt sich darauf keine experimentelle untermauerte Antwort geben.

Wie *Platynereis* und *Helobdella* gehört auch *Capitella capitata* zum Stamm der Anneliden. In dieser Spezies existieren zwei *twist* Paraloge, *CapI-tw1* und *CapI-tw2*, deren Expression allerdings erst während der Larvalentwicklung einsetzt (Dill *et al.*, 2007). Eine für Anneliden typische Art der maternalen *twist* Expression kann also nicht postuliert werden. Neben diesen Homologen sind die Sequenzen der *twist* Homologen von *Tubifex tubifex* und *Enchytraeus coronatus* (Brand *et al.*, 2003) bei zwei weiteren Vertretern der Anneliden bekannt. Eine Analyse der räumlichen und zeitlichen Lokalisation des Transkriptes wurde von den Autoren aber nicht durchgeführt. Die Durchführung dieser Analysen könnte weiteres Licht auf eine eventuell evolutiv konservierte Funktion einer maternalen *twist* Einlagerung in den Oocyten der Anneliden bringen.

Platynereis snail mRNA lässt sich, ebenso wie *Platynereis twist* mRNA, schon als maternales Transkript in unbefruchteten *Platynereis* Eizellen nachweisen (3.4.3). Eine vergleichbare Situation findet man bei keinem der anderen analysierten Lophotrochozoa. Sowohl bei dem Polychaeten *Capitella capitata* (Dill *et al.*, 2007), bei dem Mollusken *Patella vulgata* (Lespinet *et al.*, 2002) als auch dem Oligochaeten *Helobdella robusta* (Goldstein *et al.*, 2001) können die Transkripte der *snail* Homologen und Paralogen erst nach dem Beginn der zygotischen Transkription und während der Embryogenese nachgewiesen werden.

Maternal deponierte *snail* Transkripte sind außer bei *Platynereis* auch bei *Xenopus* (Sargent und Bennett, 1990) und *Danio* (Hammerschmidt und Nüsslein-Volhard, 1993; Thisse *et al.*, 1993) bekannt. Bei den anderen untersuchten Ecdysozoa und Deuterostomia können die entsprechenden *snail* Homologen erst mit dem Beginn der zygotischen Transkription nachgewiesen werden. Während bei *Xenopus laevis* nur verschwindend geringe Mengen an maternalen Transkript nachweisbar sind, können *Platynereis Pdu-snail* und *Danio sna-1* Transkript schon vor dem Beginn der zygotischen Transkription (Kane und Kimmel, 1993; Heimann, 2000) in nennenswerte Mengen nachgewiesen werden.

Snail wurde zuerst als zygotisches Gen bei *Drosophila melanogaster* beschrieben (Grau *et al.*, 1984; Nüsslein-Volhard *et al.*, 1984). Die mutanten Embryonen bilden kein Mesoderm und sterben am Ende der Embryogenese (Grau *et al.*, 1984). Es

wird im prospektiven Mesoderm des *Drosophila* Entwicklungsstadien exprimiert und steht unter der transkriptionellen Kontrolle von *dorsal* und *twist*, für welche *snail* mehrere Bindestellen in seinem Promotor aufweist (Leptin, 1991; Ip *et al.*, 1992b). Ob die transkriptionelle Aktivierung von *Pdu-snail* abhängig von *Pdu-twist*, welches ebenfalls maternal bereitgestellt wird, ist, oder ob ein von *Pdu-twist* unabhängiger Kontrollmechanismus vorliegt, lässt sich zum jetzigen Zeitpunkt nicht beantworten. Eine Analyse des *Pdu-snail* Transkriptionsniveaus in einer über parentale *Pdu-twist RNAi* vermittelten Funktionsverlusts-Analyse könnte darüber Aufschluss geben.

4.2.2 *Pdu-twist* wird während der Furchungsteilungen asymmetrisch in die Zellen der D-Zelllinie und den Mesoblasten 4d verteilt

Die Präsenz von *Pdu-twist* mRNA in Embryonalstadien, bei denen noch keine Trennung distinkter mesodermaler, ektodermaler und endodermaler Vorläuferzellen stattgefunden hat, lässt sich in ähnlicher Form ebenso bei dem *twist* Expressionsmuster in *Drosophila* beobachten. Auch während der *Drosophila* Embryogenese sind schon vor der Gastrulation *twist* mRNA und Protein sowohl rund um den anterioren Pol in prospektiven ektodermalen und endodermalen Zellen, als auch im prospektiven Mesoderm an der ventralen Seite des syncytialen Blastoderms zu finden (Thisse *et al.*, 1987b; Thisse *et al.*, 1988). In diesem Stadium sind die mRNA und das Protein in den ventralen Zellen überall in gleichen Dosen zu finden. Nach der Bildung des zellulären Blastoderms und zum Beginn der Gastrulation, lassen sich sowohl im anterioren Mitteldarmrudiment, das aus prospektiven endodermalen und ektodermalen Zellen besteht, als auch im prospektiven Mesoderm hohe Dosen von *twist* mRNA und Protein nachweisen (Thisse *et al.*, 1988). Erst nach dem Abschluss der Gastrulation findet sich *twist* Expression exklusiv im mesodermalen Keimblatt. Die Beobachtung, dass *Pdu-twist* mRNA Expression schon vor der Etablierung der drei Keimblätter anzutreffen ist, weist demnach durchaus Entsprechungen zwischen der frühen *Pdu-twist* Expression in *Platynereis* und der frühen *twist* Expression in *Drosophila* auf.

Bedauerlicherweise lässt sich keine *Pdu-twist* Transkriptlokalisierung in frühen Embryonalstadien durch *in situ* Hybridisierung durchführen und es steht kein spezifischer Pdu-Twist Antikörper zur Verfügung. Es ist somit nicht möglich eine eventuell inäquale Verteilung des *Pdu-twist* Transkriptes oder von Pdu-Twist in die Zelllinien des sich entwickelnden *Platynereis* Embryos direkt experimentell nachzuweisen. Dennoch gibt es mehrere aussagekräftige Hinweise auf eine zelltypische Verteilung von *Pdu-twist* und eventuell auch Pdu-Twist.

Ein charakteristisches Merkmal von *Platynereis* stellt die Spiralfurchung während der Embryogenese dar, ein Muster von festgelegten asymmetrischen Furchungen, das auch die meisten anderen Lophotrochozoen während ihrer Entwicklung zeigen. Die ersten beiden asymmetrischen Teilungen führen zu den quantitativ und auch qualitativ unterschiedlichen embryonalen Quadranten A, B, C und D (Dorresteijn *et al.*, 1987; Dorresteijn, 1990; Dorresteijn und Eich, 1991; Dorresteijn und Graffy, 1993; Dorresteijn *et al.*, 1993; Fischer und Dorresteijn, 2004; Dorresteijn, 2005). Die folgenden Furchungen erzeugen aus den embryonalen Quadranten Zelllinien, deren Zellschicksal aufgrund der Arbeit von E.B. Wilson an *Nereis limbata* (Wilson, 1892) und in letzter Zeit durchgeführter Untersuchungen (Dorresteijn, 1990; Schneider *et al.*, 1992; Ackermann *et al.*, 2005) zum größten Teil bekannt sind. Von größtem Interesse ist hierbei die Mikromere 4d, die aus dem D-Quadranten hervorgeht und den Mesoblasten, die Gründerzelle der mesodermalen Zelllinie von *Platynereis dumerilii*, darstellt (Wilson, 1892; Dorresteijn, 1990; Ackermann *et al.*, 2005). Der Mesoblast teilt sich bilateralsymmetrisch und orthogonal zur animal/vegetalen Achse und markiert somit den Übergang vom spiralförmigen Furchungsmodus zur bilateralsymmetrischen Organisation der Larve. Der Mesoblast enthält eine große Menge an klarem Zytoplasma, das während der vorherigen Furchungen asymmetrisch und disproportional auf die einzelnen Zelllinien verteilt wurde. Von diesem animalen Polplasma wird angenommen, dass es zytoplasmatische Determinanten für die Zelllinie des embryonalen D Quadranten, im Speziellen für 2d und 4d enthält, da diese beiden Blastomeren den größten Teil des Plasmas zugeteilt bekommen (Dorresteijn, 1990; Schneider *et al.*, 1992; Dorresteijn, 2005).

Während der Embryonalentwicklung können Zellschicksale sowohl durch Zell-Zell-Kommunikation, als auch durch die asymmetrische Verteilung von zytoplasmatischen Determinanten generiert werden. Das Grundprinzip, dass mRNA Transkripte asymmetrisch und spezifisch auf Tochterzellen oder Zelllinien verteilt werden, findet sich öfters im Tierreich. Bei Hefen werden mRNAs durch den direkten, aktiven Transport an Actin-Filamenten entlang, asymmetrisch in die Tochterzellen verteilt (Long *et al.*, 1997; Takizawa *et al.*, 1997). Bei *Drosophila* und *Caenorhabditis* binden Determinanten vor der Teilung an spezielle Regionen im Zellkortex. Das Kortikalmaterial mit den gebundenen Determinanten wird dann durch die nachfolgende Teilung auf die Schwesterzellen verteilt. (Spana und Doe, 1995; Boyd *et al.*, 1996; Lu *et al.*, 1999). Bei den Furchungen des Spiraliens *Ilyanassa obsoleta* findet vor den Furchungsteilungen eine mikrotubuliabhängige Akkumulation von maternalen mRNAs an der perizentriolaren Matrix (PZM) der Blastomeren statt, von wo die Transkripte dann actinabhängig asymmetrisch in den präsumptiven Zellkortex der beiden Tochterzellen transportiert werden. Die darauffolgende mitotische Teilung verteilt die mRNAs dann exklusiv in eine der beiden Tochterzellen (Lambert und Nagy, 2002).

Die zygotische Transkription setzt bei *Platynereis dumerilii* erst nach der Bildung von 4d ein (Dorresteijn, 1990; Heimann, 2000). Mit Cytochalasin B furchungsarretierte Embryonen zeigen nach 24 Stunden Entwicklung nur in dieser Zelle *Pdu-twist* Transkript. Nach der sechsten Teilung und der Bildung von 4d¹ und 4d² zeigen furchungsarretierte Embryonen nach 24 Stunden Entwicklung ebenfalls nur in diesen beiden Gründerzellen der bilateralsymmetrischen Mesodermbändern *Pdu-twist* Expression (3.1.5). Wäre das maternale *Pdu-twist* Transkript bis zum Zeitpunkt der Arretierung auch in andere Zelllinien, als die des Mesoblasten verteilt worden, hätte auch in anderen Blastomeren *Pdu-twist* Expression nachweisbar sein müssen. Die Analyse des *Pdu-twist* Expressionsmusters der furchungsarretierten Embryonen legt somit den Schluss nahe, dass während der ersten fünf Furchungen das *Pdu-twist* Transkript sukzessive, exklusiv in den Mesoblasten verteilt wird. Welcher Mechanismus dieser Verteilung von *Pdu-twist* mRNA in die mesodermale Zelllinie zu Grunde

liegt kann aufgrund der methodischen Probleme bei der *in situ* Transkriptlokalisierung in frühen Embryonen nicht zufriedenstellend experimentell geklärt werden. Dennoch ist ein Mechanismus der mRNA-Verteilung, der dem bei dem Mollusken *Ilyanassa obsoleta* (Lambert und Nagy, 2002) existierenden ähnlich ist, als wahrscheinlich anzusehen. Dass β -Catenin und Vasa Protein während der frühen Embryonalentwicklung asymmetrisch in animale und vegetale Blastomeren des *Platynereis* Embryos verteilt werden, ist beschrieben worden (Rebscher *et al.*, 2007; Schneider und Bowerman, 2007). Ob ein ähnlicher Mechanismus auch für maternale mRNAs existiert, ist nicht bekannt aber anzunehmen. Obwohl eine direkte Lokalisierung von *Pdu-twist* mittels *in situ* Hybridisierung nicht möglich ist, könnte eine zelllinienspezifische Verteilung des *Pdu-twist* Transkriptes über *in situ* RT-PCR (Nuovo, 1996) oder RT-PCR mit blastomerenspezifischer RNA aus isolierten Blastomeren als Matrize auch experimentell analysiert werden. Ebenso wäre die Injektion von fluoreszenzmarkiertem *in vitro* transkribiertem *Pdu-twist* in die Zygote und die *in vivo* Analyse dessen Verteilung während der Furchungen denkbar. Da bei *Platynereis* der „mRNA turnover“, also die Halbwertszeit der mRNA nicht bekannt ist, kann natürlich nicht ausgeschlossen werden, dass das maternale Transkript in den anderen Zelllinien in denen es ursprünglich vorhanden war aber nicht mehr weiter transkribiert wurde, auf unter die Nachweisgrenze degradiert wurde. Neben dem Nachweis des Transkriptes wäre es deswegen wünschenswert die zeitliche und räumliche Verteilung des Pdu-Twist Proteins analysieren zu können.

Die *Platynereis twist* mRNA kann zwar schon maternal und vor der Midblastula Transition, sowie seine inäquale Verteilung in die 4d Zelllinie, nachgewiesen werden, es sind aber keine Daten darüber vorhanden, ob funktionelles Pdu-Twist vorhanden ist. Dennoch kann man einige Hinweise auf ein eventuelles Vorhandensein von Pdu-Twist in der frühen Embryonalentwicklung finden. Sowohl für *Platynereis β -catenin* (Schneider und Bowerman, 2007), als auch für *Pdu-vasa* (Rebscher *et al.*, 2007) ist bekannt, dass neben dem mRNA Transkript auch das entsprechende Protein in den sich entwickelnden Embryonen schon vor

dem Beginn der zygotischen Transkription vorhanden ist. Dies spricht dafür, dass diese Proteine schon während der Oogenese translatiert und maternal in der Oocyte deponiert, oder nach der Besamung synthetisiert wurden. Entsprechendes könnte auch für Pdu-Twist gelten, kann aber nur durch die Analyse der Pdu-Twist Expression mit einem spezifischen Antikörper dargebracht werden.

4.2.3 *Pdu-snail* kann in allen Furchungsstadien nachgewiesen werden

Im Gegensatz zu *twist*, das auch im Mesektorderm und Neuroektoderm exprimiert wird, beschränkt sich die Expressionsdomäne von *snail* auf das präsumptive Mesoderm der *Drosophila* Embryonen. Dies trifft für *Pdu-snail* sowie für *Danio sna-1* nicht zu. Die *sna-1* Expression findet sich bis zum Blastulastadium zunächst ubiquitär in allen Blastomeren, also in den Zelllinien aller drei Keimblätter. Sie wird im Verlauf der Gastrulation aber immer mehr auf die Vorläuferzellen der mesodermalen Zelllinien eingeschränkt und findet sich nach Beendigung der Gastrulation in den Vorläuferzellen der Muskulatur und des Schwanzmesoderms (Hammerschmidt und Nüsslein-Volhard, 1993; Thisse *et al.*, 1993). *Pdu-snail* Transkript lässt sich maternal und in allen darauffolgenden Embryonalstadien nachweisen (3.4.3). Es ist somit nicht auf die mesodermale Zelllinie eingeschränkt. Durch die methodischen Probleme bei der *in situ* Transkriptlokalisierung in frühen Embryonen kann keine Aussage darüber getroffen werden, ob *Pdu-snail* im Verlauf der ersten Furchungen auf verschiedene embryonale Quadranten und somit auf spezifische Zelllinien verteilt wird oder in den Vorläuferzellen aller drei Keimblätter zu finden ist. Eine Expressionscharakterisierung über *in situ* RT-PCR (Nuovo, 1996) oder RT-PCR mit RNA aus isolierten Blastomeren als Matrize könnte darüber Aufschluss geben. Ebenso wäre eine über Furchungsarrest mit Cytochalasin B vermittelte Zelllinienanalyse denkbar. In dieser Art durchgeführte Analysen blieben bis um jetzigen Zeitpunkt aber ohne verwertbares Ergebnis.

Während bei *Danio rerio* das Expressionsmuster des *Sna-1* Proteins sich identisch mit dem des mRNA Transkriptes darstellt (Hammerschmidt und Nüsslein-Volhard, 1993), sind über die räumliche und zeitliche Verteilung von

Pdu-Snail während der frühen Embryonalentwicklung keine Informationen verfügbar. Die Herstellung eines spezifischen Antikörpers gegen Pdu-Snail würde eine genauere Analyse des Translationsstarts von *Pdu-snail* und der räumlichen und zeitlichen Verteilung von Pdu-Snail ermöglichen.

4.2.4 *Platynereis twist* Expression wird für die embryonale Achsenbildung benötigt

Die Keime der Spiraler galten früher aufgrund der immer gleichen, vorhersagbaren Entwicklungsschicksalen der Blastomeren und der hohen Präzision, mit der das spiralförmige Furchungsmuster bei jedem Keim einer Art eingehalten wird, als typische "Mosaikkeime" (Wilson, 1928; Schleip, 1929). Inzwischen gibt es jedoch zahlreiche experimentelle Befunde, die belegen, dass Spiralerkeime ebenfalls ein hohes regulatives Potential aufweisen und das Entwicklungsschicksal sehr vieler Blastomeren nicht oder zumindest nicht alleine aufgrund ihrer Herkunft, sondern vielmehr aufgrund ihrer Position im Keim bestimmt oder modifiziert wird (Dorresteyn und Eich, 1991; Heimann, 2000; Lambert und Nagy, 2001; Depner, 2002; Lambert und Nagy, 2003).

Dabei wirken insbesondere zwei Zellen aus dem D-Quadranten (3D, 4d) als Organisatoren. Diese bestimmen über Zell-Zell-Kontakte das Schicksal benachbarter Blastomeren und lassen ein dorsoventral polarisiertes und bilateralsymmetrisches Muster der Organanlagen entstehen. Hierbei legt die Position des D-Quadranten die dorsoventrale Körperachse fest und die Determination des D-Quadranten stellt das initiale Ereignis, sowohl für die Etablierung der dorsoventralen Körperachse, als auch in der Folge für die positionsgerechte Determination und Differenzierung der Blastomeren dar (Clement, 1962; Cather und Verdonk, 1979; Martindale, 1986; Damen und Dictus, 1996).

Bei inäqual furchenden Spiraliern entstehen durch die ersten beiden inäqualen Furchungsteilungen vier unterschiedlich große Blastomeren. Die größte dieser vier Blastomeren enthält überproportional viel dotterfreies Zytoplasma und wird durch diese Eigenschaft zur Gründerzelle des D-Quadranten determiniert. Durch

die Arbeit von Dorresteiijn und Eich (Dorresteiijn *et al.*, 1987; Dorresteiijn und Eich, 1991) ist bekannt, dass eine experimentell hervorgerufene äquale Verteilung von klarem Zytoplasma auf die embryonalen Quadranten des Zweizellstadiums von *Platynereis* Duplikationen der Körperachsen bewirkt. Insbesondere eine Duplikation der 2d- oder 4d-Zelle brachte sogenannte „Janus-Monster“ hervor, die durch eine komplette Verdopplung der Körperachsen, charakterisiert sind. Dieses Zytoplasma muss also morphogenetische Faktoren enthalten, die die Zelle die es enthält, als Gründerzelle des D-Quadranten und damit als Stammzelle des Mesoblasten 4d, sowie des embryonalen Organisators determiniert. (Cather *et al.*, 1976; Guerrier *et al.*, 1978; Astrow *et al.*, 1987; Dorresteiijn *et al.*, 1987; Dorresteiijn und Eich, 1991). Dorresteiijn (Dorresteiijn, 1990) hat durch morphometrische Vermessung nachgewiesen, dass die Zellzyklusdauer der *Platynereis* Blastomeren sich reziprok zu ihrem Gehalt an klarem Zytoplasma verhält. Diese schon früh in der Embryonalentwicklung auftauchenden, auffälligen Zellzyklusasynchronien und die damit korrelierenden Unterschiede im Gehalt an klarem Zytoplasma deutete Heimann (Heimann, 2000) als integrativen Bestandteil des Determinationsgeschehens und untersuchte den Einfluss der differentiellen Zellzyklusregulation auf die Embryogenese von *Platynereis*. Die resultierenden Phänotypen seiner, und die der nachfolgend von Depner (Depner, 2002) durchgeführten, Experimente mit dem cdc2/cdk2-Hemmer Olomoucine (Vesely *et al.*, 1994) und der daraus resultierenden Synchronisierung der Zellzyklen in allen Blastomeren, waren durch eine starke Störung der dorsoventralen Polarität charakterisiert. Dies zeigte auf, dass die rasche Proliferation der Zellen des D-Quadranten Voraussetzung für die korrekte Etablierung der dorsoventralen Körperachse und damit auch für die positionsabhängige Determination benachbarter Blastomeren ist (Heimann, 2000; Depner, 2002).

Im Keim von *Platynereis* werden die Zellzyklen der embryonalen Furchungen durch die Aktivität eines Komplexes aus Cdc2/Cyclin B-Kinase gesteuert (Heimann, 2000). Dieser unterliegt einer positiven Regulation durch die Phosphatase Cdc25/string, die während der G2/M-Phasen Transition zwei inhibierende Phosphate von der Cdc2-Untereinheit entfernt (Millar und Russell,

1992). Sowohl in den Postblastodermzellen von *Drosophila* (Edgar *et al.*, 1994), in *Schizosaccharomyces pombe* (Moreno *et al.*, 1990), als auch in *Patella* (van der Kooij *et al.*, 1998) werden sowohl *Cyclin B* als auch *cdc25* im Verlauf der Interphase jedes Zellzyklus neu transkribiert und translatiert und die Proteine nach dem Abschluss der Mitose rapide degradiert. Je früher die Titer von *Cyclin B* und *cdc25* einen kritischen Wert erreichen, desto früher beginnt der Eintritt aus der G2 in die M-Phase.

In *Drosophila* haben durch ChIP-on-chip vermittelte Promotorbindungsanalysen gezeigt, dass unter anderem die zellzyklusregulierenden Faktoren *Cyclin A*, *Cyclin B*, *Cyclin E* und das *cdc25* Homolog *string* direkte Zielgene von *Twist* während der Bildung der ventralen Furche und der Gastrulation darstellen (Sandmann *et al.*, 2007). Diese Untersuchungen stehen im Einklang damit, dass *twist* mutante *Drosophila* Embryonen neben Defekten bei der Gastrulation auch Proliferationsdefekte zeigen (Arora und Nüsslein-Volhard, 1992).

Das *Pdu-twist* Transkript und eventuell auch Pdu-Twist werden während der ersten Furchungen in die Blastomeren des D-Quadranten, die auffallend kurze Zellzyklusdauern zeigen (1D, 2D, 3D, 4d), verteilt. Pdu-Twist könnte somit durch eine erhöhte transkriptionelle Aktivierung von *cdc25* und/oder *Cyclin B* in den aus dem D-Quadranten proliferierenden Zellen einen direkten zelllinienspezifischen Einfluss auf die Regulation der Zellzyklusdauern und somit auf die Determination der Dorsoventralachse des Embryos ausüben. Eine zelllinienspezifische Steuerung der Zellteilungszyklen durch eine alternierende *cdc25*-Expression findet sich sowohl im Keim des Egels *Helobdella*, was möglicherweise in direktem Zusammenhang mit deren unterschiedlicher Zellzyklusdauer steht (Bissen, 1995), als auch und im Postblastodermstadium des *Drosophila*-Embryos. Hier wird die jeweilige Dauer der asynchronen Zellzyklen durch periodische *cdc25*-Expression reguliert (Edgar *et al.*, 1994).

Eine in dieser Arbeit über parentale *RNAi* (Fire *et al.*, 1998) vermittelte funktionelle Analyse von *Pdu-twist* (3.1.8) zeigt unter anderem Phänotypen, die sich durch eine gestörte dorsoventrale Achsenbildung sowie Störungen bei der

Proliferation der Blastomeren und der epibolischen Gastrulation auszeichnen. Sie ähneln in ihrem Phänotyp denjenigen, die in den Experimenten mit dem *cdc2/cdk2*-Hemmer Olomoucine (Vesely *et al.*, 1994) erhalten wurden (Heimann, 2000; Depner, 2002). Diese Analyse zeigt, dass *Platynereis twist* und *Platynereis Twist* direkt bei der Etablierung des bilateralsymmetrischen Musters in dem sich entwickelnden *Platynereis* Keim involviert sind und der Verlust ihrer Funktion mit dem Verlust der Normalentwicklung und der Achsendetermination im Embryo einhergeht. Da *Pdu-twist* während der frühen Embryonalentwicklung sukzessiv den Blastomeren des D-Quadranten zugeteilt wird und schließlich exklusiv in 4d vorkommt, ist ein Zusammenhang zwischen *Pdu-twist* Expression und der Determination des D-Quadranten sowie der darauffolgenden Etablierung des embryonalen Organisators sehr wahrscheinlich.

Heimann und Depner (Heimann, 2000; Depner, 2002) gehen davon aus, dass durch die fehlenden Furchungsasynchronien, der embryonale Organisator nicht korrekt etabliert werden kann und somit keine ortsabhängige Induktion umliegender Blastomeren stattfinden kann. Die morphologischen Ähnlichkeiten der Phänotypen der Olomoucine-Untersuchungen und der *Pdu-twist RNAi* Analyse könnten somit durch die fehlende Steuerung der Länge der embryonalen Zellzyklen durch *Pdu-Twist*, und der dadurch fehlenden Etablierung des embryonalen Organisators begründet sein. Eine experimentelle Überprüfung steht hier allerdings noch aus. Hierzu müsste man den Gehalt an *Pdu-Twist* in Korrelation mit dem Gehalt an *Pdu-Cdc25* und/oder *Pdu-Cyclin B* in den Blastomeren setzen. *Platynereis cdc25/string* ist bis dato als Fragment kloniert worden. Eine über blastomerenspezifische mRNA vermittelte quantitative RT-PCR Analyse könnte einen Vergleich der *Pdu-twist* und *Pdu-cdc25* Transkriptionsintensitäten und weitere Aussagen über einen eventuellen Zusammenhang ermöglichen. Ebenso wäre die Injektion von „gecappter“, also zur Translation bereiter, *Pdu-twist* mRNA oder *in vitro* translatiertem *Pdu-Twist* in einzelne Blastomeren denkbar. Die erforderliche Injektionstechnik wurde von Ackermann (Ackermann *et al.*, 2005) etabliert. Ein eventuell vorhandener

Pdu-Twist Einfluss auf die Länge der embryonalen Zellzyklen müsste sich dann durch eine Veränderung der Zellzyklen in den injizierten Blastomeren zeigen.

Die Frage, ob die Induktion des embryonalen Organisators im *Platynereis* Embryo nur durch die Furchungsasynchronien bedingt ist, oder ob Pdu-Twist bei der Etablierung der molekularen Identität des Organisators eine entscheidende Rolle spielt, kann nicht direkt beantwortet werden. Ebenso denkbar wäre eine Kombination beider Teilaspekte, was bedeuten würde, dass die Regulation der Zellzyklen in den D-Quadrant Blastomeren durch Pdu-Twist eine Voraussetzung für die Etablierung der molekularen Identität des embryonalen Organisators durch Pdu-Twist darstellt. Dieser Aspekt wird im nächsten Kapitel weiter diskutiert.

4.2.5 Die Etablierung des embryonalen Organisators ist von *Platynereis twist* abhängig

In dem inäqual spiralg furchenden Mollusken *Ilyanassa obsolata* stellt die Zelle 3D den sogenannten embryonalen Organisator dar. Deletionsexperimente und Zelllinienanalysen haben gezeigt, dass die Signalwirkung des 3D-Organisators für die Etablierung der dorsoventralen Polarität benötigt wird (Clement, 1962; Martindale, 1986; Render, 1991; Render, 1997; Sweet, 1998). Die Etablierung des Organisators geht mit dem während der Embryonalentwicklung erstmaligen Auftreten von mitogen-activated Protein Kinase (MAPK) p44^{ERK1}/p42^{ERK2} Aktivität im Organisator 3D einher. Inhibiert man die MAPK-Aktivität, gehen die durch die 3D-Zelle induzierten Zellschicksale verloren (Lambert und Nagy, 2001). Einen Zusammenhang mit der Aktivierung des MAPK-Signalwegs und der Organisatorrolle einer Blastomere findet sich sowohl in anderen Mollusca als auch bei einem Polychaeten. Inhibierung des MAPK-Signalwegs führt auch hier zu einem Verlust der Ziellinien, die normalerweise durch die Induktion des Organisators induziert werden (Lambert und Nagy, 2001; Lartillot *et al.*, 2002; Lambert und Nagy, 2003; Lambert, 2007). MAPK-Aktivität ist ebenfalls bei der Spezifizierung von 4d als Mesentoblast in *Ilyanassa* notwendig. Inhibiert man den MAPK-Signalweg bei der Bildung von 4d, resultiert das in dem

Verlust mesodermalen Zellschicksals und dem Ausbleiben der Bildung mesodermaler Derivate (Lambert und Nagy, 2001). Bei dem äqual spiralförmig furchenden Polychaeten *Hydroides* findet die Aktivierung des MAPK-Signalwegs allerdings in 4d statt. Dies geschieht nicht direkt nach der Entstehung der Mikromere sondern während der Entstehung von 2d², also zu dem Zeitpunkt der bei *Hydroides* den Übergang vom spiral zu radialsymmetrischen Furchungsmuster darstellt und somit die Etablierung der zweiten Achse des Embryos markiert. Lambert (Lambert, 2007) postuliert eine heterochrone Verschiebung bei der Etablierung des embryonalen Organisators um einen Furchungszyklus nach hinten, so dass diese nun in 4d stattfindet.

Bei *Drosophila* zeigen neuere Untersuchungen, dass die Promotoren vieler Gene, die für die Aktivierung der MAPK Signalkaskade verantwortlich oder Teile der Signaltransduktionskaskade sind, Bindemotive für Twist besitzen. *In vivo* Untersuchungen ergaben, dass schon vor der Gastrulation die *Drosophila* Homologe der Fibroblastenwachstumsfaktoren (FGF) *branchless* (*bln*) und *pyramus* (*pyr*) und *thisbe* (*ths*), sowie die Homologe der Fibroblastenwachstumsfaktorrezeptoren (FGFR1/2) *breathless* (*btl*) und *heartless* (*htl*), die unter anderem für die Aktivierung des MAPK-Signalwegs im *Drosophila* Mesoderm zuständig sind (Beiman *et al.*, 1996; Gisselbrecht *et al.*, 1996; Gabay *et al.*, 1997; Shishido *et al.*, 1997; Michelson *et al.*, 1998; Vincent *et al.*, 1998; Imam *et al.*, 1999; Wilson *et al.*, 2005), direkte Zielgene von Twist darstellen (Sandmann *et al.*, 2007). Bei *C. elegans* wurde ebenfalls *in vivo* die Bindung von CeTwist an E-Boxen in den Promotoren des NK-Klasse Homeodomänenengens *ceh-24* (*tinman*) und des FGFR-Gens *egl-15* (*heartless*) sowie deren transkriptionelle Regulation durch CeTwist nachgewiesen (Harfe und Fire, 1998).

Die sukzessive Verteilung von *Pdu-twist* in die Zelllinie des D-Quadranten und schließlich seine ausschließliche Verteilung in 4d könnte somit eine mögliche exklusive Aktivierung des MAPK-Signalwegs in 3D oder 4d durch Pdu-Twist und die hierüber vermittelte Aktivierung eines embryonalen Organisatorprogramms in dieser Blastomere ermöglichen. Dieses embryonale Organisatorprogramm könnte bei der inäqualen fünften Furchung sowohl zur Determination von 4d als

Mesoblasten, also auch zu einer eventuellen positionsgerechten Induktion umliegender Blastomeren führen.

Bei *Platynereis* war es bis jetzt aufgrund methodischer Probleme noch nicht möglich einen direkten experimentellen Nachweis von MAPK-Aktivität in 4d oder 3D zu führen oder Experimente mit Inhibitoren der MAPK-Aktivität auszuwerten. Das Auftreten von ähnliche Phänotypen bei den durch Lambert (Lambert und Nagy, 2003) durchgeführten, vergleichenden Experimenten mit Inhibitoren der MAPK-Aktivität bei verschiedenen Spiraliern, weist aber stark auf eine Konservierung eines in dieser Art regulierten Mechanismus in den Spiralia und somit auch bei *Platynereis* hin. Ebenso könnte der Beginn der zygotischen Transkription mit der Bildung von 4d¹ und 4d² bei der sechsten Furchung einen Hinweis auf eine mögliche MAPK-Aktivierung in 4d geben. Bei *Xenopus* wird nach der Midblastula Transition (MBT), die ebenfalls den Beginn von Furchungsasynchronien bedeutet, durch Ras aktiviertes MAPK-Signalling die zygotische Transkription aktiviert (Andéol *et al.*, 1990; Andéol, 1994).

In *Platynereis* beschreiben Schneider und Bowmann (Schneider und Bowerman, 2007) ein binäres Zellschicksalspezifizierungsmodul während der frühen Embryonalentwicklung, das auf der inäqualen nukleären Konzentration von β -Catenin in den animalen und vegetalen Schwesterzellen beruht und weisen über GSK-3 β Inhibitor vermittelte Experimente eine Beteiligung des Wingless-Signalwegs bei diesen Entscheidungen nach. Eine ektopische Stabilisierung von β -Catenin in 4d durch einen GSK-3 β Inhibitor führt zum Verlust des mesodermalen Zellschicksals. Die entstehenden Phänotypen zeigen ebenfalls Störungen bei der Achsenbildung und der epibolischen Gastrulation, wie sie auch bei den Olomouc-Experimenten von Heimann und Depner (Heimann, 2000; Depner, 2002) als auch bei den *Pdu-twist RNAi* Experimenten in dieser Arbeit auftraten. Dies deutet darauf hin, dass die, durch Inhibierung von GSK-3 β vermittelte, ektopische Aktivierung des Wnt-Signalwegs in 4d die Etablierung des embryonalen Organisators, bzw. seine molekulare Identität stört.

Wie die Expression von *Pdu-twist* in der D-Zelllinie und speziell in 3D und 4d, die eventuelle Aktivierung des MAPK-Signalwegs, die Repression des

Wnt-Signalwegs und die Etablierung des embryonalen Organisators miteinander in Verbindung stehen könnten, muss noch weiter durch den Nachweis des MAPK-Aktivators *Pdu-fgfr* (Steinmetz, 2002) durch *in situ* RT-PCR (Nuovo, 1996) und den Nachweis von aktivierter MAPK experimentell untersucht werden. Eine funktionelle Untersuchung wäre durch Experimente mit Inhibitoren des FGFR- und MAPK-Signalwegs, sowie durch parentale *Pdu-fgfr RNAi* möglich. Die durch parentale *Pdu-twist RNAi* vermittelten funktionellen Untersuchungen weisen auf jeden Fall auf einen Zusammenhang zwischen *Pdu-twist* Expression und der Etablierung einer Organisatorfunktion hin, da ohne *Pdu-twist* keine wildtypische Etablierung der embryonalen Achsen und keine gerichteten Gastrulationsbewegungen stattfinden können. Eine Möglichkeit dies weiter experimentell zu überprüfen, bestände in der Injektion von *in vitro* translatiertem Pdu-Twist oder gekapptem *Pdu-twist* in die AB- oder die C-Blastomere. Ist die *Pdu-twist* Expression mit der Etablierung eines embryonalen Organisators assoziiert, muss durch die Injektion ein zweiter ektopischer Organisator etabliert und eventuell ein zweites Achsensystem induziert werden können, wie dies bei den Cytochalasin B und Zentrifugationsexperimenten von Dorresteijn und Eich (Dorresteijn *et al.*, 1987; Dorresteijn und Eich, 1991) der Fall war.

4.3 Die Rolle von *Platynereis twist* und *snail* bei der Mesodermdetermination und Gastrulation

Mit der Bildung der Mikromeren 4d¹ und 4d² aus 4d sowie 2d¹¹²¹ und 2d¹¹²² aus 2d¹¹² endet die Spiralfurchung dieser beiden Zelllinien im *Platynereis* Embryo und es beginnt deren bilateralsymmetrische, proliferative Phase. Durch die darauffolgenden epibolischen Gastrulationsbewegungen und mitotischen Teilungen umwachsen die proliferierenden Nachkommen von 2d¹¹² die Makromeren 4A-D und das, durch die ebenfalls proliferierenden Nachkommen von 4d¹ und 4d² gebildeten, Anlagen des prospektiven Mesoderms. Diese treffen ventral an der Grenze zwischen der 4A und 4B Blastomere aufeinander und bilden ein hufeisenförmiges Gewebeband, das sich vom posterioren (vegetalen) Pol der

Larve an den Seiten der Hyposphäre Richtung Prototroch ausbreitet. (Wilson, 1892; Anderson, 1966; Dorresteyn, 1990; Ackermann *et al.*, 2005).

Während Twist in *Drosophila* sowohl für die Induktion des Mesoderms und die Gastrulation, als auch für die embryonale und adulte Myogenese zuständig ist, implizierten die Untersuchungen von Twist Homologen anderer Spezies keine Konservierung der Funktionen bei Gastrulation und Mesodermspezifizierung außerhalb der Insecta (Castanon und Baylies, 2002; Nederbragt *et al.*, 2002; Handel *et al.*, 2005; Yamazaki *et al.*, 2005; Dill *et al.*, 2007; Price und Patel, 2007).

Überraschenderweise exprimieren die wahrscheinlich pluripotenten Zellen des präsumptiven Mesoderms von *Platynereis*, genauso wie die Zellen des prospektiven Mesoderms in *Drosophila*, das *twist* Homolog *Pdu-twist* (3.1.4). Auch wenn dies das erste Mal ist, dass außerhalb der Insecta ein Zusammenhang zwischen Mesodermspezifizierung und *twist* Expression gefunden wurde, so bestehen doch gravierende Unterschiede bei der Embryonalentwicklung der beiden Spezies.

So besteht bei *Drosophila* das präsumptive Mesoderm aus einem Feld pluripotenter Zellen (Beer *et al.*, 1987; Farrell und Keshishian, 1999), die den Transkriptionsfaktor Twist exprimieren (Leptin, 1991; Baylies und Bate, 1996). Die *Pdu-twist* positiven Zellen in *Platynereis* stellen kein embryonales Feld dar, sondern werden durch Teilung aus dem *Pdu-twist* positiven Mesoblasten proliferiert. Unterschiede finden sich ebenfalls im Mechanismus der Gastrulation, also der Trennung der Keimblätter. Dieser ist ebenfalls ein völlig anderer als der bei *Drosophila* und ähnelt durch seinen amphistomen Modus eher dem der Vertebraten (Arendt *et al.*, 2001; Steinmetz *et al.*, 2007).

Twist ist bereits vor der Gastrulation für die Aktivierung mehrerer mesodermspezifischer Regulatoren (Leptin, 1991), wie dem FGF-Rezeptor Homolog *heartless* (Shishido *et al.*, 1993; Beiman *et al.*, 1996; Gisselbrecht *et al.*, 1996; Shishido *et al.*, 1997), dem NK2-Homeodomänen-Protein *tinman* (Azpiazu und Frasch, 1993; Bodmer, 1993; Evans *et al.*, 1995; Gajewski *et al.*, 1997; Yin *et al.*, 1997) und dem MADS-Box Protein *DMef2*, einem Schlüsselregulator der

Muskeldifferenzierung (Nguyen *et al.*, 1994; Bour *et al.*, 1995; Lilly *et al.*, 1995; Taylor *et al.*, 1995) in den Zellen des präsumptiven Mesoderms zuständig.

Die *Platynereis* Homologen *Pdu-fgfr* (Steinmetz, 2002), *Pdu-tinman* (Ballavoine, persönliche Mitteilung), *Pdu-mef2* (Steinmetz, 2006; Thamm, 2007) und *Pdu-myosin* (Steinmetz, 2006), sowie *Pdu-myosin* (Domsch, 2007) und *Pdu-troponin* (Zelada-Gonzales, 2005) als Marker für differenzierte Muskulatur, sind kloniert und ihre Expression in der *Platynereis* Trochophora charakterisiert worden. Die Analysen ergaben, dass die Expressionsdomänen von *Pdu-fgfr*, *Pdu-tinman* und *Pdu-mef2* vor allem in den Mesodermanlagen der Trochophora, also den Anlagen, die durch die Zelllinie etabliert werden, auf die während der Furchungen *Pdu-twist* verteilt worden ist und die auch in der Trochophora weiterhin *Pdu-twist* exprimieren, liegen. Eine Aktivierung von *Pdu-fgfr*, *Pdu-tinman* und *Pdu-mef2* durch zygotisches Pdu-Twist ist somit als wahrscheinlich anzusehen, wenn auch noch nicht experimentell überprüft. Ob diese transkriptionellen Regulatoren schon während der Gastrulation oder erst nach der Etablierung der Mesodermanlagen eventuell durch Pdu-Twist aktiviert werden, lässt sich mit den vorliegenden Daten nicht beantworten. Hier wäre eine Expressionscharakterisierung während der Gastrulationsphase wünschenswert. Die Analyse der Transkriptionsniveaus dieser Gene in *Pdu-twist RNAi* Phänotypen würde ebenfalls genaueren Aufschluss über die mögliche Aktivierung durch Pdu-Twist geben.

Eine durch parentale *Pdu-twist RNAi* vermittelte Analyse der *Platynereis twist* Funktion während der Embryonalentwicklung erzeugte neben Phänotypen deren Achsenbildung und Gastrulation stark beeinflusst war, auch Phänotypen deren Gastrulation weniger stark beeinträchtigt war, aber deren mesodermalen Zellen keine typische Anordnung und Differenzierung zeigten (3.1.8). Das Auftreten dieses „zygotischen“ Phänotyps lässt sich dadurch erklären, dass die Injektion der dsRNA oder deren Aufnahme erst nach der schon maternal stattgefundenen Synthese von Pdu-Twist erfolgte. Das maternale Pdu-Twist war hinreichend, den embryonalen Organisator in einer Form zu induzieren, die eine, wenn auch nicht unbeeinträchtigte, Gastrulation erlaubt. Nach dem Beginn der zygotischen Transkription, die mit der Bildung von 4d¹ und 4d² einhergeht, wurde durch

RNAi die neusynthetisierte zygotische *Pdu-twist* mRNA in der Art degradiert, dass keine für die Mesoderminduktion ausreichende Menge an Pdu-Twist in den Zellen des präsumptiven Mesoderms mehr vorhanden war und diese in ihrem undeterminierten und undifferenzierten Zustand blieben. Neben seiner Funktion bei der Etablierung des embryonalen Organisators scheint Pdu-Twist somit auch essentiell für die Spezifizierung und die damit verbundenen Gastrulationsbewegungen des Mesoderms im *Platynereis* Embryo zu sein. Dies ist dieselbe Funktion, die der Transkriptionsfaktor auch bei *Drosophila* übernimmt. Er scheint bei *Platynereis* allerdings zusätzlich die Funktion einer Dorsoventraldeterminante zu übernehmen

Twist wird ebenfalls für die Aktivierung von *snail* im präsumptiven Mesoderm von *Drosophila* benötigt, wo es während der Gastrulation exprimiert wird (Leptin, 1991) und dort die Expression neuroektodermaler Gene wie *rhomboid* und *single-minded* unterdrückt (Ip *et al.*, 1992a; Kasai *et al.*, 1998). In *Drosophila* wird das Mesoderm somit unter anderem durch den Ausschluss des alternativen, neuroektodermalen Zellschicksals spezifiziert. Durch die Isolierung der Snail Homologen anderer Spezies konnte auch bei anderen Spezies eine konservierte Rolle bei der Mesodermspezifizierung und bei Vertebraten bei der Mesodermentwicklung nachgewiesen werden (Nieto, 2002), während sich in der Spinne *Achaearanea tepidariorum* (Yamazaki *et al.*, 2005), der Schnecke *Patella vulgata* (Lespinet *et al.*, 2002), dem Egel *Helobdella* (Goldstein *et al.*, 2001) und dem Polychaeten *Capitella* (Dill *et al.*, 2007) kein Zusammenhang zwischen Mesodermspezifizierung und der Expression des *snail* Homologs zeigen. Vielmehr scheinen die *snail* Homologen der Lophotrochozoa bei der Zellwanderung beteiligt zu sein. Mitglieder der Snail-Familie von Transkriptionsfaktoren finden sich auch bei Vertretern der Cnidaria. Bei *Nematostella vectensis* (Fritzenwanker *et al.*, 2004; Martindale *et al.*, 2004), der Koralle *Acropora millepora* (Hayward *et al.*, 2004) und dem Hydrozoen *Podocoryne carnea* (Spring *et al.*, 2002). Obwohl diese Diploblasten kein Mesoderm besitzen exprimieren sie während der Gastrulation die *snail* Homologen im Endoderm, das durch die Invagination des Ektoderms entsteht. Barrallo-Gimeno und Nieto (Nieto, 2002; Barrallo-Gimeno und Nieto,

2005) postulieren aufgrund dieser Ergebnisse, dass die ursprüngliche Funktion des *Snail* Transkriptionsfaktors eher bei der Kontrolle von Zellmigration, Zelladhäsion und der Modulation von Zellmorphologie, als bei der direkten Spezifizierung des Mesoderms liegt. Diese Rolle soll unter anderem über die Kontrolle der Epithelialen Mesenchymalen Transition (EMT) und der Regulation von Zelladhäsionsprozessen im sich entwickelnden Embryo vermittelt werden, so sterben *snail* mutante Mäuse zum Zeitpunkt der Gastrulation durch Defekte bei der EMT, die in Amnioten für die Mesodermentwicklung benötigt wird. In diesen Mutanten bildet sich das Mesoderm aus und mesodermalen Markergene, wie *brachyury* werden exprimiert, aber die mesodermalen Zellen scheinen nicht in der Lage zu sein die Expression des Zelladhäsionsmoleküls E-Cadherin herunterzuregulieren und zu migrieren. (Carver *et al.*, 2001). In anamnioten Vertebraten, d.h. Amphibien und Fischen, untergehen die mesodermalen Zellen keine komplette EMT. Das Zusammenspiel komplexer, morphogenetischer Bewegungen erzeugt hier eine zusammenhängende Migration der Zellen als Masse (Keller *et al.*, 2000). Die Homologen von *snail* scheinen somit auch eine Rolle bei der Migration von Zellen zu spielen, die während der Bewegung in engem Kontakt zueinander bleiben. Dies ist auch die Rolle, die *Snail* bei der *Drosophila* Gastrulation erfüllt.

Platynereis snail Transkript kann schon maternal nachgewiesen werden (3.4.3), so dass eine eventuelle Aktivierung der *Pdu-snail* Expression durch Pdu-Twist schon in der unbefruchteten Eizelle stattgefunden haben muss. Die zygotische Transkriptionsaktivierung könnte allerdings ebenfalls durch Pdu-Twist bedingt sein. In *Drosophila* stellt *snail* ebenfalls ein direktes Zielgen von *twist* dar (Ip *et al.*, 1992b). Da *Pdu-snail* mRNA in allen analysierten Embryonalstadien nachgewiesen werden kann, aber keine Daten über die Transkriptlokalisierung in der frühen Embryonalentwicklung vorliegen, kann über eine eventuelle Koexpression in der mesodermalen Zelllinie während der Gastrulation und eine eventuelle funktionelle Rolle von Pdu-Snail bei dieser nur spekuliert werden. Es ist ebenfalls unbekannt, ob während der epibolischen Gastrulation im *Platynereis* Embryo die Induktion oder die Repression von EMT in den Mesodermanlagen eine Rolle

spielen. Eine Antwort hierauf könnte durch die Analyse der E-Cadherin Expression im sich entwickelnden Embryo gegeben werden. Da das *Pdu-snail* Transkript in der Trochophora aber in denselben Zellen der Mesodermanlagen wie *Pdu-twist* nachweisbar ist, wäre eine Koexpression in den proliferierenden Nachkommen von 4d durchaus denkbar. Eine über Cytochalasin B Furchungsarrest vermittelte Zelllinien-Analyse könnte hierüber Aufklärung bringen. Entsprechende Experimente blieben bis jetzt leider ohne verwertbare Ergebnisse. Ebenfalls wären *in situ* RT-PCR Experimente zur Transkriptlokalisierung denkbar.

Transkriptionsfaktoren der Snail-Familie binden im Promotor an die Konsensussequenz der E-Boxen (Mauhin *et al.*, 1993; Fuse *et al.*, 1994; Inukai *et al.*, 1999; Batlle *et al.*, 2000; Cano *et al.*, 2000; Kataoka *et al.*, 2000), dem Bindemotiv von bHLH-Transkriptionsfaktoren, was nahelegt, dass die Snail Proteine mit ihnen um die Bindestellen im Promotor konkurrieren. Durch die Bindung an die E-Box-Motive in den Promotoren der Zielgene sind die Snail Proteine in der Lage als transkriptionelle Repressoren zu fungieren (Hemavathy *et al.*, 1997; Fujiwara *et al.*, 1998; Nakayama *et al.*, 1998; Batlle *et al.*, 2000; Cano *et al.*, 2000; LaBonne und Bronner-Fraser, 2000; Mayor *et al.*, 2000). ChIP-on-chip Untersuchungen haben ergeben, dass sowohl Twist als auch Snail während der Mesoderminduktion *in vivo* an die Promotoren von *heartless*, *tinman*, *miR-1*, *wntD*, die alle wichtige Regulatoren der Mesodermentwicklung bei *Drosophila* darstellen (Lee *et al.*, 1997; Shishido *et al.*, 1997; Yin *et al.*, 1997; Biemar *et al.*, 2005; Ganguly *et al.*, 2005; Sokol und Ambros, 2005), binden (Sandmann *et al.*, 2007; Zeitlinger *et al.*, 2007). Obwohl der experimentelle Nachweis noch aussteht, wäre es also durchaus denkbar, dass Pdu-Snail in Zusammenarbeit mit Pdu-Twist mesodermales Zellschicksal im Embryo von *Platynereis* determiniert. Aufschluss hierüber könnten über *Pdu-snail* RNAi Experimente vermittelte, funktionelle Untersuchungen der Pdu-Snail Aktivität Aufschluss geben. Diese Experimente würden ebenfalls die Antwort auf die Frage liefern, ob dies wie bei *Drosophila* durch die Repression neuroektodermaler Gene im prospektiven Mesoderm vermittelt wird oder ob im *Platynereis* Mesoderm ein anderer Mechanismus vorliegt.

4.4 *Platynereis dumerilii twist* und *snail*

sind bei der Mesodermdifferenzierung involviert

Nach dem Abschluss der epibolischen Gastrulation und dem Schließen der Blastopore stellt sich der *Platynereis* Embryo als typische Trochophora-Larve dar. Er besteht aus einer Episphäre, der zukünftigen Kopfregion des Jungwurms, einer Hyposphäre, die den Rumpf des Jungwurms bilden wird, und besitzt einen die beiden embryonalen Sphären äußerlich trennenden bewimperten Prototroch. Die Mesodermanlagen der Trochophora-Larve liegen lateral in der Hyposphäre und treffen sich am posterioren Pol der Larve (Dorresteijn, 1990; Ackermann *et al.*, 2005). Im Verlauf der weiteren Entwicklung beginnen diese zu differenzieren und bilden unter anderem die somatische Muskulatur der Larve und des dreisegmentigen Jungwurms (Ackermann *et al.*, 2005).

Bei *Drosophila* stellt sich nach der Gastrulation das Niveau der Twist Expression in jedem mesodermalen Segment als zwei Streifen mit jeweils hohem oder niedrigem Twist Gehalt dar. Nach einer dritten mitotischen Teilung verlieren die Zellen den Kontakt mit dem Ektoderm und migrieren in eine Position, die mehr im Inneren des Embryos liegt (Bate, 1993). Der Gehalt an Twist in den Zellen zu diesem Zeitpunkt stellt eine kritische Differenzierungsdeterminante des mesodermalen Zellschicksals dar. Die Erhöhung der Twist Dosis in Zellen, in denen normalerweise ein niedriger Gehalt an Twist den Normalfall darstellt, resultiert in der Bildung ektopischer Körpermuskeln und dem Verlust des viszeralen Mesoderms. *Vice versa* führt die künstliche Erniedrigung der Twist Dosis in Twist^{hoch} Zellen zum Verlust der Körpermuskulatur und der ektopischen Bildung von viszeralem Mesoderm. Wenn Twist ektopisch im Ektoderm exprimiert wird, reprimiert es dort das epidermale und neuronale Zellschicksal und aktiviert das Körpermuskulaturprogramm in diesen Zellen (Baylies und Bate, 1996).

Die *twist* Gene der Vertreter der Vertebraten werden erst nach der Gastrulation und der Mesodermspezifizierung exprimiert (Wolf *et al.*, 1991; Gitelman, 1997).

Diesen Sachverhalt trifft man auch bei der Analyse der *twist* Gene von *Caenorhabditis* und *Branchiostoma* (Harfe *et al.*, 1998b; Yasui *et al.*, 1998). „Loss of function“ Analysen in sich entwickelnden *C. elegans* (Corsi *et al.*, 2000) und Mausembryonen (Chen und Behringer, 1995) ergaben, dass die Spezifizierung des Mesoderms auch bei dem Verlust der Twist Expression normal verlief.

Dennoch scheinen alle bisher untersuchten *twist* Homologen in irgendeiner Weise an den Differenzierungsprozessen des Mesoderms beteiligt zu sein (Tavares *et al.*, 2001; Technau und Scholz, 2003). Während allerdings hohe Dosen Twist in *Drosophila* Mesodermzellen das myogene Zellschicksal propagieren (Baylies und Bate, 1996), scheint Twist bei der Myogenese der Vertebraten eine gegenteilige Rolle zu spielen. In der Maus wird das *twist* Homolog Mtwist zuerst gleichmäßig in den frühen Somiten exprimiert. Sobald die neugebildeten Somiten beginnen sich zu kompartimentieren und zu differenzieren, verliert das Myotom die Mtwist Expression und beginnt die myogenen Faktoren MyoD und Myf-5 zu exprimieren. Dies deutet auf eine primäre Funktion von Mtwist als Repressor myogenen Schicksals hin. Wobei seine Aufgabe darin zu liegen scheint, die verfrühte Differenzierung myogener Zellen und ektopische Myogenese zu verhindern. Dies wird durch die Rekrutierung von E-Proteinen und die damit verbundene Repression der Bildung myogener E-Protein/MyoD-Komplexe, durch die Blockierung von MyoD Bindestellen im Promoter, die Inhibierung von Mef2 und direkter Interaktion mit der N-terminalen Domäne von MyoD erreicht (Spicer *et al.*, 1996; Hamamori *et al.*, 1997). Dies impliziert eine gegenteilige Funktion von Twist bei Vertebraten und Insekten.

Bei *C. elegans* wird das *twist* Homolog (*hlh-8*) ebenfalls im Mesoderm exprimiert. Allerdings ist seine Expression auf Untertypen mesodermalen Gewebes beschränkt, welche die Darmmuskulatur und die Mesoblasten sowie deren Nachkommen beinhalten (Corsi *et al.*, 2000). Dies impliziert, dass bei *C. elegans*, ebenso wie in *Drosophila* und der Maus, das Twist Homolog für die Differenzierung bestimmter mesodermaler Gewebeuntertypen zuständig ist.

Ein Vergleich der Expressionsdomänen der Twist Homologen verschiedener Spezies untermauert diese Hypothese. Das Twist Homolog des Huhns zeigt

dasselbe Expressionsmuster, wie es für das Maushomolog beschrieben wurde (Tavares *et al.*, 2001). Bei *Branchiostoma* findet sich Expression von *Bbtwist* zuerst in der späten Gastrula und dann posterior in den sich differenzierenden Somiten und dem Notochord (Yasui *et al.*, 1998). Die *Danio* Paraloge werden unter anderem im Sklerotom der Somiten, im Kopfmesoderm und dem lateralen Plattenmesoderm exprimiert (Germanguz *et al.*, 2007).

Bei verschiedenen Vertretern der Protostomier ist ebenfalls ein Zusammenhang zwischen Mesoderm differenzierung und Twist Expression zu finden. Sowohl bei dem amphipoden Krebs *Parhyale hawaiiensis*, der theridiiden Spinne *Achaearanea tepidariorum*, als auch dem Polychaeten *Capitella capitata* und der Schnecke *Patella vulgata* findet sich die Expression der *twist* Homologen und Paralogen im sich differenzierenden Mesoderm oder einer Untergruppe des Mesoderms (Nederbragt *et al.*, 2002; Yamazaki *et al.*, 2005; Dill *et al.*, 2007; Price und Patel, 2007)

Platynereis twist wird nach der Gastrulation in den sich differenzierenden Mesodermanlagen der Trochophora- und Metatrochophora-Larven exprimiert (3.1.4). Es findet sich in den hufeisenförmigen Zellbändern, die sich lateral der Hyposphäre an die Borstensackanlagen anschmiegen und im Verlauf der weiteren Larvalentwicklung unter anderem zur dorsalen und ventralen Longitudinalmuskulatur, sowie zur Transversalmuskulatur differenzieren. Neben seiner Funktion bei der Gastrulation und Mesoderminduktion scheint *Platynereis Twist*, ebenfalls wie *Drosophila Twist*, eine Funktion bei der Differenzierung des Mesoderms, im speziellen in der Myogenese, zu haben.

Pdu-twist spielt während der Embryonalentwicklung bereits bei der Mesoderm determination eine wichtige Rolle. Für eine funktionelle Untersuchung von *Pdu-twist* während der Muskeldifferenzierung müsste der Funktionsverlust somit zeitlich nach der Mesoderm determination herbeigeführt werden. Da bei *Platynereis* keine Methoden, die eine solchen „konditionellen knockout“ herbeiführen könnten etabliert sind, ist eine direkte Antwort auf diese Fragestellung nicht möglich. Es gibt aber mehrere Hinweise auf eine mögliche, myogenes Schicksal propagierende Funktion von Pdu-Twist.

In den sich zu Muskelzellen differenzierenden Teilen der Mesodermanlagen der Metatrochophora werden sowohl *Pdu-mef2* (Steinmetz, 2002; Thamm, 2007) als auch *Pdu-myoD* (Steinmetz, 2006) exprimiert. Sowohl Mef2 (Nguyen *et al.*, 1994; Bour *et al.*, 1995; Lin *et al.*, 1997; Naya *et al.*, 2002), als auch MyoD/Nautilus (Michelson *et al.*, 1990; Paterson *et al.*, 1991; Araki *et al.*, 1994; Harfe *et al.*, 1998a; Meedel *et al.*, 2002), das ein Mitglied der Myogenic regulatory factor (MRF) Familie von Transkriptionsfaktoren darstellt, sind in allen bisher analysierten Spezies bei der Festlegung myogenen Zellschicksals und der Muskeldifferenzierung beteiligt. In *Drosophila* interagiert D-Mef2 mit Twist und bindet *in vivo* kooperativ mit ihm an die Promotoren, der durch die Transkriptionsfaktoren gemeinsam regulierten Gene (Sandmann *et al.*, 2006). Der *Drosophila* FGFR Heartless und seine Homologen in *Caenorhabditis* und Maus sind ebenfalls für eine durch das jeweilige Twist Homolog vermittelte myogene Differenzierung unerlässlich (Shishido *et al.*, 1997; Harfe *et al.*, 1998b; Zuniga *et al.*, 2002). Vergleicht man die Expressionsdomänen von *Pdu-twist* mit denen von *Pdu-fgfr*, *Pdu-mef2* und *Pdu-myoD* (Steinmetz, 2002, 2006; Thamm, 2007), so findet sich eine Koexpression in den Mesodermanlagen der sich entwickelnden Metatrochophora-Larve. Für eine genauere Analyse und zur simultanen Transkriptlokalisierung müssten allerdings doppelte oder dreifache Fluoreszenz *in situ* Hybridisierungen mit *Platynereis twist*, *fgfr*, *mef2* und *myoD* durchgeführt werden. Einen Hinweis auf eine Funktion von Pdu-Twist bei der Muskelentwicklung gibt auch die Koexpression von *Pdu-twist* und *Pdu-myosin* in sich differenzierenden Muskelzellen. In den von Domsch (Domsch, 2007) durchgeführten Untersuchungen zur Myogenese in *Platynereis* findet sich in der Trochophora-Larve eine sequentiell aufeinanderfolgende Expression von *Pdu-twist* und *Pdu-myosin* im primären Mesoderm. Im Stadium der Metatrochophora-Larve findet sich die Expression beider Gene sowohl in der sich differenzierenden dorsalen und ventralen Longitudinalmuskulatur, als auch in der Transversalmuskulatur (Domsch, 2007). Neben diesen Expressionsdomänen im somatischen Mesoderm findet sich auch eine Koexpression von *Pdu-twist* mit *Pdu-tinman* und *Pdu-bagpipe* (Balavoine, persönliche Mitteilung) in der viszeralen

Hüllmuskulatur, die das Stomodeum umgibt. Diese besteht aus zwei Hälften, die während der Embryogenese aus den Nachkommen von 3d (links) und 3c (rechts) gebildet werden. *Tinman* und *bagpipe* sind während der *Drosophila* Embryogenese essentiell für die Determination viszeralen Zellschicksals (Azpiazu und Frasch, 1993; Bodmer, 1993).

Die Skelettmuskulatur der Chordaten und Arthropoden besteht aus synzytialen quergestreiften Muskelfasern. Diese Art von Muskulatur besaß nach aller Wahrscheinlichkeit auch schon ihr letzter gemeinsamer Vorfahre (Oota und Saitou, 1999). In den Embryonen der Vertebraten und *Drosophila* bilden sich synzytiale Muskelfasern durch die sukzessive Verschmelzung von fusionskompetenten Myoblasten mit Gründermyoblasten und schon gebildeten Myotuben. Diese beiden Klassen von Myoblasten werden bei *Drosophila* durch Notch und Delta vermittelte laterale Inhibition aus einer Äquivalenzgruppe im somatischen Mesoderm spezifiziert (Carmena *et al.*, 2002). Nach der Bildung der Myoblasten ist in ihnen keine Twist Expression mehr zu finden. Diese persistiert nur in einigen Gründerzellen, die entweder Vorläuferzellen der Herzmuskulatur oder Vorläuferzellen der adulten Muskulatur darstellen (Frasch, 1999)

In *Drosophila* beginnen die Muskelgründermyoblasten nach ihrer Determination mit der Expression eines Sets von molekularen Determinanten, die jedem Muskel zu seinem Aussehen, seiner Größe und Innervation verhilft. Diese Identitätsgene, unter anderem das Homeoboxgen *S59/slouch* (Dohrmann *et al.*, 1990; Carmena *et al.*, 1995; Knirr *et al.*, 1999), *apterous* (Bourgouin *et al.*, 1992), *muscle segment homeobox* (Nose *et al.*, 1998), *eve* (Frasch *et al.*, 1987; Carmena *et al.*, 1998; Su *et al.*, 1999), *ladybird* (Jagla *et al.*, 1998), *collier* (Crozatier *et al.*, 1999), das *Drosophila* MyoD Homolog *nautilus* (Michelson *et al.*, 1990; Paterson *et al.*, 1991), *vestigial* (Bate und Rushton, 1993) und das für einen Zinkfinger-Transkriptionsfaktor kodierende *Krüppel* Gen (Ruiz-Gomez *et al.*, 1997) werden in den Gründermyoblasten der verschiedenen Muskeln in verschiedenen Kombinationen exprimiert und definieren zusammen deren Identität, was auch durch Funktionsverlustanalysen bestätigt wurde (Bate, 1993; Frasch, 1999).

Bei *Platynereis* findet man jedoch ein anderes Muster der Myogenese. Die Muskulatur der Trochophora-Larven, der atoken, als auch der epitoken *Platynereis* Formen besteht aus einzelnen, doppelt schräg gestreiften, nicht synzytial miteinander verbundenen Muskelzellen. Diese sind nebeneinander an einer gemeinsamen Bindegewebsmembran angereiht (Lindner und Fischer, 1964). Es handelt sich somit um einen völlig anderen Typus von Muskulatur als den, den die Chordaten oder Arthropoden besitzen. Über die molekularen und entwicklungsbiologischen Mechanismen, die der Determination und Differenzierung dieses Muskeltyps zugrunde liegen, sind, außer in der Arbeit von Domsch (Domsch, 2007), noch keine Analysen durchgeführt worden. Im Gegensatz zu *Drosophila* und auch zu den Gegebenheiten wie sie in der Myogenese der Vertebraten zu finden sind, findet sich die Expression von *Platynereis twist* auch noch in Zellen, die begonnen haben terminale Differenzierungsmarker wie *Pdu-myosin* und *Pdu-troponin* zu exprimieren, verschwindet aber nach der Entwicklung zum dreisegmentigen Jungwurm, dessen Muskulatur aber weiterhin *Pdu-mef2* und *Pdu-myod* exprimiert (Steinmetz, 2006; Thamm, 2007). Von den Muskelidentitätsgenen, die in *Drosophila* bei der Myogenese eine wichtige Rolle spielen, sind in *Platynereis* bis jetzt nur die *nautilus* und *eve* Homologen kloniert worden. Während das *myoD* Homolog eindeutig in der sich differenzierenden Muskulatur exprimiert wird, findet sich *Pdu-eve* Expression nur am Blastoporenrand und in der Ventralplatte der *Platynereis* Larve (de Rosa *et al.*, 2005). Eine Klonierung und Expressionscharakterisierung der Homologen der anderen Muskelidentitätsgene könnte Aufschluss darüber geben, inwieweit sich der Prozess der Muskeldifferenzierung in *Platynereis* und *Drosophila* ähnelt und welche, durch die unterschiedliche Art bedingte, grundsätzlichen Unterschiede in der molekularen Steuerung der Myogenese bestehen. Dies könnte auch eine Antwort auf die Frage geben wie sich diese beiden Arten der Myogenese im Verlauf der Evolution entwickelt haben könnte.

Darüber, in welcher Art und Weise Pdu-Twist im Zusammenspiel mit Pdu-Mef2, Pdu-MyoD und weiteren bis dato unbekanntem Faktoren, die Myogenese im *Platynereis* Embryo reguliert und ob Pdu-Twist inhibierend, wie bei

Vertebraten, und/oder induzierend, z.B. durch Homo- und Heterodimerbildung, wie bei *Drosophila*, auf die Muskeldifferenzierung wirkt, lässt sich nur spekulieren. Die Koexpression aller drei Faktoren im sich differenzierenden primären Mesoderm macht eine funktionelle Kopplung der Transkriptionsfaktoren bei der Myogenese aber wahrscheinlich.

Neben *Pdu-twist* Expression findet sich in der Trochophora- und Metatrochophora-Larve ebenfalls *Pdu-snail* Expression in den Anlagen des primären Mesoderms und später in dem sich differenzierenden Mesoderm. Diese ist mit *Pdu-twist* sowohl zeitlich als auch räumlich kolokalisiert (3.5.2). Über den Mechanismus der Mesodermdifferenzierung im *Platynereis* Embryo und damit eventuelle stattfindende, durch eine komplette oder teilweise EMT vermittelte, Zellmigrationen sind noch keine Untersuchungen durchgeführt worden. Es wäre aber durchaus denkbar, dass Pdu-Snail durch E-Cadherin Repression, den sich differenzierenden Mesodermzellen eine Migration an ihren Zielort ermöglicht. Hierfür spricht auch die Expression von *Pdu-fgfr* in den differenzierenden Mesodermanlagen. In der Maus reguliert der FGFR1 Signalweg die Expression von *mSnail*, welches die E-Cadherin Expression in den prospektiven Mesodermzellen reprimiert und damit die EMT auslöst, welche essentiell für die Mesodermdifferenzierung ist (Ciruna und Rossant, 2001).

Während *twist* und *snail* im invaginierenden prospektiven Mesoderm in *Drosophila* koexprimiert werden, findet sich während der Mesodermdifferenzierung keinerlei *snail* Expression. Eine Koexpression von *twist* und *snail* Homologen während der Mesodermdifferenzierung ist auch in den anderen bisher analysierten Spezies nicht beschrieben worden. Yang und Kang (Kang und Massague, 2004; Yang *et al.*, 2004) beschreiben einen Zusammenhang zwischen Twist und Snail Expression bei der EMT und nachfolgender Metastase von murinen und humanen epithelialen Tumorzellen. Die Aktivierung von Twist und Snail in Karzinomzellen führte zur Repression von E-Cadherin, der Aktivierung mesenchymaler Marker und der Bildung invasiver Karzinome. Twist reprimiert hierbei die Transkription vom *E-Cadherin* Promotor durch die Besetzung derselben E-Boxen, die auch das Ziel von Snail und SIP1 darstellen

(Comijn *et al.*, 2001; Nieto, 2002). Ein funktioneller Zusammenhang zwischen Pdu-Twist und Pdu-Snail Expression könnte somit die Induktion von EMT bei der Mesodermdifferenzierung darstellen. Eine simultane Analyse der E-Cadherin, der *Pdu-twist* und der *Pdu-snail* Expression, könnte eine Antwort geben, ob EMT-Prozesse während der Mesodermdifferenzierung in *Platynereis* eine Rolle spielen. Eine genaue zellmorphologische Analyse während der Mesodermdifferenzierung wäre durch *in vivo* Färbung der Zellgrenzen mit dem Farbstoff BODIPY564/570 (Steinmetz, 2006) und anschließende Analyse der Zellwanderungen durch konfokale Laserscanmikroskopie möglich.

4.5 *Platynereis dumerilii* twist spielt auch bei der postlarvalen Mesodermentwicklung und Regeneration eine Rolle

Die Metatrochophora-Larven von *Platynereis* entwickeln sich innerhalb von einem Tag bis zwei Tagen zu dreisegmentigen Jüngwurmern, die zu einer zum größten Teil benthischen Lebensweise übergehen. Während der postlarvalen Lebensphase werden bis zur epitoken Metamorphose stetig neue Segmente von einer Sprossungs- oder Wachstumszone im Pygidium des Jungwurms gebildet (Fischer und Dorresteyn, 2004).

Neuere Untersuchungen haben ergeben, dass sich der Segmentbildungsprozess in postlarvalen *Platynereis* in drei Phasen einteilen lässt. In der ersten Phase schnürt die Proliferationszone Zellen in die Wachstumszone ab. Die Proliferationszone stellt sich dabei als Zellschicht im Ektoderm unmittelbar anterior des Pygidiums dar. Die in die Wachstumszone abgeschnürten Zellen werden dort zu ektodermalen und mesodermalen Gründerzellen determiniert (Pajaziti, persönliche Mitteilung). In der zweiten Phase proliferieren aus diesen Gründerzellen die Zellen der Wachstumszone, welche nach cranial neues Zellmaterial proliferiert. In der dritten Phase durchläuft dieses einen Prozess der Determination und etabliert eine neue Segmentanlage. Diese differenziert sich dann zum funktionellen jüngsten Segment aus (Janaitis, 2002).

In dreisegmentigen Jungwürmern findet sich *Pdu-twist* Expression neben zwei Expressionsdomänen in der viszeralen und somatischen Muskulatur, nämlich in den sich differenzierenden Retraktoren der Kiefer und in der Schlundmuskulatur, nur noch in zwei direkt vor dem Pygidium liegenden bilateralsymmetrischen Zellclustern (3.1.6). Rebscher (Rebscher *et al.*, 2007) postuliert diese als proliferativ hoch aktive posteriore mesodermale Wachstumszone (PMGZ) und definiert ihren klonalen Ursprung aus den sekundären Mesoblasten, welche ebenfalls Nachkommen von 4d darstellen. Aus diesem Zellcluster entstehen die primordialen Keimzellen, sowie das Mesoderm des ersten neu gebildeten Segments. Es ist nicht bekannt, ob vergleichbar der adulten Myogenese in *Drosophila* die sekundären Mesoblasten während der Larvalentwicklung *Pdu-twist* positiv sind und so als Mesodermgründerzellen determiniert werden, oder ob die *Pdu-twist* Expression in der PMGZ als Antwort auf äußere Signale aus der Proliferationszone induziert wird. Neben der Expression in der PMGZ findet sich *Pdu-twist* Expression im differenzierenden Mesoderm sich differenzierender Segmentanlagen älterer Jungwürmer. *Platynereis twist* scheint somit auch in der postlarvalen Wachstumsphase eine Rolle bei der Determination und Differenzierung des Mesoderms der neu gebildeten Segmente zu spielen.

Subadulte *Platynereis dumerilii* besitzen die Fähigkeit, Segmente die am posterioren Ende amputiert wurden, zu regenerieren. Der Verlust der Segmente wird nach dem Wundverschluss durch die Bildung einer neuen Segmentproliferationszone kompensiert. Diese arbeitet umso schneller, je mehr Segmente amputiert wurden (Hofmann, 1966). Während des Regenerationsvorgangs werden neue Segmentanlagen in viel kürzeren Intervallen als bei der Normalentwicklung etabliert. Es befinden sich somit im sich bildenden Regenerat mehrere unterschiedlich weit differenzierte Segmente. *Pdu-twist* Expression findet sich in der mesodermalen Zellschicht in den sich differenzierenden Segmentanlagen (3.1.7).

Während es durch Injektion von *dsRNA* in das Regenerationsblastem (Sanchez Alvarado und Newmark, 1999) oder durch das Baden von amputierten Planarien in *dsRNA* (Orii *et al.*, 2003) möglich ist spezifisch das Transkript für das die

doppelsträngige RNA kodiert im Regenerationsblastem zu degradieren und die resultierenden Phänotypen zu analysieren, lieferte eine Injektion von *Pdu-twist dsRNA* in das Regenerationsblastem keine auswertbaren Ergebnisse. Es kann somit kein direkter funktioneller Zusammenhang zwischen *Pdu-twist* Expression und Determinations- oder Differenzierungsvorgängen im Mesoderm regenerierender *Platynereis* postuliert werden. Dennoch zeigt sich auch bei den Regenerationsvorgängen ein eindeutiger Zusammenhang zwischen mesodermalen Zellschicksal und *Pdu-twist* Expression in *Platynereis*.

4.6 *Platynereis dumerilii twist* kann fehlendes

***Drosophila melanogaster twist* nicht ersetzen**

Die in dieser Arbeit durchgeführten Analysen zur Funktion von *Pdu-twist* während der Embryonalentwicklung von *Platynereis* implizieren eine ähnliche Rolle wie die von *twist* in *Drosophila*. *Platynereis twist* wird ebenso wie *Drosophila twist* sowohl für die Gastrulation und Mesodermspezifizierung, als auch für eine wildtypische Mesodermdifferenzierung benötigt. Um eine eventuell vorhandene Konservierung der funktionellen Eigenschaften der beiden Transkriptionsfaktoren während der Evolution zu überprüfen, wurde *Pdu-twi* ektopisch in *Drosophila twist* und *twist snail*-Embryonen exprimiert und die resultierenden Phänotypen auf Abschwächung oder Rettung überprüft. Embryonen aus *twist* und *snail* mutanten Stämmen gastrulieren abnormal, bilden kein Mesoderm oder mesodermale Derivate und sterben am Ende der Embryogenese. Die lateralen und dorsalen Teile der Embryonen sind von dem mutanten Phänotyp nicht betroffen (Simpson, 1983; Grau *et al.*, 1984).

Diesen Phänotyp zeigten auch die mutanten Embryonen, die ektopisch *Pdu-twist* exprimierten (3.3.4). Sowohl Kutikula-Präparate von Embryonen aus den Rettungsexperimenten, als auch der Nachweis von Mef2, als direktem Zielgen von Twist, zeigten keinen Unterschied im resultierenden Phänotyp zu den mutanten Embryonen. Eine Substitution von *Drosophila twist* durch *Platynereis*

twist mit dem GAL4/UAS-System (Brand und Perrimon, 1993) und *twi*-GAL4 als Treiber ist somit nicht möglich.

Bei einem Vergleich der Aminosäuresequenz zwischen *Drosophila* Twist und den Homologen der anderen Spezies fällt auf, dass das *Drosophila* Twist Protein fast doppelt so groß ist und vor allem im N-terminalen Bereich erhebliche Unterschiede in der Aminosäuresequenz aufweist. Bei *Drosophila* ist während der Frühentwicklung eine integrative Zusammenarbeit mehrerer Transkriptionsfaktoren unabdingbar. Twist bindet während der frühen Embryonalentwicklung kooperativ mit Snail und Dorsal sowohl an durch Dorsal kontrollierte Enhancer, als auch an durch Dorsal regulierte Silencer (Sandmann *et al.*, 2007; Zeitlinger *et al.*, 2007). Die Fähigkeit sowohl als transkriptioneller Aktivator, als auch als transkriptioneller Repressor zu wirken, wird sowohl durch die Bildung von Homodimeren, als auch durch die Bildung von Heterodimeren mit Da vermittelt. Als Homodimer wirkt Twist aktivierend, als Heterodimer reprimierend auf den von ihm kontrollierten Promotor (Castanon *et al.*, 2001). Ebenso tritt es in physikalische Wechselwirkung mit Dorsal, mit dem es in vielen Promotoren kooperativ bindet und diese reprimiert (Shirokawa und Courey, 1997). Durch die strukturellen Unterschiede zwischen *Platynereis* Twist und *Drosophila* Twist bedingt, könnten die physikalischen Interaktionen die Twist normalerweise im Wildtyp eingeht, durch Pdu-Twist nicht mehr etabliert werden, und das Zusammenspiel der Transkriptionsfaktoren an den durch sie regulierten Promotoren gestört sein. Dies würde denselben Phänotyp hervorbringen, den auch die Funktionsverlustmutante zeigt, und keine Rettung des Phänotyps durch die ektopische Pdu-Twist Expression erlauben.

Inwieweit *Platynereis* Twist fähig ist an die Promotoren, der durch Twist regulierten Gene, zu binden, ließe sich durch ChIP-Analysen der Rettungsexperimente, eine eventuelle Interaktion von Pdu-Twist mit Twist durch „GST-Pulldown“-Experimente untersuchen. Um derartige Analysen durchzuführen zu können, muss allerdings ein spezifischer Antikörper gegen Pdu-Twist vorhanden sein.

4.7 *Platynereis twist* stellt einen „Master Regulator“ für mesodermales Schicksal in *Platynereis* dar

Platynereis twist Transkript kann während der kompletten Larvalentwicklung von *Platynereis* nachgewiesen werden und eine Analyse seiner Expression und Funktion zeigt in allen Stadien eine direkte oder indirekte Verknüpfung mit mesodermalem Schicksal. Die durchgeführten funktionellen Analysen und die Zelllinienanalysen weisen auf einen durch Pdu-Twist vermittelten dreiphasigen Mechanismus der Mesoderm determination und Mesoderm differenzierung im *Platynereis* Embryo hin und unterstützen das im folgenden erläuterte Modell (Abbildung 4.1). Im atoken und regenerierenden Wurm ist *Platynereis twist* für die Spezifizierung und Differenzierung der Mesodermanlagen der neuentstehenden Segmente zuständig. *Platynereis twist* stellt somit einen „Master Regulator“ für mesodermales Zellschicksal in *Platynereis* dar.

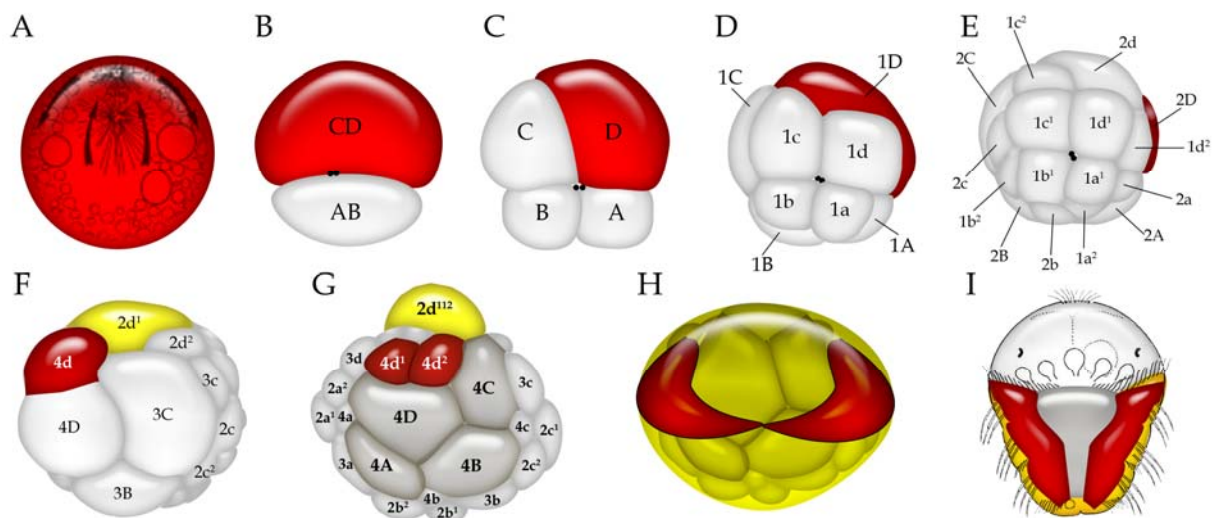


Abbildung 4.1: Modell der Mesodermspezifizierung und Modelldifferenzierung in *Platynereis*. Maternal deponiertes Pdu-Twist (A) wird durch die Furchungsteilungen exklusiv auf 4d verteilt (B-F). Dort wird es für die Festlegung von 4d als Mesodermmutterzelle benötigt und initiiert in Kooperation mit 2d¹ den Beginn der Gastrulation. Während der Gastrulation spezifiziert zygotisches Pdu-Twist die Mesodermanlagen (G, H). In der Trochophora wird Pdu-Twist für die Differenzierung des Mesoderms benötigt (I). *Pdu-twist* Expressionsdomänen in **rot**, ektodermales Zellschicksal in **gelb**. Abbildungen A-F und I nach Fischer und Dorresteyn (Dorresteyn, 1990; Fischer und Dorresteyn, 2004), Abbildungen G, H nach Ackermann (Ackermann *et al.*, 2005) verändert. A-E zeigen animale, F, G und H posteriore und I eine dorsale Ansicht

Maternales Pdu-Twist wird für die Etablierung des embryonalen Organistors und die Etablierung der molekularen Identität von 4d als Mesoblast benötigt (4.2). Dies wird durch die exklusive Verteilung von Pdu-Twist in die 4d Blastomere bewirkt (Abbildung 4.1 A-F). Nach der erfolgten Determination von 4d wird, wahrscheinlich durch eine Interaktion zwischen 4d und 2d¹, die in diesem Entwicklungsstadium direkten physischen Kontakt haben, überprüft, ob die beiden Blastomeren in der sich bildenden Stereoblastula richtig positioniert und spezifiziert sind (Abbildung 4.1 F). Nach dem erfolgreichen Durchlaufen dieses Kontrollpunktes, wird durch den Beginn der bilateralsymmetrischen Teilungen die Gastrulation initiiert. Ohne diese Interaktion findet keine Gastrulation statt (4.2, Abbildung 4.1 G). Nach der Festlegung von 4d als Stammzelle des Mesoderms wird zygotisches Pdu-Twist während der einsetzenden Gastrulation bei der Spezifizierung der mesodermalen Anlagen benötigt (Abbildung 4.2 H). In den sich zu differenzierenden Mesodermanlagen der Trochophora ist Pdu-Twist dann für die Aktivierung mesoderm- und muskelspezifischer Transkriptionskassetten zuständig (4.3, 4.4, Abbildung 4.1 I). Inwiefern dies bei der Mesodermspezifizierung und Mesoderm determination bei der Bildung neuer Segmente zutrifft und inwieweit embryonale Prozesse dabei rekapituliert werden, ist nicht bekannt. Es wäre aber denkbar, dass *Pdu-twist* Expression in den Zellen des sich bildenden Segments dieselben Transkriptionseinheiten kontrolliert, die es auch in den Mesodermanlagen der Trochophorae aktiviert.

Dies ist das erste Mal, dass außerhalb der Insecta ein funktioneller Zusammenhang zwischen der Expression eines Twist Transkriptionsfaktors und der Spezifizierung mesodermalen Zellschicksals sowie der Gastrulation experimentell nachgewiesen wurde. Dies ist insoweit erstaunlich, als das bisherige Untersuchungen der molekularen Musterbildung in der Trochophora und des amphistomen Gastrulationsmodus einen eher an die Vertebraten erinnernden Entwicklungsmodus zeigten (Arendt *et al.*, 2004; Denes *et al.*, 2007; Steinmetz *et al.*, 2007; Tessmar-Raible *et al.*, 2007). Ob dieser Modus der Mesodermspezifizierung und Gastrulationssteuerung ein ursprüngliches Merkmal der inäqual furchenden Spiralia darstellt und im Verlauf der Evolution durch die Eiarchitektur bedingt

entstanden ist, lässt sich ohne weitergehende Analysen nicht beantworten. Die maternale Expression eines *Helobdella twist* Homologs (Soto *et al.*, 1997) gibt allerdings Hinweise darauf. Auch das Vorhandensein von *Podocoryne twist* im Entocodon der Diploblastia und seine Expression in undifferenzierten, proliferativ aktiven Zellen, zeigt dass die ursprüngliche Rolle von Twist durchaus in der Steuerung von Transkriptionseinheiten liegen könnte, die für Zellbewegung, Zellformänderung und Zelladhäsion zuständig sind. Dies würde mit der Rolle von Pdu-Twist während der Gastrulation bei *Platynereis* übereinstimmen (3.1.8, 4.2, 4.3) und könnte eine ursprüngliche Eigenschaft des Transkriptionsfaktors im letzten gemeinsamen Vorfahren der Protostomier und Deuterostomier darstellen, eine Hypothese, die auch von anderen Autoren vertreten wird (Technau und Scholz, 2003; Leptin, 2005).

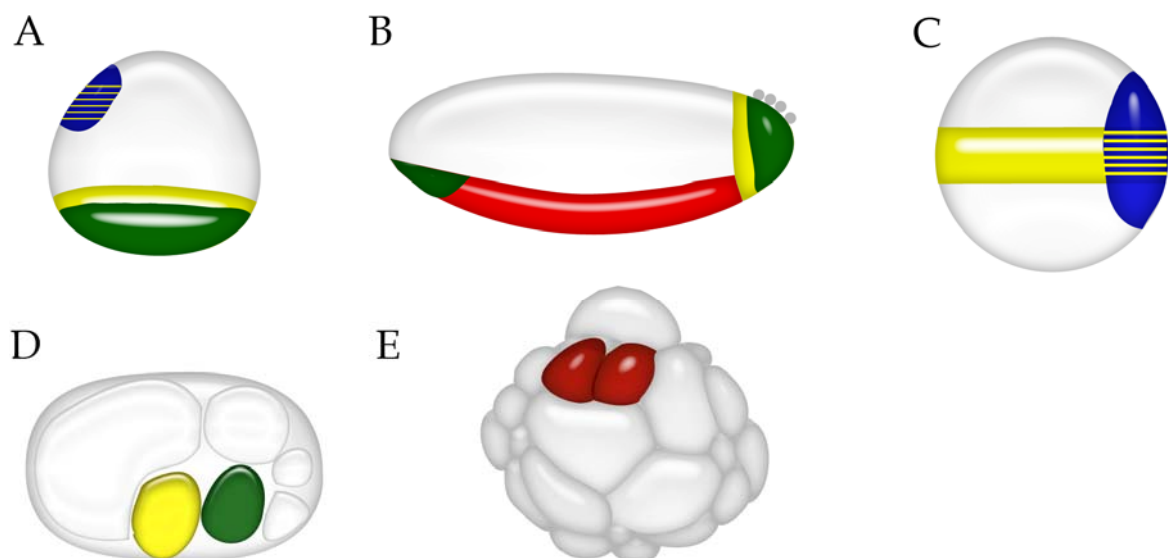


Abbildung 4.2: Keimblatt-determinanten in der Blastula des Seeigels, von *Drosophila*, *Xenopus*, *Caenorhabditis* und *Platynereis* (A) Beim Seeigel exprimiert das prospektive Endoderm GATAe (**grün**), das orale Ektoderm exprimiert Goosecoid (**blau**) und Brachyury (**gelb**). Ähnlich wie bei *Drosophila* findet sich ein Ring von Brachyury Expression um das Endoderm. (B) Bei *Drosophila* exprimiert das präsumptive Mesoderm Twist und Snail (**rot**) und die Endodermanlagen sind durch Serpent Expression charakterisiert (**grün**). Das Brachyury Homolog Brachyenteron spezifiziert den ektodermalen Hinterdarm (**gelb**). (C) Bei *Xenopus* exprimiert das prospektive Mesoderm Brachyury (**gelb**). Nodal und β -Catenin etablieren die Spemann-Mangold Organisationsregion, die Goosecoid, Siamois und andere Gene (**blau**) exprimiert. (D) In *Caenorhabditis* exprimiert die MS-Zelle, die die Gründerzelle des primären Mesoderm darstellt den T-Box-Transkriptionsfaktor TBX-35 (**gelb**) und die E-Zelle aus der das komplette Endoderm hervorgeht die paralogen GATA-Transkriptionsfaktoren END-1 und END-3 (**grün**). (E) Bei *Platynereis* exprimieren 4d¹ und 4d², die das komplette Rumpfmesoderm bilden Twist und wahrscheinlich Snail (**rot**) Abbildung verändert nach Leptin (Leptin, 2005).

Neben diesen evolutiven Analysen ist es auch erstmals möglich die molekularen Grundlagen der Mesodermspezifizierung bei inäqual furchenden Spiraliern näher zu analysieren und die durchgeführten Zellstammbaumanalysen mit molekularen Daten zu kombinieren. *Platynereis twist* ist die erste Keimblattterminante, die in Spiraliern bisher identifiziert wurde, und es ist somit erstmals möglich, auch für *Platynereis* mit der Etablierung eines molekularen Anlagenplans zu beginnen (Abbildung 4.2).

5 Literatur

- Ackermann, C., Dorresteijn, A. and Fischer, A. (2005) Clonal domains in postlarval *Platynereis dumerilii* (Annelida: Polychaeta). *J Morphol* 266, 258-80.
- Agee, S.J., Lyons, D.C. and Weisblat, D.A. (2006) Maternal expression of a NANOS homolog is required for early development of the leech *Helobdella robusta*. *Dev Biol* 298, 1-11.
- Alberga, A., Boulay, J.L., Kempe, E., Dennefeld, C. and Haenlin, M. (1991) The snail gene required for mesoderm formation in *Drosophila* is expressed dynamically in derivatives of all three germ layers. *Development* 111, 983-992.
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. and Lipman, D.J. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25, 3389 - 3402.
- Andéol, Y. (1994) Early transcription in different animal species: implication for transition from maternal to zygotic control in development. *Development Genes and Evolution* 204, 3-10.
- Andéol, Y., Gusse, M. and Mechali, M. (1990) Characterization and expression of a *Xenopus* ras during oogenesis and development. *Developmental Biology* 139, 24-34.
- Anderson, D.P. (1966) The comparative embryology of the Polychaeta. *Acta Zool.* 47, 1-42.
- Anderson, K.V. (1987) Dorsal-ventral embryonic pattern genes of *Drosophila*. *Trends in Genetics* 3, 91-97.
- Angerer, L.M., Oleksyn, D.W., Levine, A.M., Li, X., Klein, W.H. and Angerer, R.C. (2001) Sea urchin goosecoid function links fate specification along the animal-vegetal and oral-aboral embryonic axes. *Development* 128, 4393-404.
- Araki, s., Saiga, H., Makabe, K.W. and Satoh, N. (1994) Expression of AMD 1, a gene for a MyoD 1-related factor in the ascidian *Halocynthia roretzi*. *Development Genes and Evolution* 203, 320-327.
- Arendt, D., Technau, U. and Wittbrodt, J. (2001) Evolution of the bilaterian larval foregut. *Nature* 409, 81-5.
- Arendt, D., Tessmar-Raible, K., Snyman, H., Dorresteijn, A.W. and Wittbrodt, J. (2004) Ciliary photoreceptors with a vertebrate-type opsin in an invertebrate brain. *Science* 306, 869-71.
- Arora, K. and Nüsslein-Volhard, C. (1992) Altered mitotic domains reveal fate map changes in *Drosophila* embryos mutant for zygotic dorsoventral patterning genes. *Development* 114, 1003-24.
- Astrow, S., Holton, B. and Weisblat, D. (1987) Centrifugation redistributes factors determining cleavage patterns in leech embryos. *Developmental Biology* 120, 270-283.
- Azpiazu, N. and Frasch, M. (1993) tinman and bagpipe: two homeo box genes that determine cell fates in the dorsal mesoderm of *Drosophila*. *Genes Dev* 7, 1325-40.

- Barrallo-Gimeno, A. and Nieto, M.A. (2005) The Snail genes as inducers of cell movement and survival: implications in development and cancer. *Development* 132, 3151-3161.
- Bate, M. (1993) The mesoderm and its derivatives. In: Bate, M.; Martinez-Arias, A. (Eds.) *The Development of Drosophila melanogaster*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1013-1090.
- Bate, M. and Rushton, E. (1993) Myogenesis and muscle patterning in *Drosophila*. *C R Acad Sci III* 316, 1047-61.
- Battle, E., Sancho, E., Franci, C., Dominguez, D., Monfar, M., Baulida, J. and Garcia De Herreros, A. (2000) The transcription factor snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells. *Nat Cell Biol* 2, 84-9.
- Baylies, M.K. and Bate, M. (1996) twist: a myogenic switch in *Drosophila*. *Science* 272, 1481-4.
- Beer, J., Technau, G.M. and Campos -Ortega, J.A. (1987) Lineage analysis of transplanted individual cells in embryos of *Drosophila melanogaster*. *Development Genes and Evolution* 196, 222-230.
- Beiman, M., Shilo, B.Z. and Volk, T. (1996) Heartless, a *Drosophila* FGF receptor homolog, is essential for cell migration and establishment of several mesodermal lineages. *Genes Dev* 10, 2993-3002.
- Bergsten, J. (2005) A review of long-branch attraction. *Cladistics* 21, 163-193.
- Biemar, F., Zinzen, R., Ronshaugen, M., Sementchenko, V., Manak, J.R. and Levine, M.S. (2005) Spatial regulation of microRNA gene expression in the *Drosophila* embryo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 15907-11.
- Birnboim, H.C. and Doly, J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7, 1513-23.
- Bissen, S.T. (1995) Expression of the cell cycle control gene, *cdc25*, is constitutive in the segmental founder cells but is cell-cycle-regulated in the micromeres of leech embryos. *Development* 121, 3035-3043.
- Bodmer, R. (1993) The gene tinman is required for specification of the heart and visceral muscles in *Drosophila*. *Development* 118, 719-29.
- Boulay, J.L., Dennefeld, C. and Alberga, A. (1987) The *Drosophila* developmental gene snail encodes a protein with nucleic acid binding fingers. *Nature* 330, 395-398.
- Bour, B.A., O'Brien, M.A., Lockwood, W.L., Goldstein, E.S., Bodmer, R., Taghert, P.H., Abmayr, S.M. and Nguyen, H.T. (1995) *Drosophila* MEF2, a transcription factor that is essential for myogenesis. *Genes Dev* 9, 730-41.
- Bourgouin, C., Lundgren, S.E. and Thomas, J.B. (1992) Apterous is a *Drosophila* LIM domain gene required for the development of a subset of embryonic muscles. *Neuron* 9, 549-61.
- Boyd, L., Guo, S., Levitan, D., Stinchcomb, D.T. and Kemphues, K.J. (1996) PAR-2 is asymmetrically distributed and promotes association of P granules and PAR-1 with the cortex in *C. elegans* embryos. *Development* 122, 3075-84.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-54.

- Brand, A.H. and Perrimon, N. (1993) Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* 118, 401-415.
- Brand, C., Bergter, A. and Paululat, A. (2003) Cloning of a Twist orthologue from *Enchytraeus coronatus* (Annelida, Oligochaeta). *DNA Seq* 14, 25-31.
- Broitman-Maduro, G., Lin, K.T., Hung, W.W. and Maduro, M.F. (2006) Specification of the *C. elegans* MS blastomere by the T-box factor TBX-35. *Development* 133, 3097-106.
- Bujard, H., Gentz, R., Lanzer, M., Stueber, D., Mueller, M., Ibrahimi, I., Haeuptle, M.-T., Dobberstein, B. and Ray, W. (1987) [26] A T5 promoter-based transcription-translation system for the analysis of proteins in Vitro and in Vivo. In, *Methods in Enzymology*, Academic Press, Vol. Volume 155, pp. 416-433.
- Cabrera, C.V., Alonso, M.C. and Huikeshoven, H. (1994) Regulation of scute function by extramacrochaete in vitro and in vivo. *Development* 120, 3595-3603.
- Campuzano, S., Carramolino, L., Cabrera, C.V., Ruiz-Gomez, M., Villares, R., Boronat, A. and Modolell, J. (1985) Molecular genetics of the achaete-scute gene complex of *D. melanogaster*. *Cell* 40, 327-338.
- Cano, A., Perez-Moreno, M.A., Rodrigo, I., Locascio, A., Blanco, M.J., del Barrio, M.G., Portillo, F. and Nieto, M.A. (2000) The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression. *Nat Cell Biol* 2, 76-83.
- Carmena, A., Bate, M. and Jimenez, F. (1995) Lethal of scute, a proneural gene, participates in the specification of muscle progenitors during *Drosophila* embryogenesis. *Genes Dev* 9, 2373-83.
- Carmena, A., Buff, E., Halfon, M.S., Gisselbrecht, S., Jimenez, F., Baylies, M.K. and Michelson, A.M. (2002) Reciprocal Regulatory Interactions between the Notch and Ras Signaling Pathways in the *Drosophila* Embryonic Mesoderm. *Developmental Biology* 244, 226-242.
- Carmena, A., Gisselbrecht, S., Harrison, J., Jimenez, F. and Michelson, A.M. (1998) Combinatorial signaling codes for the progressive determination of cell fates in the *Drosophila* embryonic mesoderm. *Genes Dev.* 12, 3910-3922.
- Carver, E.A., Jiang, R., Lan, Y., Oram, K.F. and Gridley, T. (2001) The mouse snail gene encodes a key regulator of the epithelial-mesenchymal transition. *Mol Cell Biol* 21, 8184-8.
- Castanon, I. and Baylies, M.K. (2002) A Twist in fate: evolutionary comparison of Twist structure and function. *Gene* 287, 11-22.
- Castanon, I., Von Stetina, S., Kass, J. and Baylies, M.K. (2001) Dimerization partners determine the activity of the Twist bHLH protein during *Drosophila* mesoderm development. *Development* 128, 3145-59.
- Cather, J.N. and Verdonk, N.H. (1979) Development of Dentalium following removal of D-quadrant blastomeres at successive cleavage stages. *Development Genes and Evolution* 187, 355-366.
- Cather, J.N., Verdonk, N.H. and Dohmen, M.R. (1976) Role of the vegetal body in the regulation of development in *Bithynia tentaculata* (Prosobranchia, Gastropoda). *Am Zool* 16, 455-468.

- Chen, Z.F. and Behringer, R.R. (1995) twist is required in head mesenchyme for cranial neural tube morphogenesis. *Genes Dev* 9, 686-99.
- Cho, K.W., Blumberg, B., Steinbeisser, H. and De Robertis, E.M. (1991) Molecular nature of Spemann's organizer: the role of the *Xenopus* homeobox gene goosecoid. *Cell* 67, 1111-20.
- Chomczynski, P. and Sacchi, N. (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162, 156-9.
- Ciruna, B. and Rossant, J. (2001) FGF Signaling Regulates Mesoderm Cell Fate Specification and Morphogenetic Movement at the Primitive Streak. *Developmental Cell* 1, 37-49.
- Clement, C.A. (1962) Development of *lyanassa* following removal of the D macromere at successive cleavage stages. *Journal of Experimental Zoology* 149, 193-215.
- Comijn, J., Berx, G., Vermassen, P., Verschuere, K., van Grunsven, L., Bruyneel, E., Mareel, M., Huylebroeck, D. and van Roy, F. (2001) The Two-Handed E Box Binding Zinc Finger Protein SIP1 Downregulates E-Cadherin and Induces Invasion. *Molecular Cell* 7, 1267-1278.
- Corbo, J.C., Erives, A., Di Gregorio, A., Chang, A. and Levine, M. (1997) Dorsoventral patterning of the vertebrate neural tube is conserved in a protochordate. *Development* 124, 2335-44.
- Corsi, A.K., Kostas, S.A., Fire, A. and Krause, M. (2000) *Caenorhabditis elegans* twist plays an essential role in non-striated muscle development. *Development* 127, 2041-51.
- Cox, R.A. (1968) The use of guanidinium chloride in the isolation of nucleic acids. *Methods. Enzymol.* 12B:.
- Cripps, R.M., Black, B.L., Zhao, B., Lien, C.L., Schulz, R.A. and Olson, E.N. (1998) The myogenic regulatory gene Mef2 is a direct target for transcriptional activation by Twist during *Drosophila* myogenesis. *Genes Dev* 12, 422-34.
- Croce, J., Lhomond, G. and Gache, C. (2003) Coquillet, a sea urchin T-box gene of the Tbx2 subfamily, is expressed asymmetrically along the oral-aboral axis of the embryo and is involved in skeletogenesis. *Mech Dev* 120, 561-72.
- Cronmiller, C., Schedl, P. and Cline, T.W. (1988) Molecular characterization of daughterless, a *Drosophila* sex determination gene with multiple roles in development. *Genes Dev.* 2, 1666-1676.
- Crozatier, M., Valle, D., Dubois, L., Ibnsouda, S. and Vincent, A. (1999) Head versus trunk patterning in the *Drosophila* embryo; collier requirement for formation of the intercalary segment. *Development* 126, 4385-4394.
- Damen, P. and Dictus, W.J.A.G. (1996) Organizer role of the stem cell of the mesoderm in prototroch patterning in *Patella vulgata* (Mollusca, Gastropoda). *Mechanisms of Development* 56, 41-60.
- de Rosa, R., Prud'homme, B. and Balavoine, G. (2005) Caudal and even-skipped in the annelid *Platynereis dumerilii* and the ancestry of posterior growth. *Evol Dev* 7, 574-87.

- Denes, A.S., Jekely, G., Steinmetz, P.R., Raible, F., Snyman, H., Prud'homme, B., Ferrier, D.E., Balavoine, G. and Arendt, D. (2007) Molecular architecture of annelid nerve cord supports common origin of nervous system centralization in bilateria. *Cell* 129, 277-88.
- Depner, S. (2002) Der Einfluß des MPF-Kinase-Hemmers Olomoucine auf die Zellteilungsfolge und die Musterbildung bei *Platynereis dumerilii* (Annelida, Polychaeta). Diploma Thesis, Johannes Gutenberg-Universität Mainz.
- Dictus, W.J.A.G. and Damen, P. (1997) Cell-lineage and clonal-contribution map of the trochophore larva of *Patella vulgata* (Mollusca). *Mechanisms of Development* 62, 213-226.
- Dill, K., Thamm, K. and Seaver, E. (2007) Characterization of twist and snail gene expression during mesoderm and nervous system development in the polychaete annelid *Capitella* sp. I. *Development Genes and Evolution* 217, 435-447.
- Dohrmann, C., Azpiazu, N. and Frasch, M. (1990) A new *Drosophila* homeo box gene is expressed in mesodermal precursor cells of distinct muscles during embryogenesis. *Genes Dev* 4, 2098-111.
- Domsch, K. (2007) Untersuchungen zur Myogenese in *Platynereis dumerilii*. Diploma Thesis, Justus-Liebig-Universität, Giessen.
- Dorresteyn, A.W.C. (1990) Quantitative analysis of cellular differentiation during early embryogenesis of *Platynereis dumerilii*. *Development Genes and Evolution* V199, 14-30.
- Dorresteyn, A.W.C. (2005) Cell lineage and gene expression in the development of polychaetes. *Hydrobiologia* 535-536, 1-22.
- Dorresteyn, A.W.C., Bornewasser, H. and Fischer, A. (1987) A correlative study of experimentally changed first cleavage and Janus development in the trunk of *Platynereis dumerilii* (Annelida, Polychaeta). *Development Genes and Evolution* V196, 51-58.
- Dorresteyn, A.W.C. and Eich, P. (1991) Experimental change of cytoplasmic composition can convert determination of blastomeres in *Platynereis dumerilii* (Annelida, Polychaeta). *Development Genes and Evolution* 200, 342-351.
- Dorresteyn, A.W.C. and Graffy, C. (1993) Competence of blastomeres for the expression of molecular tissue markers is acquired by diverse mechanisms in the embryo of *Platynereis* (Annelida). *Development Genes and Evolution* V202, 270-275.
- Dorresteyn, A.W.C., O'Grady, B., Fischer, A., Porchet-Henneré, E. and Boilly-Marer, Y. (1993) Molecular specification of cell lines in the embryo of *Platynereis* (Annelida). *Development Genes and Evolution* 202, 260-269.
- Dynlacht, B.D., Attardi, L.D., Admon, A., Freeman, M. and Tjian, R. (1989) Functional analysis of NTF-1, a developmentally regulated *Drosophila* transcription factor that binds neuronal cis elements. *Genes Dev* 3, 1677-88.
- Edgar, B.A., Sprenger, F., Duronio, R.J., Leopold, P. and O'Farrell, P.H. (1994) Distinct molecular mechanisms regulate cell cycle timing at successive stages of *Drosophila* embryogenesis. *Genes Dev* 8, 440-52.

- El Ghouzzi, V., Le Merrer, M., Perrin-Schmitt, F., Lajeunie, E., Benit, P., Renier, D., Bourgeois, P., Bolcato-Bellemin, A.L., Munnich, A. and Bonaventure, J. (1997) Mutations of the TWIST gene in the Saethre-Chotzen syndrome. *Nat Genet* 15, 42-6.
- Ellis, H.M., Spann, D.R. and Posakony, J.W. (1990) extramacrochaetae, a negative regulator of sensory organ development in *Drosophila*, defines a new class of helix-loop-helix proteins. *Cell* 61, 27-38.
- Engler, M.J., Lechner, R.L. and Richardson, C.C. (1983) Two forms of the DNA polymerase of bacteriophage T7. *J. Biol. Chem.* 258, 11165-11173.
- Evans, S.M., Yan, W., Murillo, M.P., Ponce, J. and Papalopulu, N. (1995) tinman, a *Drosophila* homeobox gene required for heart and visceral mesoderm specification, may be represented by a family of genes in vertebrates: XNkx-2.3, a second vertebrate homologue of tinman. *Development* 121, 3889-99.
- Farrell, E.R. and Keshishian, H. (1999) Laser ablation of persistent twist cells in *Drosophila*: muscle precursor fate is not segmentally restricted. *Development* 126, 273-80.
- Feinberg, A.P. and Vogelstein, B. (1984) "A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity". Addendum. *Anal Biochem* 137, 266-7.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E. and Mello, C.C. (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391, 806-811.
- Fischer, A. and Dorresteijn, A. (2004) The polychaete *Platynereis dumerilii* (Annelida): a laboratory animal with spiralian cleavage, lifelong segment proliferation and a mixed benthic/pelagic life cycle. *Bioessays* 26, 314-25.
- Frasch, M. (1999) Controls in patterning and diversification of somatic muscles during *Drosophila* embryogenesis. *Current Opinion in Genetics & Development* 9, 522-529.
- Frasch, M., Hoey, T., Rushlow, C., Doyle, H. and Levine, M. (1987) Characterization and localization of the even-skipped protein of *Drosophila*. *Embo J* 6, 749-59.
- Fritzenwanker, J.H., Saina, M. and Technau, U. (2004) Analysis of forkhead and snail expression reveals epithelial-mesenchymal transitions during embryonic and larval development of *Nematostella vectensis*. *Dev Biol* 275, 389-402.
- Fujiwara, S., Corbo, J.C. and Levine, M. (1998) The snail repressor establishes a muscle/notochord boundary in the *Ciona* embryo. *Development* 125, 2511-20.
- Fuse, N., Hirose, S. and Hayashi, S. (1994) Diploidy of *Drosophila* imaginal cells is maintained by a transcriptional repressor encoded by escargot. *Genes Dev* 8, 2270-81.
- Gabay, L., Seger, R. and Shilo, B.Z. (1997) MAP kinase in situ activation atlas during *Drosophila* embryogenesis. *Development* 124, 3535-41.
- Gachot-Neveu, H., Stoetzel, C., Quillet, R., Dollfus, H. and Perrin-Schmitt, F. (2002) Natural TWIST protein variants in a panel of eleven non-human primates: possible implications of TWIST gene-tree for primate species tree. *Dev Genes Evol* 212, 496-503.

- Gajewski, K., Kim, Y., Choi, C.Y. and Schulz, R.A. (1998) Combinatorial control of *Drosophila* *mef2* gene expression in cardiac and somatic muscle cell lineages. *Dev Genes Evol* 208, 382-92.
- Gajewski, K., Kim, Y., Lee, Y.M., Olson, E.N. and Schulz, R.A. (1997) D-*mef2* is a target for Tinman activation during *Drosophila* heart development. *Embo J* 16, 515-22.
- Ganguly, A., Jiang, J. and Ip, Y.T. (2005) *Drosophila* WntD is a target and an inhibitor of the Dorsal/Twist/Snail network in the gastrulating embryo. *Development* 132, 3419-29.
- Garrell, J. and Modolell, J. (1990) The *Drosophila* extramacrochaetae locus, an antagonist of proneural genes that, like these genes, encodes a helix-loop-helix protein. *Cell* 61, 39-48.
- Germanguz, I., Lev, D., Waisman, T., Kim, C. and Gitelman, I. (2007) Four *twist* genes in zebrafish, four expression patterns. *Developmental Dynamics* 9999, NA.
- Gillis, W.J., Bowerman, B. and Schneider, S.Q. (2007) Ectoderm- and endomesoderm-specific GATA transcription factors in the marine annelid *Platynereis dumerilli*. *Evol Dev* 9, 39-50.
- Gisselbrecht, S., Skeath, J.B., Doe, C.Q. and Michelson, A.M. (1996) *heartless* encodes a fibroblast growth factor receptor (DFR1/DFGF-R2) involved in the directional migration of early mesodermal cells in the *Drosophila* embryo. *Genes Dev* 10, 3003-17.
- Gitelman, I. (1997) Twist protein in mouse embryogenesis. *Dev Biol* 189, 205-14.
- Gitelman, I. (2007) Evolution of the vertebrate twist family and synfunctionalization: a mechanism for differential gene loss through merging of expression domains. *Mol Biol Evol*, msm120.
- Goldstein, B., Leviten, M. and Weisblat, D. (2001) Dorsal and Snail homologs in leech development. *Development Genes and Evolution* 211, 329-337.
- Gonsalves, F.C. and Weisblat, D.A. (2007) MAPK regulation of maternal and zygotic Notch transcript stability in early development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 531-6.
- Grau, Y., Carteret, C. and Simpson, P. (1984) MUTATIONS AND CHROMOSOMAL REARRANGEMENTS AFFECTING THE EXPRESSION OF SNAIL, A GENE INVOLVED IN EMBRYONIC PATTERNING IN *DROSOPHILA MELANOGASTER*. *Genetics* 108, 347-360.
- Grimes, H.L., Chan, T.O., Zweidler-McKay, P.A., Tong, B. and Tschlis, P.N. (1996) The Gfi-1 proto-oncoprotein contains a novel transcriptional repressor domain, SNAG, and inhibits G1 arrest induced by interleukin-2 withdrawal. *Mol Cell Biol* 16, 6263-72.
- Gripp, K.W., Zackai, E.H. and Stolle, C.A. (2000) Mutations in the human TWIST gene. *Hum Mutat* 15, 150-5.
- Gross, J.M. and McClay, D.R. (2001) The role of Brachyury (T) during gastrulation movements in the sea urchin *Lytechinus variegatus*. *Dev Biol* 239, 132-47.
- Guerrier, P., van den Biggelaar, J.A.M., van Dongen, C.A.M. and Verdonk, N.H. (1978) Significance of the polar lobe for the determination of dorsoventral polarity in *Dentalium vulgare* (da Costa). *Developmental Biology* 63, 233-242.

- Halanych, K.M., Bacheller, J.D., Aguinaldo, A.M.A., Liva, S.M., Hillis, D.M. and Lake, J.A. (1995) Evidence from 18s Ribosomal DNA That the Lophophorates Are Protostome Animals Inarticulate. *Science* 267, 1641-1643.
- Hale, A.D., Green, J. and Brown, D.W.G. (1996) Comparison of four RNA extraction methods for the detection of small round structured viruses in faecal specimens. *Journal of Virological Methods* 57, 195-201.
- Hall, T.A. (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.*, 95-98.
- Hamamori, Y., Wu, H.Y., Sartorelli, V. and Kedes, L. (1997) The basic domain of myogenic basic helix-loop-helix (bHLH) proteins is the novel target for direct inhibition by another bHLH protein, Twist. *Mol Cell Biol* 17, 6563-73.
- Hammerschmidt, M. and Nüsslein-Volhard, C. (1993) The expression of a zebrafish gene homologous to *Drosophila* snail suggests a conserved function in invertebrate and vertebrate gastrulation. *Development* 119, 1107-18.
- Handel, K., Basal, A., Fan, X. and Roth, S. (2005) *Tribolium castaneum* twist: gastrulation and mesoderm formation in a short-germ beetle. *Dev Genes Evol* 215, 13-31.
- Harfe, B.D., Branda, C.S., Krause, M., Stern, M.J. and Fire, A. (1998a) MyoD and the specification of muscle and non-muscle fates during postembryonic development of the *C. elegans* mesoderm. *Development* 125, 2479 - 2488.
- Harfe, B.D. and Fire, A. (1998) Muscle and nerve-specific regulation of a novel NK-2 class homeodomain factor in *Caenorhabditis elegans*. *Development* 125, 421-429.
- Harfe, B.D., Vaz Gomes, A., Kenyon, C., Liu, J., Krause, M. and Fire, A. (1998b) Analysis of a *Caenorhabditis elegans* Twist homolog identifies conserved and divergent aspects of mesodermal patterning. *Genes Dev* 12, 2623-35.
- Hauenschild, C. and Fischer, A. (1969) *Platynereis dumerilii*: Mikroskopische Anatomie, Fortpflanzung, Entwicklung. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart pp. 1-55.
- Hayward, D., Miller, D. and Ball, E. (2004) snail expression during embryonic development of the coral *Acropora*: blurring the diploblast/triploblast divide? *Development Genes and Evolution* 214, 257-260.
- Heimann, C. (2000) Differentielle Zellzykluskontrolle bei Spiraliern und ihre Bedeutung für die Determination der Blastomeren. PhD Thesis, Johannes Gutenberg-Universität, Mainz.
- Hemavathy, K., Meng, X. and Ip, Y.T. (1997) Differential regulation of gastrulation and neuroectodermal gene expression by Snail in the *Drosophila* embryo. *Development* 124, 3683-91.
- Herrin, D. and Schmidt, G. (1988) Rapid, reversible staining of northern blots prior to hybridization. *Biotechniques* Mar;6(3), 199-200.
- Hofmann, D. (1966) Untersuchungen zur Regeneration des Hinterendes bei *Platynereis dumerilii* (Audouin et Milne-Edwards) (Annelida, Polychaeta). *Zool Jb Physiol* 72, 374-430.

- Hopwood, N.D., Pluck, A. and Gurdon, J.B. (1989) A *Xenopus* mRNA related to *Drosophila* twist is expressed in response to induction in the mesoderm and the neural crest. *Cell* 59, 893-903.
- Howard, T.D., Paznekas, W.A., Green, E.D., Chiang, L.C., Ma, N., Ortiz de Luna, R.I., Garcia Delgado, C., Gonzalez-Ramos, M., Kline, A.D. and Jabs, E.W. (1997) Mutations in TWIST, a basic helix-loop-helix transcription factor, in Saethre-Chotzen syndrome. *Nat Genet* 15, 36-41.
- Huang, F.Z., Kang, D., Ramirez-Weber, F.A., Bissen, S.T. and Weisblat, D.A. (2002) Micromere lineages in the glossiphoniid leech *Helobdella*. *Development* 129, 719-32.
- Hutvagner, G. and Zamore, P.D. (2002) RNAi: nature abhors a double-strand. *Current Opinion in Genetics & Development* 12, 225-232.
- Imai, K.S., Satoh, N. and Satou, Y. (2003) A Twist-like bHLH gene is a downstream factor of an endogenous FGF and determines mesenchymal fate in the ascidian embryos. *Development* 130, 4461-72.
- Imam, F., Sutherland, D., Huang, W. and Krasnow, M.A. (1999) stumps, a *Drosophila* gene required for fibroblast growth factor (FGF)-directed migrations of tracheal and mesodermal cells. *Genetics* 152, 307-18.
- Inukai, T., Inoue, A., Kurosawa, H., Goi, K., Shinjyo, T., Ozawa, K., Mao, M., Inaba, T. and Look, A.T. (1999) SLUG, a ces-1-related zinc finger transcription factor gene with antiapoptotic activity, is a downstream target of the E2A-HLF oncoprotein. *Mol Cell* 4, 343-52.
- Ip, Y.T., Park, R.E., Kosman, D., Bier, E. and Levine, M. (1992a) The dorsal gradient morphogen regulates stripes of rhomboid expression in the presumptive neuroectoderm of the *Drosophila* embryo. *Genes Dev* 6, 1728-39.
- Ip, Y.T., Park, R.E., Kosman, D., Yazdanbakhsh, K. and Levine, M. (1992b) dorsal-twist interactions establish snail expression in the presumptive mesoderm of the *Drosophila* embryo. *Genes Dev* 6, 1518-30.
- Jagla, T., Bellard, F., Lutz, Y., Dretzen, G., Bellard, M. and Jagla, K. (1998) ladybird determines cell fate decisions during diversification of *Drosophila* somatic muscles. *Development* 125, 3699-3708.
- Jan, Y.N. and Jan, L.Y. (1993) HLH proteins, fly neurogenesis, and vertebrate myogenesis. *Cell* 75, 827 - 830.
- Janaitis, C. (2002) Strukturelle Organisation und Dynamik der Segment-Sprossungszone bei *Platynereis dumerilii* (Polychaeta). Johannes Gutenberg-Universität, Mainz.
- Jiang, J., Kosman, D., Ip, Y.T. and Levine, M. (1991) The dorsal morphogen gradient regulates the mesoderm determinant twist in early *Drosophila* embryos. *Genes Dev* 5, 1881-91.
- Jürgens, G., Wieschaus, E., Nüsslein-Volhard, C. and Kluding, H. (1984) Mutations affecting the pattern of the larval cuticle in *Drosophila melanogaster*. *Development Genes and Evolution* 193, 283-295.
- Kadesch, T. (1993) Consequences of heteromeric interactions among helix-loop-helix proteins. *Cell Growth Differ* 4, 49-55.
- Kane, D.A. and Kimmel, C.B. (1993) The zebrafish midblastula transition. *Development* 119, 447-456.

- Kang, Y. and Massague, J. (2004) Epithelial-mesenchymal transitions: twist in development and metastasis. *Cell* 118, 277-9.
- Karess, R.E. and Rubin, G.M. (1984) Analysis of P transposable element functions in *Drosophila*. *Cell* 38, 135-146.
- Kasai, Y., Stahl, S. and Crews, S. (1998) Specification of the *Drosophila* CNS midline cell lineage: direct control of single-minded transcription by dorsal/ventral patterning genes. *Gene Expr* 7, 171-89.
- Kataoka, H., Murayama, T., Yokode, M., Mori, S., Sano, H., Ozaki, H., Yokota, Y., Nishikawa, S. and Kita, T. (2000) A novel snail-related transcription factor Smuc regulates basic helix-loop-helix transcription factor activities via specific E-box motifs. *Nucleic Acids Res* 28, 626-33.
- Keller, R., Davidson, L., Edlund, A., Elul, T., Ezin, M., Shook, D. and Skoglund, P. (2000) Mechanisms of convergence and extension by cell intercalation. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 355, 897-922.
- Kerner, P., Zelada Gonzalez, F., Le Gouar, M., Ledent, V., Arendt, D. and Vervoort, M. (2006) The expression of a hunchback ortholog in the polychaete annelid *Platynereis dumerilii* suggests an ancestral role in mesoderm development and neurogenesis. *Dev Genes Evol* 216, 821-8.
- Kispert, A., Herrmann, B.G., Leptin, M. and Reuter, R. (1994) Homologs of the mouse *Brachyury* gene are involved in the specification of posterior terminal structures in *Drosophila*, *Tribolium*, and *Locusta*. *Genes Dev* 8, 2137-50.
- Klemenz, R., Weber, U. and Gehring, W.J. (1987) The white gene as a marker in a new P-element vector for gene transfer in *Drosophila*. *Nucleic Acids Res* 15, 3947-59.
- Knight, R.D. and Shimeld, S.M. (2001) Identification of conserved C2H2 zinc-finger gene families in the Bilateria. *Genome Biol* 2, research0016.1 - 0016.8.
- Knirr, S., Azpiazu, N. and Frasch, M. (1999) The role of the NK-homeobox gene *slouch* (*S59*) in somatic muscle patterning. *Development* 126, 4525-35.
- Kosman, D., Ip, Y.T., Levine, M. and Arora, K. (1991) Establishment of the mesoderm-neuroectoderm boundary in the *Drosophila* embryo. *Science* 254, 118-22.
- Kumar, S., Tamura, K. and Nei, M. (2004) MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Brief Bioinform* 5, 150-163.
- LaBonne, C. and Bronner-Fraser, M. (2000) Snail-related transcriptional repressors are required in *Xenopus* for both the induction of the neural crest and its subsequent migration. *Dev Biol* 221, 195-205.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-5.
- Lambert, J.D. (2007) Mesoderm in spiralian: the organizer and the 4d cell. *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution* 9999, n/a.
- Lambert, J.D. and Nagy, L.M. (2001) MAPK signaling by the D quadrant embryonic organizer of the mollusc *Ilyanassa obsoleta*. *Development* 128, 45-56.

- Lambert, J.D. and Nagy, L.M. (2002) Asymmetric inheritance of centrosomally localized mRNAs during embryonic cleavages. *Nature* 420, 682-686.
- Lambert, J.D. and Nagy, L.M. (2003) The MAPK cascade in equally cleaving spiralian embryos. *Developmental Biology* 263, 231-241.
- Langeland, J.A., Tomsa, J.M., Jackman Jr, W.R. and Kimmel, C.B. (1998) An amphioxus snail gene: Expression in paraxial mesoderm and neural plate suggests a conserved role in patterning the chordate embryo. *Development Genes and Evolution* 208, 569-577.
- Lartillot, N., Lespinet, O., Vervoort, M. and Adoutte, A. (2002) Expression pattern of *Brachyury* in the mollusc *Patella vulgata* suggests a conserved role in the establishment of the AP axis in Bilateria. *Development* 129, 1411-1421.
- Lee, Y.M., Park, T., Schulz, R.A. and Kim, Y. (1997) Twist-mediated activation of the NK-4 homeobox gene in the visceral mesoderm of *Drosophila* requires two distinct clusters of E-box regulatory elements. *J Biol Chem* 272, 17531-41.
- Leptin, M. (1991) twist and snail as positive and negative regulators during *Drosophila* mesoderm development. *Genes Dev* 5, 1568-76.
- Leptin, M. (2005) Gastrulation Movements: the Logic and the Nuts and Bolts. *Developmental Cell* 8, 305-320.
- Leptin, M. and Grunewald, B. (1990) Cell shape changes during gastrulation in *Drosophila*. *Development* 110, 73-84.
- Lespinet, O., Nederbragt, A., Cassan, M., Dictus, W., van Loon, A. and Adoutte, A. (2002) Characterisation of two snail genes in the gastropod mollusc *Patella vulgata*. Implications for understanding the ancestral function of the snail-related genes in Bilateria. *Development Genes and Evolution* 212, 186-195.
- Li, L., Cserjesi, P. and Olson, E.N. (1995) Dermo-1: a novel twist-related bHLH protein expressed in the developing dermis. *Dev Biol* 172, 280-92.
- Lilly, B., Zhao, B., Ranganayakulu, G., Paterson, B.M., Schulz, R.A. and Olson, E.N. (1995) Requirement of MADS domain transcription factor D-MEF2 for muscle formation in *Drosophila*. *Science* 267, 688-693.
- Lin, Q., Schwarz, J., Bucana, C. and N. Olson, E. (1997) Control of Mouse Cardiac Morphogenesis and Myogenesis by Transcription Factor MEF2C. *Science* 276, 1404-1407.
- Lindner, E. and Fischer, A. (1964) Zur Feinstruktur nereider und heteronereider Muskulatur von *Platynereis dumerillii*. *Naturwissenschaften* 51, 410-410.
- Long, R.M., Singer, R.H., Meng, X., Gonzalez, I., Nasmyth, K. and Jansen, R.P. (1997) Mating type switching in yeast controlled by asymmetric localization of *ASH1* mRNA. *Science* 277, 383-7.
- Lu, B., Ackerman, L., Jan, L.Y. and Jan, Y.N. (1999) Modes of protein movement that lead to the asymmetric localization of partner of Numb during *Drosophila* neuroblast division. *Mol Cell* 4, 883-91.
- Maduro, M.F., Hill, R.J., Heid, P.J., Newman-Smith, E.D., Zhu, J., Priess, J.R. and Rothman, J.H. (2005) Genetic redundancy in endoderm specification within the genus *Caenorhabditis*. *Dev Biol* 284, 509-22.
- Magie, C.R., Daly, M. and Martindale, M.Q. (2007) Gastrulation in the cnidarian *Nematostella vectensis* occurs via invagination not ingression. *Developmental Biology* 305, 483-497.

- Martindale, M.Q. (1986) The 'organizing' role of the D quadrant in an equal-cleaving spiralian, *Lymnaea stagnalis* as studied by UV laser deletion of macromeres at intervals between third and fourth quartet formation. . Int J Inv Rep Dev 9, 229-242.
- Martindale, M.Q., Pang, K. and Finnerty, J.R. (2004) Investigating the origins of triploblasty: 'mesodermal' gene expression in a diploblastic animal, the sea anemone *Nematostella vectensis* (phylum, Cnidaria; class, Anthozoa). Development 131, 2463-74.
- Mauhin, V., Lutz, Y., Dennefeld, C. and Alberga, A. (1993) Definition of the DNA-binding site repertoire for the *Drosophila* transcription factor SNAIL. Nucleic Acids Res 21, 3951-7.
- Mayor, R., Guerrero, N., Young, R.M., Gomez-Skarmeta, J.L. and Cuellar, C. (2000) A novel function for the Xslug gene: control of dorsal mesendoderm development by repressing BMP-4. Mech Dev 97, 47-56.
- Meedel, T.H., Lee, J.J. and Whittaker, J.R. (2002) Muscle Development and Lineage-Specific Expression of CiMDF, the MyoD-Family Gene of *Ciona intestinalis*. Developmental Biology 241, S38-246.
- Menon, S.D. and Chia, W. (2001) *Drosophila* Rolling pebbles: A Multidomain Protein Required for Myoblast Fusion that Recruits D-Titin in Response to the Myoblast Attractant Dumbfounded. Developmental Cell 1, 691-703.
- Metzstein, M.M. and Horvitz, H.R. (1999) The *C. elegans* cell death specification gene *ces-1* encodes a snail family zinc finger protein. Mol Cell 4, 309-19.
- Michelson, A.M., Abmayr, S.M., Bate, M., Arias, A.M. and Maniatis, T. (1990) Expression of a MyoD family member prefigures muscle pattern in *Drosophila* embryos. Genes Dev. 4, 2086-2097.
- Michelson, A.M., Gisselbrecht, S., Buff, E. and Skeath, J.B. (1998) Heartbroken is a specific downstream mediator of FGF receptor signalling in *Drosophila*. Development 125, 4379-89.
- Millar, J.B.A. and Russell, P. (1992) The *cdc25* M-phase inducer: An unconventional protein phosphatase. Cell 68, 407-410.
- Moreno, S., Nurse, P. and Russell, P. (1990) Regulation of mitosis by cyclic accumulation of p80cdc25 mitotic inducer in fission yeast. Nature 344, 549-552.
- Morin-Kensicki, E.M. and Eisen, J.S. (1997) Sclerotome development and peripheral nervous system segmentation in embryonic zebrafish. Development 124, 159-167.
- Murre, C., McCaw, P.S. and Baltimore, D. (1989) A new DNA binding and dimerization motif in immunoglobulin enhancer binding, daughterless, MyoD, and myc proteins. Cell 56, 777-783.
- Nakayama, H., Scott, I.C. and Cross, J.C. (1998) The transition to endoreduplication in trophoblast giant cells is regulated by the mSNA zinc finger transcription factor. Dev Biol 199, 150-63.
- Naya, F.J., Black, B.L., Wu, H., Bassel-Duby, R., Richardson, J.A., Hill, J.A. and Olson, E.N. (2002) Mitochondrial deficiency and cardiac sudden death in mice lacking the MEF2A transcription factor. Nat Med 8, 1303-1309.

- Nederbragt, A.J., Lespinet, O., van Wageningen, S., van Loon, A.E., Adoutte, A. and Dictus, W.J. (2002) A lophotrochozoan twist gene is expressed in the ectomesoderm of the gastropod mollusk *Patella vulgata*. *Evol Dev* 4, 334-43.
- Nguyen, H.T., Bodmer, R., Abmayr, S.M., McDermott, J.C. and Spoerel, N.A. (1994) D-mef2: A *Drosophila* Mesoderm-Specific MADS Box-Containing Gene with a Biphasic Expression Profile During Embryogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 91, 7520-7524.
- Nibu, Y., Zhang, H. and Levine, M. (1998) Interaction of short-range repressors with *Drosophila* CtBP in the embryo. *Science* 280, 101-4.
- Nielsen, C. (2001) *Animal Evolution. Interrelationships of the Living Phyla.* Oxford University press, Oxford.
- Nieto, M.A. (2002) THE SNAIL SUPERFAMILY OF ZINC-FINGER TRANSCRIPTION FACTORS. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 3, 155-166.
- Nieto, M.A., Bennett, M.F., Sargent, M.G. and Wilkinson, D.G. (1992) Cloning and developmental expression of *Sna*, a murine homologue of the *Drosophila* snail gene. *Development* 116, 227-37.
- Nieto, M.A., Sargent, M.G., Wilkinson, D.G. and Cooke, J. (1994) Control of cell behavior during vertebrate development by *Slug*, a zinc finger gene. *Science* 264, 835-839.
- Nose, A., Isshiki, T. and Takeichi, M. (1998) Regional specification of muscle progenitors in *Drosophila*: the role of the *msh* homeobox gene. *Development* 125, 215-223.
- Nuovo, G.J. (1996) The Foundation of successful RT in situ PCR. *Front Biosci.* 1, c4-15.
- Nüsslein-Volhard, C., Wieschaus, E. and Kluding, H. (1984) Mutations affecting the pattern of the larval cuticle in *Drosophila melanogaster*. *Development Genes and Evolution* 193, 267-282.
- Oota, S. and Saitou, N. (1999) Phylogenetic relationship of muscle tissues deduced from superimposition of gene trees. *Mol Biol Evol* 16, 856-867.
- Orii, H., Mochii, M. and Watanabe, K. (2003) A simple "soaking method" for RNA interference in the planarian *Dugesia japonica*. *Development Genes and Evolution* 213, 138-141.
- Pan, D.J., Huang, J.D. and Courey, A.J. (1991) Functional analysis of the *Drosophila* twist promoter reveals a dorsal-binding ventral activator region. *Genes Dev* 5, 1892-901.
- Paterson, B.M., Walldorf, U., Eldridge, J., Dubendorfer, A., Frasch, M. and Gehring, W.J. (1991) The *Drosophila* homologue of Vertebrate Myogenic-Determination Genes Encodes a Transiently Expressed Nuclear Protein Marking Primary Myogenic Cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 88, 3782-3786.
- Paznekas, W.A., Okajima, K., Schertzer, M., Wood, S. and Jabs, E.W. (1999) Genomic organization, expression, and chromosome location of the human SNAIL gene (*SNAI1*) and a related processed pseudogene (*SNAI1P*). *Genomics* 62, 42-9.

- Philippe, H., Lartillot, N. and Brinkmann, H. (2005) Multigene Analyses of Bilaterian Animals Corroborate the Monophyly of Ecdysozoa, Lophotrochozoa, and Protostomia. *Mol Biol Evol* 22, 1246-1253.
- Pioro, H. and Stollewerk, A. (2006) The expression pattern of genes involved in early neurogenesis suggests distinct and conserved functions in the diplopod *Glomeris marginata*. *Development Genes and Evolution* 216, 417-430.
- Porath, J., Carlsson, J., Olsson, I. and Belfrage, G. (1975) Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation. *Nature* 258, 598-9.
- Price, A.L. and Patel, N. (2007) Investigating divergent mechanisms of mesoderm development in arthropods: the expression of *Ph-twist* and *Ph-mef2* in *Parhyale hawaiensis*. *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution* 308B, n/a.
- Prud'homme, B., Lartillot, N., Balavoine, G., Adoutte, A. and Vervoort, M. (2002) Phylogenetic analysis of the Wnt gene family. Insights from lophotrochozoan members. *Curr Biol* 12, 1395.
- Raible, F., Tessmar-Raible, K., Osoegawa, K., Wincker, P., Jubin, C., Balavoine, G., Ferrier, D., Benes, V., de Jong, P., Weissenbach, J., Bork, P. and Arendt, D. (2005) Vertebrate-Type Intron-Rich Genes in the Marine Annelid *Platynereis dumerilii*. *Science* 310, 1325-1326.
- Rebscher, N., Zelada-Gonzalez, F., Banisch, T.U., Raible, F. and Arendt, D. (2007) *Vasa* unveils a common origin of germ cells and of somatic stem cells from the posterior growth zone in the polychaete *Platynereis dumerilii*. *Developmental Biology* 306, 599-611.
- Render, J. (1991) Fate maps of the first quartet micromeres in the gastropod *Ilyanassa obsoleta*. *Development* 113, 495-501.
- Render, J. (1997) Cell Fate Maps in the *Ilyanassa obsoleta* Embryo beyond the Third Division. *Developmental Biology* 189, 301-310.
- Reuter, R. (1994) The gene *serpent* has homeotic properties and specifies endoderm versus ectoderm within the *Drosophila* gut. *Development* 120, 1123-35.
- Roark, M., Sturtevant, M.A., Emery, J., Vaessin, H., Grell, E. and Bier, E. (1995) *scratch*, a pan-neural gene encoding a zinc finger protein related to snail, promotes neuronal development. *Genes Dev.* 9, 2384-2398.
- Robertson, S.M., Shetty, P. and Lin, R. (2004) Identification of lineage-specific zygotic transcripts in early *Caenorhabditis elegans* embryos. *Dev Biol* 276, 493-507.
- Roth, S., Stein, D. and Nüsslein-Volhard, C. (1989) A gradient of nuclear localization of the dorsal protein determines dorsoventral pattern in the *Drosophila* embryo. *Cell* 59, 1189-1202.
- Rubin, G.M. and Spradling, A.C. (1982) Genetic transformation of *Drosophila* with transposable element vectors. *Science* 218, 348-353.
- Ruiz-Gomez, M., Romani, S., Hartmann, C., Jackle, H. and Bate, M. (1997) Specific muscle identities are regulated by *Kruppel* during *Drosophila* embryogenesis. *Development* 124, 3407-3414.

- Rushlow, C.A., Han, K., Manley, J.L. and Levine, M. (1989) The graded distribution of the dorsal morphogen is initiated by selective nuclear transport in *Drosophila*. *Cell* 59, 1165-1177.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B. and Erlich, H.A. (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239, 487-91.
- Saitou, N. and Nei, M. (1987) The Belgian EMBnet node The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4, 406 - 425.
- Sambrook, J. and Russell, I. (2001) *Molecular cloning: a laboratory manual* 3rd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sanchez Alvarado, A. and Newmark, P.A. (1999) Double-stranded RNA specifically disrupts gene expression during planarian regeneration. *PNAS* 96, 5049-5054.
- Sandmann, T., Girardot, C., Brehme, M., Tongprasit, W., Stolc, V. and Furlong, E.E.M. (2007) A core transcriptional network for early mesoderm development in *Drosophila melanogaster*. *Genes Dev.* 21, 436-449.
- Sandmann, T., Jensen, L.J., Jakobsen, J.S., Karzynski, M.M., Eichenlaub, M.P., Bork, P. and Furlong, E.E. (2006) A temporal map of transcription factor activity: *mef2* directly regulates target genes at all stages of muscle development. *Dev Cell* 10, 797-807.
- Sargent, M.G. and Bennett, M.F. (1990) Identification in *Xenopus* of a structural homologue of the *Drosophila* gene *snail*. *Development* 109, 967-73.
- Scaal, M., Füchtbauer, E.-M. and Brand-Saberi, B. (2001) *cDermo-1* expression indicates a role in avian skin development. *Anatomy and Embryology* 203, 1-7.
- Schleip, W. (1929) *Die Determination der Primitiventwicklung*. 1. Lieferung. Akademische Verlagsgesellschaft mbH, Leipzig.
- Schneider, S., Fischer, A. and Dorresteijn, A.W.C. (1992) A morphometric comparison of dissimilar early development in sibling species of *Platynereis* (Annelida, Polychaeta). *Development Genes and Evolution* 201, 243-256.
- Schneider, S.Q. and Bowerman, B. (2007) [beta]-Catenin Asymmetries after All Animal/Vegetal- Oriented Cell Divisions in *Platynereis dumerilii* Embryos Mediate Binary Cell-Fate Specification. *Developmental Cell* 13, 73-86.
- Schulte-Merker, S., Ho, R.K., Herrmann, B.G. and Nusslein-Volhard, C. (1992) The protein product of the zebrafish homologue of the mouse *T* gene is expressed in nuclei of the germ ring and the notochord of the early embryo. *Development* 116, 1021-32.
- Sefton, M., Sanchez, S. and Nieto, M.A. (1998) Conserved and divergent roles for members of the *Snail* family of transcription factors in the chick and mouse embryo. *Development* 125, 3111-21.
- Sela, M., Anfinsen, C.B. and Harrington, W.F. (1957) The correlation of ribonuclease activity with specific aspects of tertiary structure. *Biochim. Biophys. Acta* 502.
- Shirokawa, J.M. and Courey, A.J. (1997) A direct contact between the dorsal rel homology domain and *Twist* may mediate transcriptional synergy. *Mol Cell Biol* 17, 3345-55.

- Shishido, E., Higashijima, S., Emori, Y. and Saigo, K. (1993) Two FGF-receptor homologues of *Drosophila*: one is expressed in mesodermal primordium in early embryos. *Development* 117, 751-61.
- Shishido, E., Ono, N., Kojima, T. and Saigo, K. (1997) Requirements of DFR1/Heartless, a mesoderm-specific *Drosophila* FGF-receptor, for the formation of heart, visceral and somatic muscles, and ensheathing of longitudinal axon tracts in CNS. *Development* 124, 2119-28.
- Simpson, P. (1983) MATERNAL-ZYGOTIC GENE INTERACTIONS DURING FORMATION OF THE DORSOVENTRAL PATTERN IN *DROSOPHILA* EMBRYOS. *Genetics* 105, 615-632.
- Smith, J.C., Price, B.M., Green, J.B., Weigel, D. and Herrmann, B.G. (1991) Expression of a *Xenopus* homolog of Brachyury (T) is an immediate-early response to mesoderm induction. *Cell* 67, 79-87.
- Smith, S., Metcalfe, J.A. and Elgar, G. (2000) Identification and analysis of two snail genes in the pufferfish (*Fugu rubripes*) and mapping of human SNA to 20q. *Gene* 247, 119-28.
- Sokol, N.S. and Ambros, V. (2005) Mesodermally expressed *Drosophila* microRNA-1 is regulated by Twist and is required in muscles during larval growth. *Genes Dev* 19, 2343-54.
- Sommer, R.J. and Tautz, D. (1994) Expression patterns of *twist* and *snail* in *Tribolium* (Coleoptera) suggest a homologous formation of mesoderm in long and short germ band insects. *Dev Genet* 15, 32-7.
- Song, M.H., Huang, F.Z., Gonsalves, F.C. and Weisblat, D.A. (2004) Cell cycle-dependent expression of a hairy and Enhancer of split (*hes*) homolog during cleavage and segmentation in leech embryos. *Dev Biol* 269, 183-95.
- Soto, J.G., Nelson, B.H. and Weisblat, D.A. (1997) A leech homolog of *twist*: evidence for its inheritance as a maternal mRNA. *Gene* 199, 31-7.
- Spana, E.P. and Doe, C.Q. (1995) The prospero transcription factor is asymmetrically localized to the cell cortex during neuroblast mitosis in *Drosophila*. *Development* 121, 3187-95.
- Spicer, D.B., Rhee, J., Cheung, W.L. and Lassar, A.B. (1996) Inhibition of myogenic bHLH and MEF2 transcription factors by the bHLH protein Twist. *Science* 272, 1476-80.
- Spradling, A.C. and Rubin, G.M. (1982) Transposition of cloned P elements into *Drosophila* germ line chromosomes. *Science* 218, 341-347.
- Spring, J., Yanze, N., Josch, C., Middel, A.M., Winninger, B. and Schmid, V. (2002) Conservation of Brachyury, Mef2, and Snail in the Myogenic Lineage of Jellyfish: A Connection to the Mesoderm of Bilateria. *Developmental Biology* 244, 372-384.
- Spring, J., Yanze, N., Middel, A.M., Stierwald, M., Groger, H. and Schmid, V. (2000) The mesoderm specification factor *twist* in the life cycle of jellyfish. *Dev Biol* 228, 363-75.
- Steinmetz, P.R. (2002) Identifizierung und Funktionsanalyse eines Fibroblastenwachstumsfaktor-Rezeptors (FGFR) bei der Entwicklung von *Platynereis dumerilii* (Polychaeta). Diploma Thesis, Ruprecht-Karls-Universität, Heidelberg.

- Steinmetz, P.R. (2006) Comparative molecular and morphogenetic characterisation of larval body regions in the polychaete annelid *Platynereis dumerilii*. PhD Thesis, Phillips-Universität, Marburg.
- Steinmetz, P.R.H., Zelada-Gonzales, F., Burgtorf, C., Wittbrodt, J. and Arendt, D. (2007) Polychaete trunk neuroectoderm converges and extends by mediolateral cell intercalation. PNAS 104, 2727-2732.
- Steward, R. (1989) Relocalization of the dorsal protein from the cytoplasm to the nucleus correlates with its function. Cell 59, 1179-1188.
- Strandberg, L. and Enfors, S.O. (1991) Factors influencing inclusion body formation in the production of a fused protein in *Escherichia coli*. Appl Environ Microbiol 57, 1669-74.
- Struck, T., Schult, N., Kusen, T., Hickman, E., Bleidorn, C., McHugh, D. and Halanych, K. (2007) Annelid phylogeny and the status of Sipuncula and Echiura. BMC Evolutionary Biology 7, 57.
- Su, M.T., Fujioka, M., Goto, T. and Bodmer, R. (1999) The *Drosophila* homeobox genes *zfh-1* and *even-skipped* are required for cardiac-specific differentiation of a numb-dependent lineage decision. Development 126, 3241-51.
- Sweet, H.C. (1998) Specification of first quartet micromeres in *Ilyanassa* involves inherited factors and position with respect to the inducing D macromere. Development 125, 4033-4044.
- Takizawa, P.A., Sil, A., Swedlow, J.R., Herskowitz, I. and Vale, R.D. (1997) Actin-dependent localization of an RNA encoding a cell-fate determinant in yeast. Nature 389, 90-3.
- Tao, W., Nianhui, Z. and Lingfang, D. (2005) Isolation of RNA of high quality and yield from *Ginkgo biloba* leaves. Biotechnology Letters V27, 629-633.
- Tavares, A.T., Izpisua-Belmonte, J.C. and Rodriguez-Leon, J. (2001) Developmental expression of chick *twist* and its regulation during limb patterning. Int J Dev Biol 45, 707-13.
- Taylor, M.V., Beatty, K.E., Hunter, H.K. and Baylies, M.K. (1995) *Drosophila* MEF2 is regulated by *twist* and is expressed in both the primordia and differentiated cells of the embryonic somatic, visceral and heart musculature. Mech Dev 50, 29-41.
- Technau, U. and Scholz, C.B. (2003) Origin and evolution of endoderm and mesoderm. Int J Dev Biol 47, 531-9.
- Tessmar-Raible, K. and Arendt, D. (2003) Emerging systems: between vertebrates and arthropods, the Lophotrochozoa. Curr Opin Genet Dev 13, 331-40.
- Tessmar-Raible, K., Raible, F., Christodoulou, F., Guy, K., Rembold, M., Hausen, H. and Arendt, D. (2007) Conserved sensory-neurosecretory cell types in annelid and fish forebrain: insights into hypothalamus evolution. Cell 129, 1389-400.
- Thamm, K. (2007) Involvement of the Notch-signaling pathway in the development of the two polychaete annelids *Capitella* sp. I and *Platynereis dumerilii*. PhD Thesis, Justus-Liebig -Universität, Giessen.
- Thisse, B., el Messal, M. and Perrin-Schmitt, F. (1987a) The *twist* gene: isolation of a *Drosophila* zygotic gene necessary for the establishment of dorsoventral pattern. Nucleic Acids Res 15, 3439-53.

- Thisse, B., Stoetzel, C., El Messal, M. and Perrin-Schmitt, F. (1987b) Genes of the *Drosophila* maternal dorsal group control the specific expression of the zygotic gene twist in presumptive mesodermal cells. *Genes Dev.* 1, 709-715.
- Thisse, B., Stoetzel, C., Gorostiza-Thisse, C. and Perrin-Schmitt, F. (1988) Sequence of the twist gene and nuclear localization of its protein in endomesodermal cells of early *Drosophila* embryos. *Embo J* 7, 2175-83.
- Thisse, C., Perrin-Schmitt, F., Stoetzel, C. and Thisse, B. (1991) Sequence-specific transactivation of the *Drosophila* twist gene by the dorsal gene product. *Cell* 65, 1191-201.
- Thisse, C., Thisse, B., Schilling, T.F. and Postlethwait, J.H. (1993) Structure of the zebrafish snail1 gene and its expression in wild-type, spadetail and no tail mutant embryos. *Development* 119, 1203-15.
- Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. and Higgins, D.G. (1997) The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucl. Acids Res.* 25, 4876-4882.
- Tokuoka, M., Imai, K.S., Satou, Y. and Satoh, N. (2004) Three distinct lineages of mesenchymal cells in *Ciona intestinalis* embryos demonstrated by specific gene expression. *Dev Biol* 274, 211-24.
- van der Kooij, A., Veraart, C.P.W.M. and van Loon, A.E. (1998) Cyclin A, cyclin B and stringlike are regulated separately in cell cycle arrested trochoblasts of *Patella vulgata* embryos. *Development Genes and Evolution* 207, 524-534.
- Vesely, J., Havlicek, L., Strnad, M., Blow, J.J., Donella-Deana, A., Pinna, L., Letham, D.S., Kato, J.-y., Detivaud, L., Leclerc, S. and Meijer, L. (1994) Inhibition of Cyclin-Dependent Kinases by Purine Analogues. *European Journal of Biochemistry* 224, 771-786.
- Vincent, S., Wilson, R., Coelho, C., Affolter, M. and Leptin, M. (1998) The *Drosophila* protein Dof is specifically required for FGF signaling. *Mol Cell* 2, 515-25.
- Wada, S. and Saiga, H. (1999) Cloning and embryonic expression of Hrsna, a snail family gene of the ascidian *Halocynthia roretzi*: implication in the origins of mechanisms for mesoderm specification and body axis formation in chordates. *Dev Growth Differ* 41, 9-18.
- Wang, S.M., Coljee, V.W., Pignolo, R.J., Rotenberg, M.O., Cristofalo, V.J. and Sierra, F. (1997) Cloning of the human twist gene: its expression is retained in adult mesodermally-derived tissues. *Gene* 187, 83-92.
- Weller, M. and Tautz, D. (2003) Prospero and Snail expression during spider neurogenesis. *Development Genes and Evolution* 213, 554-566.
- Wessel, D. and Flugge, U.I. (1984) A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. *Anal Biochem* 138, 141-3.
- Whitman, C. (1878) The embryology of Clepsine. *Q J Microsc Sci* 18, 215-315.
- Wieschaus, E., Nüsslein-Volhard, C. and Jürgens, G. (1984) Mutations affecting the pattern of the larval cuticle in *Drosophila melanogaster*. *Development Genes and Evolution* 193, 296-307.
- Wilkinson, D.G., Bhatt, S. and Herrmann, B.G. (1990) Expression pattern of the mouse T gene and its role in mesoderm formation. *Nature* 343, 657-9.

- Wilkinson, D.L. and Harrison, R.G. (1991) Predicting the solubility of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Biotechnology (N Y)* 9, 443-8.
- Wilson, E.B. (1892) The cell lineage of *Nereis*. *Journal of Morphology* 6, 361-480.
- Wilson, E.B. (1928) The cell in development and heredity. 3rd edition with corrections. . Macmillan Company, New York 1928. Reprinted in: Moore JA (eds) *Genes, Cells and Organisms*. Garland Publishing Inc, New York & London 1987.
- Wilson, R., Vogelsang, E. and Leptin, M. (2005) FGF signalling and the mechanism of mesoderm spreading in *Drosophila* embryos. *Development* 132, 491-501.
- Wolf, C., Thisse, C., Stoetzel, C., Thisse, B., Gerlinger, P. and Perrin-Schmitt, F. (1991) The *M-twist* gene of *Mus* is expressed in subsets of mesodermal cells and is closely related to the *Xenopus X-twi* and the *Drosophila twist* genes. *Dev Biol* 143, 363-73.
- Wu, S.-Y. and McClay, D.R. (2007) The Snail repressor is required for PMC ingression in the sea urchin embryo. *Development* 134, 1061-1070.
- Yamazaki, K., Akiyama-Oda, Y. and Oda, H. (2005) Expression patterns of a twist-related gene in embryos of the spider *Achaearanea tepidariorum* reveal divergent aspects of mesoderm development in the fly and spider. *Zoolog Sci* 22, 177-85.
- Yang, J., Mani, S.A., Donaher, J.L., Ramaswamy, S., Itzykson, R.A., Come, C., Savagner, P., Gitelman, I., Richardson, A. and Weinberg, R.A. (2004) Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis. *Cell* 117, 927-39.
- Yasui, K., Zhang, S.C., Uemura, M., Aizawa, S. and Ueki, T. (1998) Expression of a twist-related gene, *Bbtwist*, during the development of a lancelet species and its relation to cephalochordate anterior structures. *Dev Biol* 195, 49-59.
- Yasutake, J., Inohaya, K. and Kudo, A. (2004) Twist functions in vertebral column formation in medaka, *Oryzias latipes*. *Mech Dev* 121, 883-94.
- Yin, Z., Xu, X.L. and Frasch, M. (1997) Regulation of the twist target gene *tinman* by modular cis-regulatory elements during early mesoderm development. *Development* 124, 4971-82.
- Zeitlinger, J., Zinzen, R.P., Stark, A., Kellis, M., Zhang, H., Young, R.A. and Levine, M. (2007) Whole-genome ChIP-chip analysis of Dorsal, Twist, and Snail suggests integration of diverse patterning processes in the *Drosophila* embryo. *Genes Dev.* 21, 385-390.
- Zelada-Gonzales, F. (2005) Germline development in *Platynereis dumerilii* and its connection to embryonic patterning. PhD Thesis, Ruprecht-Karls-Universität, Heidelberg.
- Zuniga, A., Quillet, R., Perrin-Schmitt, F. and Zeller, R. (2002) Mouse Twist is required for fibroblast growth factor-mediated epithelial-mesenchymal signalling and cell survival during limb morphogenesis. *Mech Dev* 114, 51-9.

6 Zusammenfassung

Alle bilateralsymmetrischen Tiere (Bilateria) sind durch den Besitz dreier Keimblätter (Triploblastie), die während ihrer Embryonalentwicklung entstehen, gekennzeichnet. Die Spezifizierung der Keimblätter und deren Trennung durch den Gastrulationsprozess ist einer der grundlegendsten Schritte während der Embryonalentwicklung der Bilateria. Die Untersuchung der zugrunde liegenden molekularen Mechanismen beschränkte sich bis vor kurzem auf die Vertreter der Deuterostomia und der Ecdysozoa. Über die molekularen Grundlagen der Determination der Keimblätter bei den Lophotrochozoa, war bisher fast nichts bekannt. Einen großen Teil der Lophotrochozoa machen die Spiralia aus und inzwischen sind auch einige der Vertreter der Spiralia für die molekularen Methoden der modernen Entwicklungsbiologie zugänglich. Es sind bis heute aber keine molekularen Faktoren identifiziert worden, die das mesodermale Keimblatt der Spiraler determinieren. Zur weiteren Analyse dieser Fragestellung bot sich der Polychaet *Platynereis dumerilii* als Modellsystem an.

In dieser Arbeit wurden die zu *twist* und *snail* homologen Gene von *Platynereis* als Kandidatengene kloniert und ihre Expression in der Früh- und Larvalentwicklung charakterisiert und lokalisiert. Sowohl *Platynereis twist* als auch *Platynereis snail* werden maternal in die Eizelle eingelagert und ihre Expression findet sich während der gesamten Embryonalentwicklung. Eine durch Furchungsarrest mit Cytochalasin B vermittelte Zelllinienuntersuchung ergab, dass *Pdu-twist* in der 4d Zelllinie, die das komplette Rumpfmesoderm der Larve bildet, exprimiert wird. In der Trochophora werden sowohl *Pdu-twist* als auch *Pdu-snail* in den Mesodermanlagen, sowie in einem Teil des viszeralen Mesoderms der Larve exprimiert. In atoken Jungwürmern findet sich *Pdu-twist* Expression in der Wachstumszone in der neue Segmente durch Sprossung gebildet werden, ebenso wie bei regenerierenden Tieren, im präsumptiven Mesoderm sich bildender Segmente.

Durch die Injektion von *dsRNA* in adulte Tiere wurden parentale *RNAi* vermittelte, funktionelle Analysen durchgeführt. Diese Analysen ergaben, dass es sich bei *Pdu-twist*, wahrscheinlich in Kooperation mit *Pdu-snail*, um einen „Master-

Regulator“ für mesodermales Zellschicksal in *Platynereis* handelt, der sowohl eine maternale, als auch eine zygotische Komponente besitzt und dessen Funktionsverlust sowohl zum Ausbleiben der morphogenetischen Gastrulationsbewegungen, als auch der Determination und Differenzierung des Mesoderms im sich entwickelnden Embryo führt.

Um die Ergebnisse dieser Experimente zu verifizieren, wurde *Pdu-twist* heterolog in *E. coli* exprimiert, das Protein aufgereinigt und durch Immunisierung von Kaninchen polyklonale Antiseren gegen Pdu-Twist hergestellt. Die aufgereinigten Immunsereen wurden durch Western Blot Analysen und Immunfluoreszenzfärbungen auf ihre Spezifität überprüft.

Zur Analyse einer in der Evolution eventuell konservierten Funktion der Twist Transkriptionsfaktoren, wurden UAS-*Pdu-twist* transgene *Drosophila* hergestellt und für Rettungsexperimente an *twist*⁻ und *twist*, *snail*⁻ *Drosophila* Stämmen benutzt. In den Experimenten fanden sich keine geretteten Phänotypen, was dafür spricht, dass *Drosophila twist* nicht durch *Platynereis twist* ersetzt werden kann.

Dies ist das erste Mal, dass außerhalb der Insekta ein funktioneller Zusammenhang zwischen der Expression eines Twist Transkriptionsfaktors und der Spezifizierung mesodermalen Zellschicksals sowie der Gastrulation experimentell nachgewiesen wurde. Diese Ergebnisse eröffnen die Möglichkeit die molekularen Grundlagen der Mesodermspezifizierung bei inäqual furchenden Spiraliern näher zu analysieren und die durchgeführten Zellstammbaumanalysen mit molekularen Daten zu kombinieren. *Platynereis twist* ist die erste Keimblattterminante, die in Spiraliern bisher identifiziert wurde. Ebenfalls lassen sich durch vergleichende Analysen Rückschlüsse auf eine ursprüngliche Funktion der Twist-like Transkriptionsfaktoren bei der Aktivierung von Transkriptionskassetten, die für Zellbewegung, Zellform und Zellteilung zuständig sind, ziehen.

7 Appendix

7.1 Veröffentlichungen und Tagungsbeiträge

Schaub C, Dorresteijn AWC (2007) *Platynereis dumerilii twist* is required for gastrulation and mesodermal cell fate decision, *Poster presentation, 17th scientific conference of the Gesellschaft für Entwicklungsbiologie*

Domsch K, Schaub C, Dorresteijn AWC (2007) Analysis of the *Pdu-myosin* expression pattern and the identification of *Pdu-myosin* as a mesodermal differentiation marker, *Poster presentation, 17th scientific conference of the Gesellschaft für Entwicklungsbiologie*

Schaub C, Dorresteijn AWC (2005) The role of *twist* in the development of *Platynereis dumerilii*, *Poster presentation, 16th scientific conference of the Gesellschaft für Entwicklungsbiologie*

Schaub C (2005) The role of *Platynereis twist* during embryonic development, *Oral presentation, 3rd Winterschool of the International PhD Program, (Graduiertenkolleg 767) Transcriptional Control of Developmental Processes, Kleinwalsertal, Austria*

7.2 Einbuchstabencode für die Aminosäuren

Aminosäuren mit unpolaren Seitengruppen:

Alanin A

Valin V

Leucin L

Isoleucin I

Prolin P

Methionin M

Phenylalanin F

Tryptophan W

Aminosäuren mit polaren, aber ungeladenen Seitengruppen:

Glycin G

Serin S

Threonin T

Cystein C

Tyrosin Y

Asparagin N

Glutamin Q

Aminosäuren mit negativ geladenen Seitengruppen:

Asparaginsäure D

Glutaminsäure E

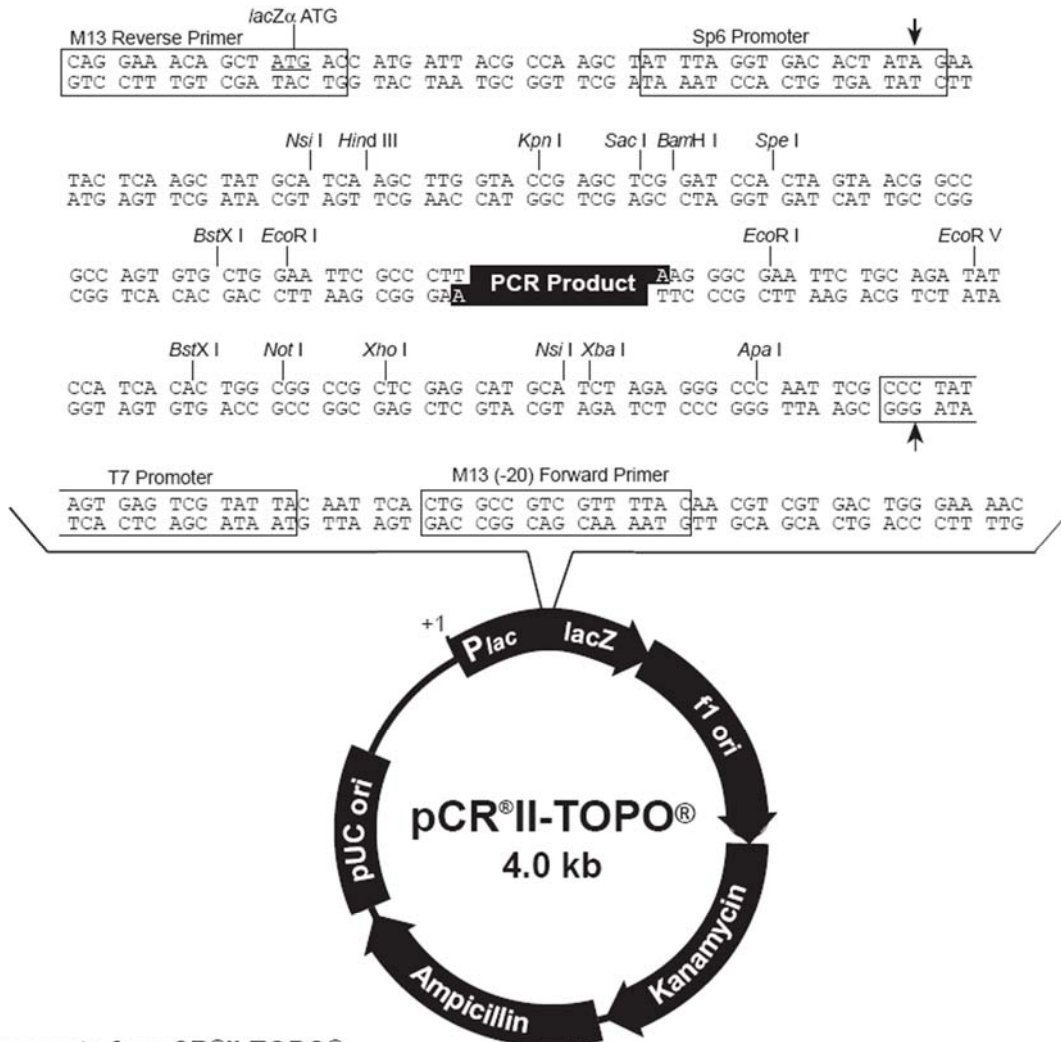
Aminosäuren mit positiv geladenen Seitengruppen:

Lysin K

Arginin R

Histidin H

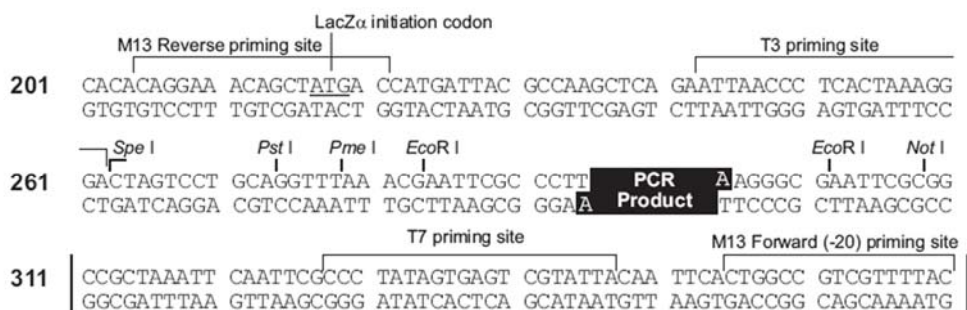
7.3 Plasmidkarte pCRII-TOPO



Comments for pCRII-TOPO® 3973 nucleotides

LacZ α gene: bases 1-589
 M13 Reverse priming site: bases 205-221
 Sp6 promoter: bases 239-256
 Multiple Cloning Site: bases 269-383
 T7 promoter: bases 406-425
 M13 (-20) Forward priming site: bases 433-448
 f1 origin: bases 590-1027
 Kanamycin resistance ORF: bases 1361-2155
 Ampicillin resistance ORF: bases 2173-3033
 pUC origin: bases 3178-3851

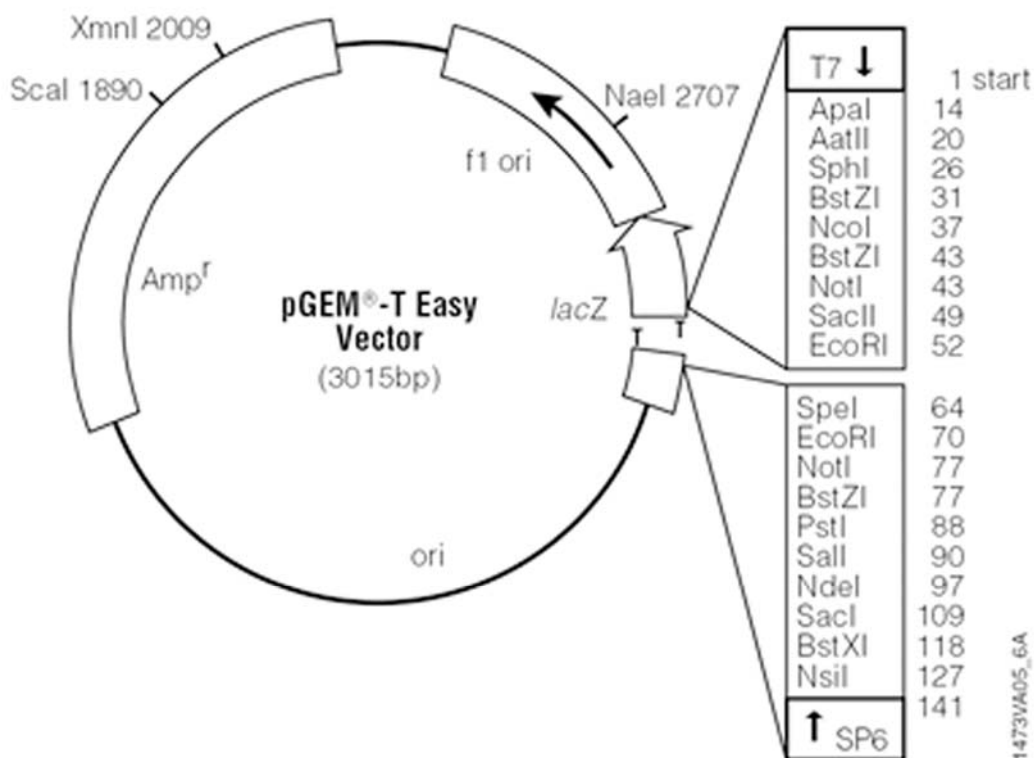
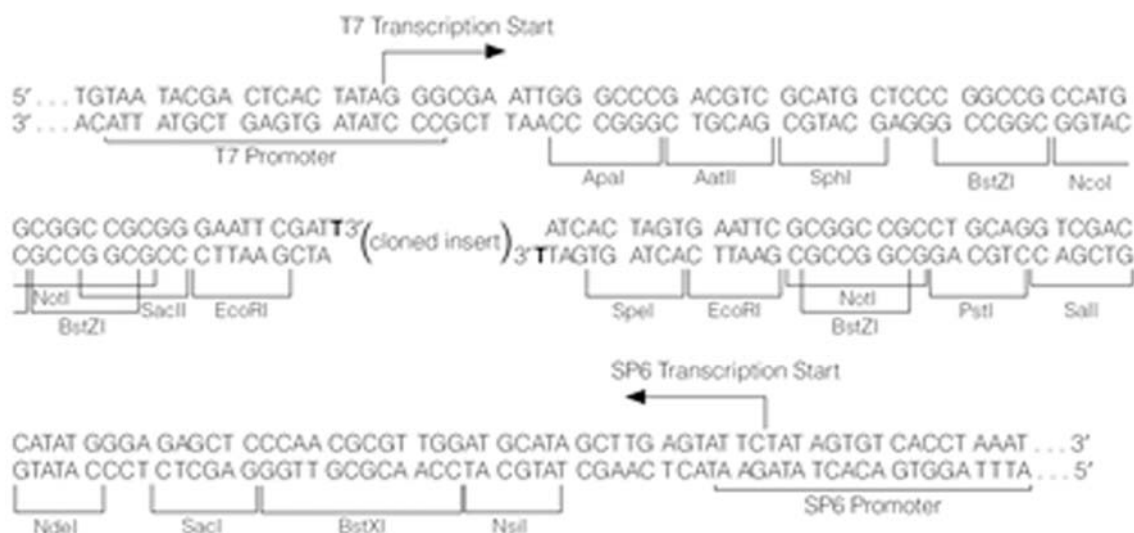
7.4 Plasmidkarte pCR4-TOPO



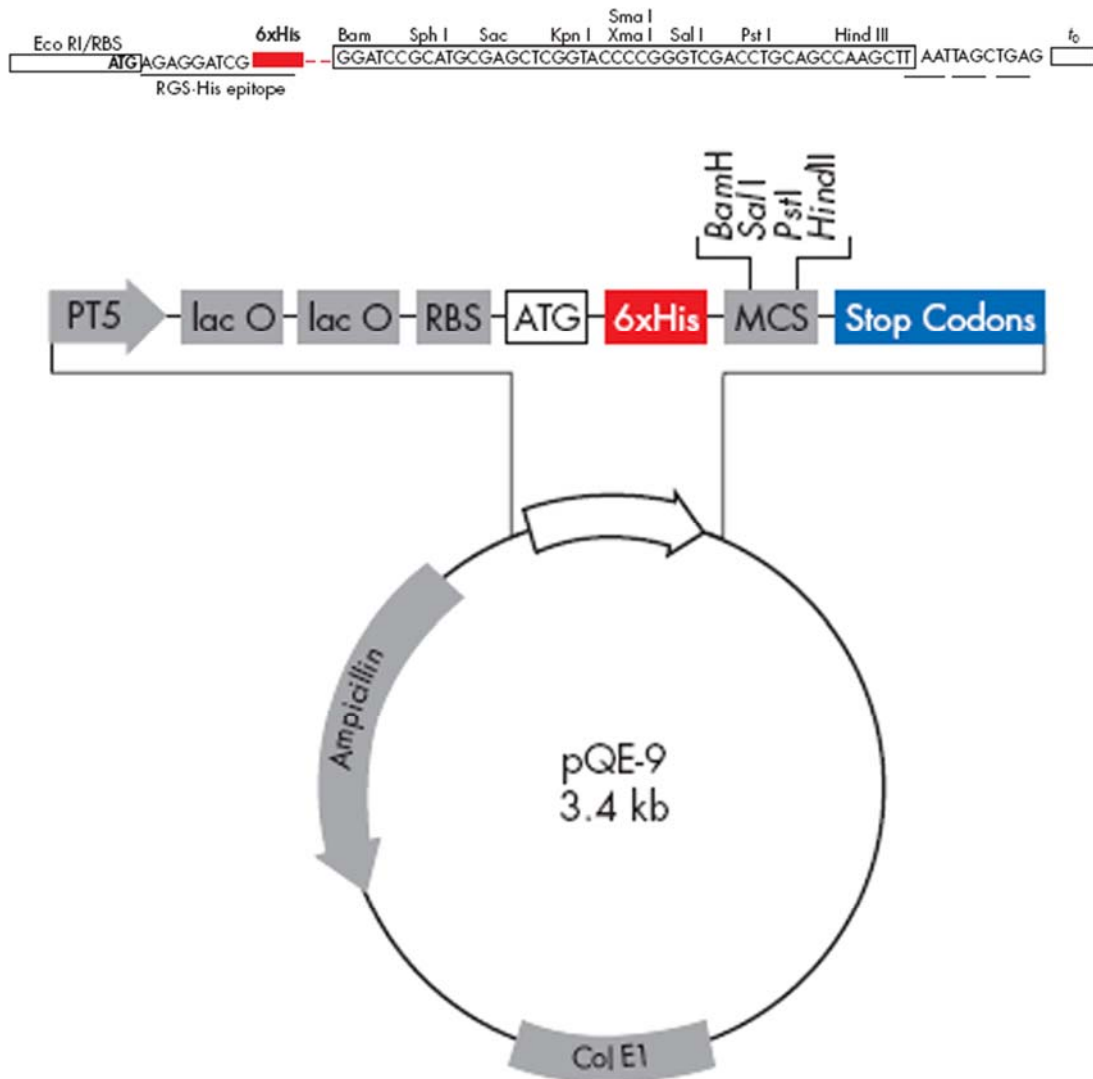
Comments for pCR[®]4-TOPO[®] 3956 nucleotides

- lac* promoter region: bases 2-216
 - CAP binding site: bases 95-132
 - RNA polymerase binding site: bases 133-178
 - Lac repressor binding site: bases 179-199
 - Start of transcription: base 179
 - M13 Reverse priming site: bases 205-221
 - LacZ α -*ccdB* gene fusion: bases 217-810
 - LacZ α portion of fusion: bases 217-497
 - ccdB* portion of fusion: bases 508-810
 - T3 priming site: bases 243-262
 - TOPO[®] Cloning site: bases 294-295
 - T7 priming site: bases 328-347
 - M13 Forward (-20) priming site: bases 355-370
 - Kanamycin promoter: bases 1021-1070
 - Kanamycin resistance gene: bases 1159-1953
 - Ampicillin (*bla*) resistance gene: bases 2203-3063 (c)
 - Ampicillin (*bla*) promoter: bases 3064-3160 (c)
 - pUC origin: bases 3161-3834
- (c) = complementary strand

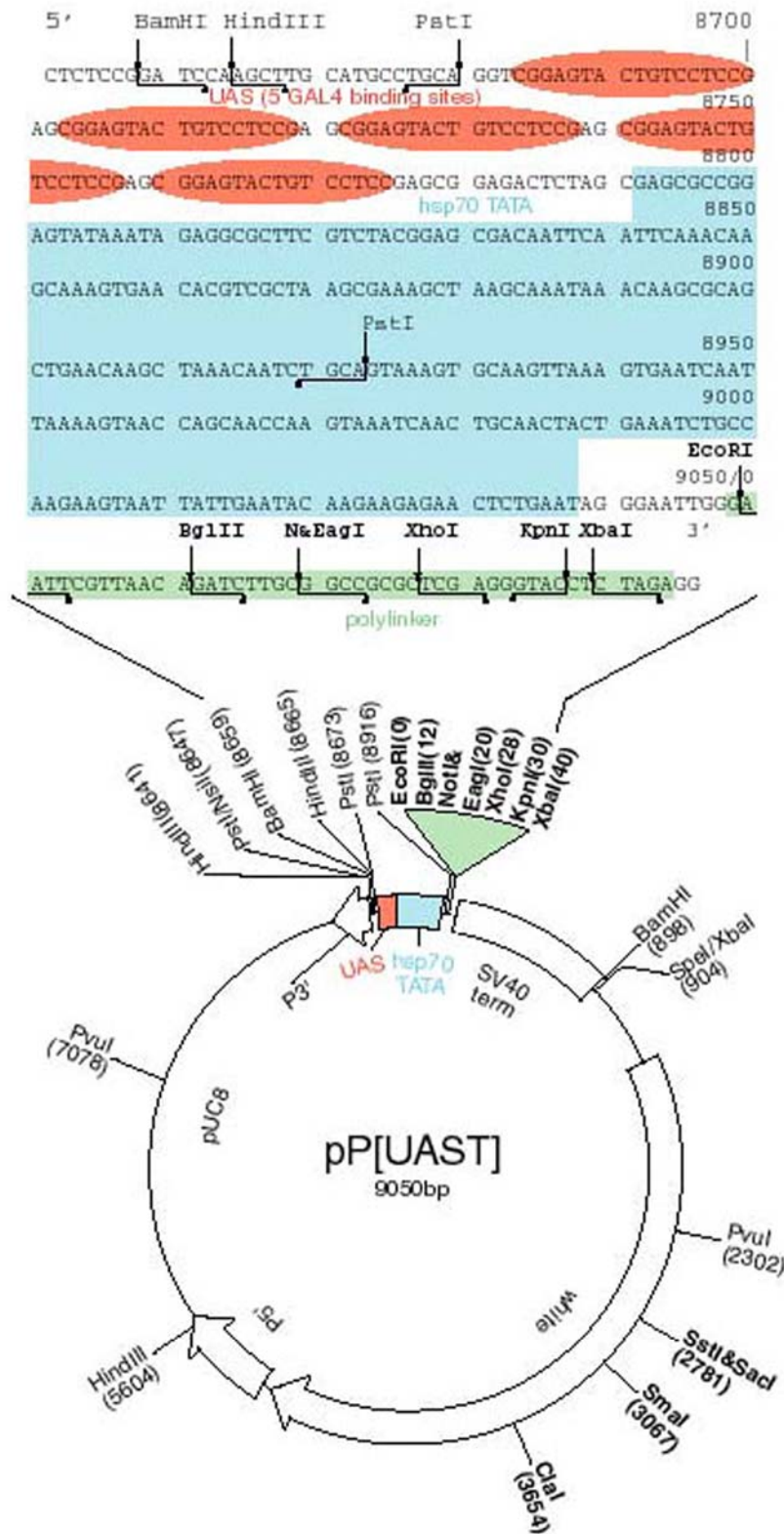
7.5 Plasmidkarte pGEM-T easy



7.6 Plasmidkarte pQE-30



7.7 Plasmidkarte pUAST



<http://www.gurdon.cam.ac.uk/~brandlab/reagents/pUAST.html>

7.8 Plasmidkarten Pd48.3 und PdRACE7.1

7.8.1 Pd48.3 pCRII-TOPO



Abbildung 7.1: Vektorkarte Pd48.3. Der Pfeil zeigt die Leserichtung der cDNA an. Die angegebenen Schnittstellen können zur Linerisierung des Plasmids und die angegebenen Promotoren zur *in vitro* Transkription benutzt werden

7.8.2 PdRACE7.1 pCR4-TOPO



Abbildung 7.2: Vektorkarte PdRACE7.1. Der Pfeil zeigt die Leserichtung der cDNA an. Die angegebenen Schnittstellen können zur Linerisierung des Plasmids und die angegebenen Promotoren zur *in vitro* Transkription benutzt werden

7.9 Insertsequenz von Pd48.3

>Pd48.3

AGTTCATGCTAAGCCCTCGACTGGATTACTGCTAACGACTGTAGTGGAATGATACAGGAGT
 ACATAGAAGGGACTGTTGACAACGGGAGTGCAAGAGACAGTTACTTGCACCGTAAGAGCCC
 TCAGCATCATCAGCCAGTGCTCCGTCCTCCCCCGGCCCTCACCATGAGCGCCCTGCACGAC
 CTCCCCGCTCCCCGATCTGCTCCGGCAACGGATGTTCCAGCTCCGACGAGACCGACGCTT
 ATCGGGAGGACGACTTCGAAACTTTGAGAAACGGTGGAAAGTCGGAAGCGCAAGAACAGTGT
 GTCAGGATGCAGCGACAGCAGTGGATCCCCGGACGGAAGTGGCGGATCTCGGAAGATGCGG
 AAAAAGAGTCCTCCCAGCCAGTCGTTTCGAGGACCTGCAGAACCAGCGTGTCTTGCCGAACG
 TTCGTGAACGGCAAAGGACGCAATCGCTCAACGATGCCTTCTCGCAACTCAGAAAGATCAT
 CCCCACCCTCCCATCAGACAAACTGAGCAAAATACAGACTCTCAAATTGGCCACTCGATAC
 ATAGACTTTCTCTACCAGGTGTTGCGGACCGACGACGCTTCTTTAGTGGCAGACCACAAGC
 TCATTCCCCCGTCCTGCAGTTA

7.10 Insertsequenz von PdRACE7.1

>PdRACE7.1

CACAAGCTCATTCCCCCGTCCTGCAGTTACGTGGCCACGAGAGACTCAGCTACGCCTTCT
 CAGTCTGGCGAATGGAGGGTGCCTGGTCCATGAACGGAGTCAACGGCCACTGATATCAAGA
 TGATGGTTTTCCAGGAAGTCTGCAGCTGTTTTGAGGTGTCATACAGAAGATGAAGCAACCT
 GTCCGCCTCAGCAATCTCGACCTTTTCGTGACCTTTCGTGACCTTCAGGATCCAATGACCT
 TGACAATATCTGGTGGCGACCTCTGGTGTCTTGTGATCTTGGACCATCAACAAATTGACAA
 CAATCCAGAAGAGAGAATCCACTTCAGTCAAGCGGTCTTGAAGGGGATAGTCATTTCGATCT
 GATACAACAGCTGTGAATTGAACAATAACACCAGAAACCATCAATCTAAAAACAAAAGGCA
 TTGCAAAAACCTCACCCTGGGTTTTTAATCATCACATCATTCAATTATTATACAACAACAAC
 ACATCACATTGTTGTGGACTTTAATCAAAAACCTATCATAATCATTCTCTCGCCATTTTGTA
 TATAACTCATATTCATTATCAATTGTTGTTGAAACTTGTATGAGACATTTTTATGCTATTT
 TTGAGACATTTTTGTCTTTTCTGCATTTCTGACAATTTCTCCACCCGTCGTGCCTTGATC
 TTCTGCCTAGTCTGACATTTGAACTTTTTCGATCTTTGATCCTTCGTGACACACAATGACA
 CTGGATCCTTAAGAATTGTTTTGATCCTCCATAGCTAGACATCCAAACTCCTTGATTTCA
 CAATGGTGCTGTAGATTGAGATTCCTTTAGTTTTTGTAGACGATTCTGTCTAAATTTGAAA
 AAAAAAGTGTGTGTAGTAAGATGAACTCCAGAATTGTTAATTTAAGTAGAATATTTTTGAT
 ACAACCAATTAATTTTCGTGAATGATGATATTATCTATTGTTTACTATGGTAATCTTCTTAA
 AAGTTGATACATTAGTTGATACAATGTAATTAATAATCCTTAATATGGAATGATAATGATGA
 TTCTTACTAGAGAGGTAATTCTATTAACATTTTTTAATTGTACATATAATGAGACCTGAAT
 TCTTGCTCATGATTCTGTATAATGTTGCCATGGCTATAATGGTTGTTACTATGCAGAATT
 GTCCCCTCAGCTGCTGCTTGTGAAAACGTGGCTTGCAGCCCAAAAATGCTTAATGTCTGAA
 TCAATGAAGTTGTGATTTCTGCTCACATCTAATAAATTGTTTTGAAATGCAACAAAAAAA
 AAAAAAAAAA

7.11 Komplettes Alignment von Pdu-Twist

Twist-Pd	:	MIQEYIEG	:	8
Twist-Ec	:	MKES...V	:	5
Twist-Hr	:	MMSP....	:	4
Twist-Tt	:		:	-
Twist-Ha	:		:	-
Twist-Pv	:	MITD...Q	:	5
Twist-Xl	:	MMQE...E	:	5
Twist-Dr	:	MFEEEEAMHE...D	:	10
Twist-Mm	:	MMQD...V	:	5
Twist-Hs	:	MMQD...V	:	5
Twist2-Hs	:	MEE...G	:	4
Twist-Ce	:	MVAR....	:	4
Twist-Dm	:	MMSARSVSPKVLLDISYKPTLPNIMELQNNVIKLIQVEQQAYMQSGYQLQ		:	50
Twist-Pc	:	MQEH....	:	4
Twist-Pd	:	TVDNGSARDSYLHRKSPQHHPVLRPP.....	PALTMSAL	:	43
Twist-Ec	:	SLAPITTF SNH SVTNTLQNGNISCSFE.....	IYSGLNFT	:	40
Twist-Hr	:	SFPTTSSSHHLRRLTQQQRQRQPAS.....	TDSVIKNC	:	39
Twist-Tt	:		:	-
Twist-Ha	:		:	-
Twist-Pv	:	QLSQDSADDKFRLSDSSEN.....	DTE	:	27
Twist-Xl	:	SSSPVSPVD..SLSNSEEEELDKQOS.....	KRGCRKR	:	35
Twist-Dr	:	SSSPVSPVD..SLGNSEEEELDRRQP.....	KRVSRKK	:	40
Twist-Mm	:	SSSPVSPADD.SLSNSEEEEPDRQQPAS.....	GKRGARKR	:	39
Twist-Hs	:	SSSPVSPADD.SLSNSEEEEPDRQQPPS.....	GKRGGRKR	:	39
Twist2-Hs	:	SSSPVSPVD..SLGTSEEELE.RQP.....	KREGRKR	:	33
Twist-Ce	:	.RKGERVVRKNEVEN.....		:	18
Twist-Dm	:	HQQQHLHSHQHHQQHHQQQAQYAPLPSEYAAYGITELEDTDYNI PSNEV		:	100
Twist-Pc	:	QLSRVTSGNKKKYQSFDE.....	SRDE	:	27
Twist-Pd	:	HDLPAPPICSGNGCSSSDE.....	TDAYREDDFETLRNGGSRKR	:	82
Twist-Ec	:	DNSSDDPT SAY.....	LQDDEIASKH..RKRSR	:	67
Twist-Hr	:	LFNNKNDTSTHLLTTHLQGVNKIYFHNNNNCSNDSNNNSVDLKPATKKRKR		:	89
Twist-Tt	:		:	-
Twist-Ha	:		:	-
Twist-Pv	:	DSRSKDDNIDSS.....	LDSEEIGEIN..NSRKR	:	54
Twist-Xl	:	RSARKSP.....	EDPDSPI S..VKRNR	:	55
Twist-Dr	:	RASRKNA.....	EDSDSPTP..GKRKR	:	60
Twist-Mm	:	RSSRRSAGGSAGPGGATGG.....	GIGGGDEPGSPAQ..GKRGR	:	76
Twist-Hs	:	RSSRRSAGGGAGPGGAAGG.....	GVGGGDEPGSPAQ..GKRGR	:	76
Twist2-Hs	:	RYSKKSS.....	EDGSPTP..GKRGR	:	52
Twist-Ce	:		:	-
Twist-Dm	:	LSTSSNQSAQSTSLELNNNNTSSNTNSSGNPSPGFDGQASSGSSWNEHGR		:	150
Twist-Pc	:	KRMKCD S.....	TDKLESNS....NSK	:	45

Twist-Pd	: KNSVSGCSDSSGSPDGS.....	: 99
Twist-Ec	: DLMSSG.MGSLVVPSNTSVPLSQLTTNIDPIYRFSELEARLDGGALSYF	: 116
Twist-Hr	: NIKKLTKSDSRPIRTSESTKNLDLQNNVVKVELDQSDNNTAENEDSKSSV	: 139
Twist-Tt	:	: -
Twist-Ha	:	: -
Twist-Pv	: MFNRSGDMG.....	: 63
Twist-Xl	: K.....	: 56
Twist-Dr	: K.....	: 61
Twist-Mm	: KSAGGGGGGAGGGGGG.....	: 93
Twist-Hs	: KSAGCGGGGAGGGGG.....	: 92
Twist2-Hs	: K.....	: 53
Twist-Ce	:	: -
Twist-Dm	: RARSSGDYDCQTGGSLVMQPEHKKLIHQQQQQQQHQQQIYVDYLPTTVD	: 200
Twist-Pc	: N.....	: 46
Twist-Pd	:GGSRKMRKKS P .	: 110
Twist-Ec	: ANTGRCGSASASDPLANNLRSS SPQRIKGRGRKQ PS	: 152
Twist-Hr	: KDSKNNHCNNTAPT TTTT PSIN.....FNTQ TTTT STYRK LPN	: 179
Twist-Tt	:	: -
Twist-Ha	:	: -
Twist-Pv	:C.....QSLKKMRKQ P .	: 75
Twist-Xl	:ASSTG SSP .	: 64
Twist-Dr	:CSN SSSSP .	: 69
Twist-Mm	:GGSS SSGGSSP .	: 104
Twist-Hs	:SSSG GGSP .	: 100
Twist2-Hs	:G SPSA .	: 58
Twist-Ce	:	: -
Twist-Dm	: EVAS AQ SCPGVQ STCT SPQSH DF PDEELPEHKAQ VFL PLYNN QQQ SS Q	: 250
Twist-Pc	:	: -
Twist-Pd	:PSQ SFED	: 117
Twist-Ec	: AAIT.....AR PSQCFED	: 165
Twist-Hr	: AT TNNI AYNHNGSGKN YYS NYNS HNN SP PL	: 209
Twist-Tt	:	: -
Twist-Ha	:	: -
Twist-Pv	:Q TYED	: 80
Twist-Xl	:Q SFEE	: 69
Twist-Dr	:Q SLED	: 74
Twist-Mm	:Q SYEE	: 109
Twist-Hs	:Q SYEE	: 105
Twist2-Hs	:Q SFEE	: 63
Twist-Ce	:	: -
Twist-Dm	: L QQQ PH Q SHAQ M HFQ N AYR Q S F E G YEPAN S L N G S AY S SSDR D MEY A R	: 300
Twist-Pc	:I YQK	: 50

Twist-Pd : : -
 Twist-Ec : : -
 Twist-Hr : : -
 Twist-Tt : : -
 Twist-Ha : : -
 Twist-Pv : : -
 Twist-Xl : : -
 Twist-Dr : : -
 Twist-Mm : : -
 Twist-Hs : : -
 Twist2-Hs : : -
 Twist-Ce : : -
 Twist-Dm : HNALSSVSDLNNGGVMS PACLADDGSAGSLLDGS DAGGKAFRKP RRRLKRRK : 350
 Twist-Pc : : -

Twist-Pd :LQNQRVLANVRERQRTQSLNDAFSQLRKKIIP TLPSDKLSKI : 158
 Twist-Ec :VHTQRVIANVRERQRTQSLNEAF AHLRKKIIP TLPSDKLSKI : 206
 Twist-Hr :SLQ TQRVLANVRERQRTQSLNDAFSQLRKKIVPTLPSDKLSKI : 251
 Twist-Tt :QRVMANVRERQRTQSLNDAFTQLRTIIP TLPSDKLSKI : 38
 Twist-Ha :QRVMANVRERQRTQSLNDAFAQLRKKIIP TLPSDKLSKI : 38
 Twist-Pv :IQTQRVMANVRERQRTESLND AFAQLRKKIIP TLPSDKLSKI : 121
 Twist-Xl :LQSQRVMANVRERQRTQSLNEAFSSLRKKIIP TLPSDKLSKI : 110
 Twist-Dr :LQTQRVMANVRERQRTQSLNEAFASLRKKIIP TLPSDKLSKI : 115
 Twist-Mm :LQTQRVMANVRERQRTQSLNEAFAALRKKIIP TLPSDKLSKI : 150
 Twist-Hs :LQTQRVMANVRERQRTQSLNEAFAALRKKIIP TLPSDKLSKI : 146
 Twist2-Hs :LQSQRILANVRERQRTQSLNEAFAALRKKIIP TLPSDKLSKI : 104
 Twist-Ce :VQQRACANRRERQRTKELNDAFTLLRKKLIP SMPSPDKMSKI : 58
 Twist-Dm : PSKTEETDEF SNQRVMANVRERQRTQSLNDAFKSLQQIIP TLPSDKLSKI : 400
 Twist-Pc :THRVIANIRERQRTQALNQSFSTLRKKIIP TLPSDKLSKI : 89

Twist-Pd : QTLKLATRYIDFLYQVLR TDDASLVADHKLI PP..... : 191
 Twist-Ec : QTLKLATRYIDFLFQV LQNDD...MEMKMPT..... : 234
 Twist-Hr : QTLKLATRYIDFLYDQLENNKQQQQHQQQQQQHQS.....MD : 290
 Twist-Tt : QTLKLATRYIDFLYQVLRNDD..ILSDSKMS..... : 67
 Twist-Ha : QTLKLASRYIDFLYQVLRSDQ...ADHKLST..... : 66
 Twist-Pv : QTLKLASRYIDFLYQVLRSED...ADSKMVN..... : 149
 Twist-Xl : QTLKLASRYIDFLCQV LQSDE...LDSKMA..... : 137
 Twist-Dr : QTLKLAARYIDFLCQV LQSDE...LDSKMS..... : 142
 Twist-Mm : QTLKLAARYIDFLYQV LQSDE...LDSKMA..... : 177
 Twist-Hs : QTLKLAARYIDFLYQV LQSDE...LDSKMA..... : 173
 Twist2-Hs : QTLKLAARYIDFLYQV LQSDE...MDNKMT..... : 131
 Twist-Ce : HTLR IATDYI SFLDEM QKNGCKLYGHSIFDEK..... : 90
 Twist-Dm : QTLKLATRYIDFLCRMLSSSDISLLKALEAQGSPSAYGSASSLLSAAANG : 450
 Twist-Pc : QTLRLAAMYIDFLRHVIRRGE...INMDSSD..... : 117

Twist-Pd :SCSYVAHERLSYAFSVWRMEGAWS...MNGV....NGH : 222
 Twist-Ec :SCGYVAHERLSYAFSVWRMEGAWN...NTGA....GDL : 265
 Twist-Hr : EFANGGYVSGLNQSPVIVSSDKLGYAFSVWRMEGAWQ...MKNSELNNGC : 337
 Twist-Tt :SCNYVASERLSYAFSVWRMEGE..... : 89
 Twist-Ha :SCSYVASERLSYAFSVWRMEGE..... : 88
 Twist-Pv :SCSYMAHERLSYAFSVWRMEGA..... : 171
 Twist-Xl :SCSYVAHERLSYAFSVWRMEGAWS...MSAS....H.. : 166
 Twist-Dr :SCSYVAHERLSYAFSVWRMEGAWS...MSTS....H.. : 171
 Twist-Mm :SCSYVAHERLSYAFSVWRMEGAWS...MSAS....H.. : 206
 Twist-Hs :SCSYVAHERLSYAFSVWRMEGAWS...MSAS....H.. : 202
 Twist2-Hs :SCSYVAHERLSYAFSVWRMEGAWS...MSAS....H.. : 160
 Twist-Ce :RGINLQSAFNMRGNNGYTPIAGPSQLPPLQSA : 123
 Twist-Dm : AEADLKCLRKANGAPIIPPEKLSYLEFVWRMEGDAQ...HQKA..... : 490
 Twist-Pc :ETFEQAERLSYAFSVWRMEGDFYSRDKTAHYFTEQEL : 155

Twist-Pd : : -
 Twist-Ec : APNTQGGPHGLPPLK..... : 281
 Twist-Hr : YLRNGSSAGGSSNNVRDGSVIG..... : 359
 Twist-Tt : : -
 Twist-Ha : : -
 Twist-Pv : : -
 Twist-Xl : : -
 Twist-Dr : : -
 Twist-Mm : : -
 Twist-Hs : : -
 Twist2-Hs : : -
 Twist-Ce : HI PPPAPSSI PPHCLMPQPWYQTCPPPKQEFHELCP IST PNPNSNPQLT : 173
 Twist-Dm : : -
 Twist-Pc : NLCEYNFHS SFGNRLFYKAGIEAVNSADSDDITCILNTFLEGRI..... : 199

Twist-Pd : : -
 Twist-Ec : : -
 Twist-Hr : : -
 Twist-Tt : : -
 Twist-Ha : : -
 Twist-Pv : : -
 Twist-Xl : : -
 Twist-Dr : : -
 Twist-Mm : : -
 Twist-Hs : : -
 Twist2-Hs : : -
 Twist-Ce : PIHWQ : 178
 Twist-Dm : : -
 Twist-Pc : : -

Abkürzungen: Ce *Caenorhabditis elegans*, Dm *Drosophila melanogaster*, Dr *Danio rerio*, Ec *Enchytraeus coronatus*, Gg *Gallus gallus*, Ha *Helix aspersa*, Hr *Helobdella robusta*, Hs *Homo sapiens*, Mm *Mus musculus*, Pc *Podocoryne carnea*, Pd *Platynereis dumerilii*, Pv *Patella vulgata*, Tt *Transennella tantilla*, Xl *Xenopus laevis*

7.12 GenBank Accessionnumbers der Twist Homologen

Spezies	Accessionnumber
Twist-Ce	AAC26105
Twist-Dm	CAA31024
Twist-Dr	AAF17606
Twist-Ec	CAD47857
Twist-Gg	AAM95161
Twist-Ha	AAN03867
Twist-Hr	AAL05567
Twist-Hs	CAA62850
Twist2-Hs	NP_476527
Twist-Mm	P26687
Twist-Pc	CAC12667
Twist-Pv	AAL15167
Twist-Tt	AAN03868
Twist-Xl	AAA50008

7.13 Plasmidkarten Sna5_1200 und Sna3_1200

7.13.1 Sna5_1200 pGEM-T easy



Abbildung 7.3: Vektorkarte Sna5_1200. Der Pfeil zeigt die Leserichtung der cDNA an. Die angegebenen Schnittstellen können zur Linerisierung des Plasmids und die angegebenen Promotoren zur *in vitro* Transkription benutzt werden

7.13.2 Sna3_1200 pGEM-T easy

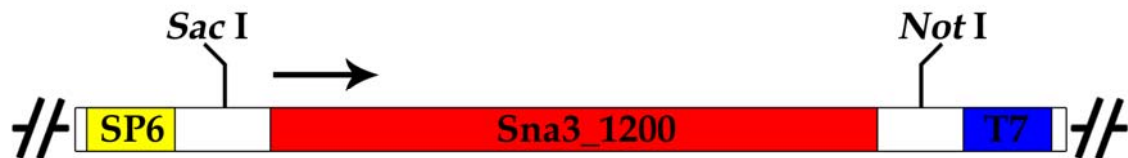


Abbildung 7.4: Vektorkarte PdSna3_1200. Der Pfeil zeigt die Leserichtung der cDNA an. Die angegebenen Schnittstellen können zur Linerisierung des Plasmids und die angegebenen Promotoren zur *in vitro* Transkription benutzt werden

7.14 Insertsequenz von Sna5_1200

>Sna5_1200

AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACGCGGGGACTTGAAGTTTGTGTCAGCATTGCTGTACACA
 TCAGACAACCTTATCTACACTTACTTCACTCAAGATCATCTACATTTGACACATATTGGATT
 TACACGTCAGTCAAGATGCCGAAAAGTTTTTTGATTAAAAAACATGGAGCTACTCCAGTGA
 CACCTTGCGGGATCAAGAGATCAGATGTGATGACGTCACAAGAGGATCAGACTTCATCCAG
 AGATCACATGGCTACAGAATCTGTGATGAAGCCATCCAGCCAGCTTCCTCCCTGCAGCCCG
 ACTCTGCCCATGAGTCCGATCTCCAGACAAGACGAGGTCCATGAGACGGGCCTTCCTGCTG
 CTCACTCCCCGGGGCCTCCAGCCCACACAATGCCGGAGCATCTCCCGTTCAGCAGAGGAC
 CCCCAGCCCTTTTTCGATCTCAGCTATCCTCAGTTCACCGGGCAGCAAGAGTCCCCCTTCA
 AGACCCTTGGCCTTCGTGCCCCAGCCCTTCTACCCTGTCTACGCCCCATTCTTCAATGCTG
 CTGATAAAGGAATGATGAGTCCGCCCTGCCGAAACAACAACACAGCCCCGTTACCATCA
 AGTTCATCAAGTTCACCATCAAGTTCACCAAGTTCACCATCAAGTTCAGAGCCAGGGACAC
 AACCAAGTTCAGCCAGCTCATCAAGTTGCTCAGCCAGCATCTCACAGTCATCACCCACAAG
 TTCCAGTCTCCCCAAGCCATCACCATAAAGTCCAGCCAGTTCACCACCAAGTCCAGTGTC
 ACCAAGCCACCACCACCATCACCAATGTGGATCTCACCATCACCATCACCAAGCAGCTCAA
 GTGCAATGCCAAGAAGCCATGGATTACACTGTAACAACCACCCCATCAAAAAAGACACTC
 CTAAAGACTTCGACCCTGCTGTGGTTGTGTCAGTGAAGGTCCATCCAACCCTGCTAAAGGACC
 TCCCCGATTCAACTGCGAAGGATGTGGCAAAACGTACGCCACCTTCAGCGGCCTCTCCAAG
 CACAAGAGATTCCTACTGCGTCTCCGAGATCAAGAAAGAATTCTCGTGCAAATTTCTGCGACA
 AGACCTATTCTCTACTAGGGGCGCTGAAGATGCACATCCGGACGCACACCCTGCCCTGCAA
 ATGCCCCCTCTGT

7.15 Insertsequenz von Sna3_1200

>Sna3_1200

ACCCTGCCCTGCAAATGCCCCCTCTGTGGCAAGTCCTTCTCCCGGCCCTGGTTGCTGCAAG
 GACATTTGCGAACCACACTGGCGAGAAGCCCTTCTCTTGCTCCCCTGCTCGAGGGCCTT
 TGCCGACAGGTCCAACCTGAGGGCCACCTCCAGACGCACTCCGAGGTCAAGAAATACAGC
 TGCAAAAACCTGCTCCAAGACTTTTAGCAGGATGTTCCCTGCTGCTGAAGCACGAGGATGGGG
 GGTGCACAGAAAAACAATGATAGGAAGATGATAGTGATAAAATATGTATTTGTAATGCAGG
 CCTTGATTTGACAAATTTCTTGAGGGGATAATTGACCGGGACCAAGCCCCAAAAGCCCCCCC
 CCTTAAAATACGCCCATGCATTGTCTTTTTGGTCCATGGGAGGCTTTTCAGAGCTTGCAAAT
 TCTACTTTTTTAGGGTATCGCAATTTACCAGTTGAGCTGACCAAGACCATGAGACAAATG
 GATTAGTAACTGTCTTTCCCAAGCTCAAATGTTTTCGTCTAGGATGGTAGTCAAATTCAGT
 GTTAAGCTGCGGATGGTAGTCATGTCAAGCTGGAATTATCAAGCATTTC AATTGGCGAATA
 TAGATTGCCAGCTTTTGTCTGTAATTA AAGCACAACATTTTGATGTACTTTTCATTTCAA
 CACCAGAAAGGGAAGCCTGTTACATGATGCATTTAGATTACGCTGTGAATACTGGATTAT
 AGAACTATTAGAAGCAGAATAGTGATATTTTATAAATGTCAATGTTTTAACATGAAGTGGA
 TCTCATTGGAAAATAGATTGCATTTATTATTATAGAAAAGCAACACTCGTTTTTTGTTCTTT
 ATGTATGTATAGGCCAAATCTTGTCTTTTAGACATCAATTTAAAACAAGATGCGTTATAT
 TTGTTAACCATTATTATATTGTAATAATTGTATATAAAATTTGTCGTATCTAATCAGTATT
 TATCAAACAGCAGTCACGTGACATCAATCAACCATCATGTTGAATCTAGATATAAATGTGT
 AGTTTAATTATCAAATTAGCCGAATAGTATTAATGATAGTGGCCTGTGTATCTTAGAGCAT
 TGTA AAAATGTATAGAATCCTAATATATCGTGGAGCATTATATTGTTGCTTGTGATCTCAG
 CATCTGTAGCCATTTCTCGCATGACAATGGGTTGTATGACGTCAAATGATTTCAGTTGATTT
 ACAATTGAATTATGATTTATACATTTTGTGATTTCTTTAGTTGTCAAATAAATTTCCAAA
 AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

7.16 Komplettes Alignment von Pdu-Snail

	*	20	*	40	*	
Snail-Pd	:	:	:	-
Snail-Lv	:	:	:	-
Snail1-Pv	:	:	:	-
Snail2-Pv	:	:	:	-
Snail-Dm	:	:	:	-
Snail-Bf	:	:	:	-
Snail-Dr	:	:	:	-
Snail-Tr	:	:	:	-
Snail-Xl	:	:	:	-
Snail-Gg	:	:	:	-
Snail-Mm	:	:	:	-
Snail-Hs	:	:	:	-
Snail2-Dr	:	:	:	-
Snail2-Tr	:	:	:	-
Snail2-Mm	:	:	:	-
Snail2-Hs	:	:	:	-
Snail3-Hs	:	:	:	-
Snail3-Mm	:	:	:	-
Snail-Ci	:	MTSVEPMLYQGKHAVQKNEGESTR	:	PCTLSGDDSFYCSGESTNSTSSPTSS	:	50
Snail-Pc	:	:	:	-
Snail-Har	:	.MDMCFISYEEKKKDIIDTNDSS	:	TLYDDSCSSSNDECSAPTSVTS	:	49
	60	*	80	*	100	
Snail-Pd	:	:	:	-
Snail-Lv	:	:	:	-
Snail1-Pv	:	:	:	-
Snail2-Pv	:	:	:	-
Snail-Dm	:	:	MAANYKSCPLKKRPIVFVEERLPQTEALALTKDSQFA	:	37
Snail-Bf	:	:	:	-
Snail-Dr	:	:	:	-
Snail-Tr	:	:	:	-
Snail-Xl	:	:	:	-
Snail-Gg	:	:	:	-
Snail-Mm	:	:	:	-
Snail-Hs	:	:	:	-
Snail2-Dr	:	:	:	-
Snail2-Tr	:	:	:	-
Snail2-Mm	:	:	:	-
Snail2-Hs	:	:	:	-
Snail3-Hs	:	:	:	-
Snail3-Mm	:	:	:	-
Snail-Ci	:	ITSSRSCGPDSDGEFPRQDDL	:	DLRDKASKNLQRSVELEFCPIKSKSVDHDN	:	100
Snail-Pc	:	:	:	-
Snail-Har	:	AGSSKYTDNNNRTSDSSLTT	:	SHDFGTSDDIADDLQPIDLSLKKQNDRI	:	99

	*	120	*	140	*	
Snail-Pd	:	..MPKSFLIKKHGATPVTP.....	:		:	17
Snail-Lv	:	..MPRSFLVKKNAKQAASGLKKLQHGIIATTA.....	:		:	29
Snail1-Pv	:	..MEKNPDPSEKEEVEYRLSSMEYIEIDVTDVTSVFDGKLMTQSDILR.	:		:	47
Snail2-Pv	:	..MPRAFLLIKKRDKSESETQIFNPRSDNPPAAADVEEDEETINVTDTDDT	:		:	48
Snail-Dm	:	QDQPQDLSLKRGRDEETQDYQQPEPKRDY.....	:		:	66
Snail-Bf	:	..MPRSFLIKKHLHHAAK....KPREDDS.....	:		:	23
Snail-Dr	:	..MPRSFLVKKYFTSKRPNY.....	:		:	18
Snail-Tr	:	..MPRSFLVKKYFAKQKPNY.....	:		:	18
Snail-Xl	:	..MPRSFLVKKHFSASKK.....	:		:	16
Snail-Gg	:	..MPRSFLVKKHFSASKK.....	:		:	16
Snail-Mm	:	..MPRSFLVRKPSDPRRK.....	:		:	16
Snail-Hs	:	..MPRSFLVRKPSDENRK.....	:		:	16
Snail2-Dr	:	..MPRSFLVKKYFTNKKPNY.....	:		:	18
Snail2-Tr	:	..MPRSFLVKKYFSNKKPCYRE.....	:		:	20
Snail2-Mm	:	..MPRSFLVKKHFNASKK.....	:		:	16
Snail2-Hs	:	..MPRSFLVKKHFNASKK.....	:		:	16
Snail3-Hs	:	..MPRSFLVKTHSSHRVP.....	:		:	16
Snail3-Mm	:	..MPRSFLVKTHSSHRVP.....	:		:	16
Snail-Ci	:	DLMPMDLSCCKRTSPKQNCKTASMPKTSPTIKSEPIDDYPASLTRNAPPS	:		:	150
Snail-Pc	:	..MPRSFLVKKKMHLEDECLRQEDRLADECP.....	:		:	29
Snail-Har	:	CNDNRTMQLPQRTNENYNDFLMQKMDSE PMLNFP I P S S M R G.....	:		:	140

	160	*	180	*	200	
Snail-Pd	:	CGIKRSDVMTSQEDQTS	:		34
Snail-Lv	:	YDPGVVSVASEPEMSVAAPI.....	:		49
Snail1-Pv	:	HAHLVDNSPRHTRF SHVNEVVVERS	:		72
Snail2-Pv	:	EMEVTESNLKSNEATLS PKVLVEEMP KP VVT PVPRLS	PIQQKRD MYLTGR	:		98
Snail-Dm	:	VLNLSKTPERNSSSSSS..	:		82
Snail-Bf	:	VIKPFPELATIEPG.....	:		37
Snail-Dr	:	SELECQNDTSPD..	:		30
Snail-Tr	:	SELECQNDTSQE..	:		30
Snail-Xl	:	PNYSELESQT.....	:		26
Snail-Gg	:	PNYSELESQT.....	:		26
Snail-Mm	:	PNYSELQDACVE.....	:		28
Snail-Hs	:	PNYSELQDSNPE.....	:		28
Snail2-Dr	:	SELESQTDRE.....	:		27
Snail2-Tr	:	CHLESQSAFVPE..	:		32
Snail2-Mm	:	PNYSELDTHT.....	:		26
Snail2-Hs	:	PNYSELDTHT.....	:		26
Snail3-Hs	:	NYRRLETQREINGACS	:		32
Snail3-Mm	:	NYGKLETREANGSCS	:		32
Snail-Ci	:	SMPSVSPP....SSNITREFPPSMFPSPWPFSTPIT	SSVGGFPSPSSYI	:		196
Snail-Pc	:	PPISASLAPVSTPLTEKQECES	:		50
Snail-Har	:	YSPWHHYMCASPLSFIPSSLENW	:		164

	*	220	*	240	*																																							
Snail-Pd	:	SRDHMATES	VMK	PSSQLPPCSPTLEMS	PI	SRQDEVHETGLPAAHSPGASS	: 84																																					
Snail-Lv	:NI	PHPV	IHKPEPLQAI	PN	PSAYWRHH.....QNVIYSPSS	: 84																																					
Snail1-Pv	:	N....MMED	MLK	TNKLTDQFVTL	SHET	PVSEKMNSQCGNTDQKEAPKSAV	: 118																																					
Snail2-Pv	:	SMEGIIKQT	IVK	PIPERPMI	PVSLHLP	PTPDCHRRRLSPHSPADLDRRTGS	: 148																																					
Snail-Dm	:NSCL	LS	PPVETQDYL	PTEI	HMR.....	: 104																																					
Snail-Bf	:LV	VPPP	..AVWP	VPLCYPPDAVMELGG	: 62																																					
Snail-Dr	:RY	PLAEL	PAVSND	FVTC	LT.....	: 50																																					
Snail-Tr	:SY	PF	AELPSADSS	.AAT	CLT.....	: 49																																					
Snail-Xl	:VY	IS	PF	IYD..	KFPVI	QPP.....EILSTG	: 49																																				
Snail-Gg	:VLA	AP	LLYET	CALSVI	PPP.....EVLGPG	: 51																																					
Snail-Mm	:FT	FQQ	PYDQAHL	LAAI	PPP.....EVLNPA	: 53																																					
Snail-Hs	:FT	FQQ	PYDQAHL	LAAI	PPP.....EILNPT	: 53																																					
Snail2-Dr	:RY	AV	V	PQCF	PLDDPLV	PKYP.....	: 47																																				
Snail2-Tr	:SL	PR	AEL	PAQNDSS	PLTCY	PN.....	: 53																																				
Snail2-Mm	:VI	I	SP	LYE	SYPI	PI	PKP.....EILTSG	: 51																																			
Snail2-Hs	:VI	I	SP	LYE	SY	SMP	VI	PQP.....EILSSG	: 51																																		
Snail3-Hs	:	ACGGLVVP	..LL	PR	DKE	APSV	PGD	L	PQ	PWDR.....	: 61																																	
Snail3-Mm	:	ACKELAGS	..RH	L	P	D	E	E	A	PCN	P	S	D	E	L	Q	P	W	D	S.....	: 61																							
Snail-Ci	:	AGKYLHPALF	L	PPP	AT	SC	Q	T	V	P	T	N	S	P	L	G	L	S	V	G	N	S	M	L	P	G	L	H	Q	L	A	A	S	H	F	Q	P	S	: 246					
Snail-Pc	:	EGTDNNSV	V	S	P	I	N	M	N	R	G	E	K	P	P	I	V	Y	S	V	P.....	: 79																						
Snail-Har	:	NPVSSIGEM	I	M	P	M	N	P	L	L	Y	G	L	P	M	G	E	V	S	S	A	S	V	A	K	P	S	Y	Y	E	T	S	Q	H	L	W	K	S	L	A	T	A	G	: 214

		260	*	280	*	300																																						
Snail-Pd	:	PHNAGAS	PV	Q	R	T	P	S	P	F	S	I	S	A	I	L	S	S	P	G	S	K	S	P	P	S	R	P	L	A	F	V	P	Q	P	F	Y	P	V	Y	A	P	F	: 134
Snail-Lv	:	PFEADTF	P	H	I	H	K	G	Y	S	P.....	PPP	F	S	Q	P	L	H	A	H	L	P	Q	P	S	L	H	H	L	L	T	P	: 123											
Snail1-Pv	:	KPIV	R	P	W	L	I	E	P	S	V.....	KGR	N	Q	T	P	K	T	V	E	T	P	T	T	V	K	A	R	I	E	T	: 153												
Snail2-Pv	:	LSPV	D	S	P	S	C	S	P	P	E.....	PAR	F	H	D	P	F	P	W	Q	P	L	I	S	N	L	H	S	H	P	: 183													
Snail-Dm	:GL	T	A	G	T	T	G	Y	T	T	A	T	P	: 118																													
Snail-Bf	:	LPPLP	..LS	PEP	PAR	: 75																																					
Snail-Dr	:	: -																																									
Snail-Tr	:	: -																																									
Snail-Xl	:	AY	Y	T	: 53																																					
Snail-Gg	:	AY	Y	P	: 55																																					
Snail-Mm	:	AS	L	P	: 57																																					
Snail-Hs	:	AS	L	P	: 57																																					
Snail2-Dr	:	: -																																									
Snail2-Tr	:	: -																																									
Snail2-Mm	:	AY	S	P	: 55																																					
Snail2-Hs	:	AY	S	P	: 55																																					
Snail3-Hs	:	SS	A	V	A	C	I	S	L	P	L	L	P	R	I	E	E	A	: 79																								
Snail3-Mm	:	T	S	A	V	A	C	I	S	L	P	L	L	P	N	H	R	E	T	: 79																							
Snail-Ci	:	MIKP	V	A	Q	P	Q	G	V	P	Q	E	Q	N	S	P.....	NH	D	D	Q	K	F	A	Q	G	S	P	Q	P	R	F	S	P	T	N	L	V	Q	D	P	S	L	: 291	
Snail-Pc	:	V	Y	Q	P	V	H	T	P	Q	Y	F	I	P	: 93																												
Snail-Har	:	RADAS	L	F	R	K	F	V	A	T	H	E	D	A	Y	A	P	KK	G	R	A	A	P	M	F	P	N	Q	E	L	Y	Q	V	W	N	Q	: 254						

	*	420	*	440	*	
Snail-Pd	:	PSHHHHHQCGSHHHHHQAAQVQCQEAMDYTVTTTTPIKKDTPKDFDPAVVV	:			269
Snail-Lv	:	GTATAAK.....	:		PEKEIK	181
Snail1-Pv	:	GMSEPO.....	:		NMNHWNQKLPDV	238
Snail2-Pv	:	LFDDRRMDLDF.....	:		SVKMAKAPFDNVLNYSVVTTERPVPELEL	289
Snail-Dm	:	PPSSPGSD.....	:		LETGSEPEDLSV	191
Snail-Bf	:	:		THHDKPMKKR	100
Snail-Dr	:	CSSS.....	:		GEEDEGR	99
Snail-Tr	:	SSASS.....	:		CGEEDEGR	100
Snail-Xl	:	GKTS.....	:		D	105
Snail-Gg	:	GKSS.....	:		G	102
Snail-Mm	:	GKSS.....	:		QPPS	104
Snail-Hs	:	GKGS.....	:		QPPS	104
Snail2-Dr	:	SSSS.....	:		GEEEDDCR	91
Snail2-Tr	:	SSSE.....	:		EEEDGGR	98
Snail2-Mm	:	GSESPISD.....	:		EEERLQ	115
Snail2-Hs	:	GSESPISD.....	:		EEERLQ	114
Snail3-Hs	:	:		WSPTLGPDRHGAPKLLGAERM	145
Snail3-Mm	:	:		WPPILGPD..GALNEHLRAEGT	140
Snail-Ci	:	SESPTGKKVCLDS.....	:		KTTWRQIDAPTFQISDAIEEQ	422
Snail-Pc	:	IVDKAYTR.....	:		VKKERVEEKSHNTFSENAE	175
Snail-Har	:	SDEHYGTSAKKIKMQASEDTNKELVHASASDNTDDSNQTNGTSKNIGNL	:			404

	460	*	480	*	500	
Snail-Pd	:	SEGPSNPAKGPFRNCEGCGKTYATFSGLSKH.....	:		KRFH.....CV	307
Snail-Lv	:	KRRSNKNGEDSTKYHCPDCGKEYSTFGGLSKH.....	:		RQLH.....CD	219
Snail1-Pv	:	SEPVQLNAHSPPRYQCEACQKSYSTFGGLSKH.....	:		RQFH.....CS	276
Snail2-Pv	:	TEKKKSKENEPIRYQCDCCKKSYSTFSGLSKH.....	:		KQFH.....CA	327
Snail-Dm	:	RNDIPLPALF.HLFDKAKSSSSGASVSSSSGYSYT..	:		PAMSASSASVAAN	238
Snail-Bf	:	TPSGGSGDQS..RYQCPQCAKSYSTYSGLTKH.....	:		KQFH.....CV	136
Snail-Dr	:	TSDPPSPDSS.DTYHPQQTSRPR.RSNKSR.....	:		AGQREDKSEAAVT	140
Snail-Tr	:	TSDPPSPPEPV.HTFAPRQRMKCTGVMARSS.....	:		PPEEEEREAPAT	142
Snail-Xl	:	PPSPASSATEAEKFCQCNLCCKSYSTFAGLSKH.....	:		KQLH.....CD	143
Snail-Gg	:	PPSPASAPAAAERFRCAQCAKAYSTFAGLSKH.....	:		KQLH.....CD	140
Snail-Mm	:	PPSPAPSSFSSTASASS.LEAEAFIAEPGLGQLP.....	:		KQLARLSVAKD	147
Snail-Hs	:	PPSPAPSSFSSTSVSS.LEAEAYAAEPGLGQVP.....	:		KQLAQLSEAKD	147
Snail2-Dr	:	TSDPPSPDPS.DRFQCAHCGKSCSSPACLRRHQLAHCS	:		PQDGISGRTSSS	140
Snail2-Tr	:	SSDPPSPDIIQHIIYHCLHCSNSYSSLSALSHHQLS.HFPQTQHTSSLPTE	:			147
Snail2-Mm	:	PKLSDPHAIEAEKFCQCNLCNKTYSTFSGLAKH.....	:		KQLH.....CD	153
Snail2-Hs	:	SKLSDPHAIEAEKFCQCNLCNKTYSTFSGLAKH.....	:		KQLH.....CD	152
Snail3-Hs	:	PRAPGG.....	:		FECFHCHKPYHTLAGLARH.....RQLH.....CH	176
Snail3-Mm	:	SRVPGS.....	:		FECIHCHRPYHTLAGLARH.....QQLH.....CH	171
Snail-Ci	:	NKAPQPVSFKPCRIPECTECGRTYATIGALAKH.....	:		AKTHE.....D	460
Snail-Pc	:	EKHNDENHNDENQNESIIIVKPSDFIDKSKEQ.....	:		INVPKKSQVPRK	219
Snail-Har	:	QMTPKPINFKPCRFFHCSECGRTYATVGGMLKHS.....	:		KYH.....HD	442

	*	520	*	540	*	
Snail-Pd	:	SEIKKEFSCKFCDKTYSS			: 325
Snail-Lv	:	AQNKKTFNCKYCDKEYMS			: 237
Snail1-Pv	:	QQVKKEFRCKYCDKSYSS			: 294
Snail2-Pv	:	SQIKKEFNCKYCDKTYVS			: 345
Snail-Dm	:	HAKNYRFKCDECKMYSTSMGLSKHRQFHCPAAEKNQEKKTHSCEECKGL			: 288
Snail-Bf	:	TQSKKAFNCKYCDKVYVS			: 154
Snail-Dr	:	AASRPAFFCKHCPKEYNS			: 158
Snail-Tr	:	AA.RPAFLCKHCPKEYTS			: 159
Snail-Xl	:	SQTRKSFCKYCEKEYVS			: 161
Snail-Gg	:	AQTRKSFCKYCEKEYVS			: 158
Snail-Mm	:	PQSRKIFNCKYCNKEYLS			: 165
Snail-Hs	:	LQARKAFNCKYCNKEYLS			: 165
Snail2-Dr	:	FAPGPPFHCKHCPKEYNS			: 158
Snail2-Tr	:	VSARPAFHCKHCPKEYTS			: 165
Snail2-Mm	:	AQSRKSFCKYCDKEYVS			: 171
Snail2-Hs	:	AQSRKSFCKYCDKEYVS			: 170
Snail3-Hs	:	LQVGRVFTCKYCDKEYTS			: 194
Snail3-Mm	:	LPTGRAFTCRYCDKEYAS			: 189
Snail-Ci	:	PESGSKFNCKICKKECSS			: 478
Snail-Pc	:	GKNSRHYSCKYCDKDYMS			: 237
Snail-Har	:	PENAMTFKCKTCEKEYTS			: 460

		560	*	580	*	600	
Snail-Pd	:	...LGALKMHIRTHTLPCCKPLCGKSF	SRPWLLQGH	LRTHHTG	EKPF	SCSH	: 372
Snail-Lv	:	...LGALKMHIRTHTLPCCKCF	CGKAF	SRPWLLQGH	IRTHHTG	EKPF	SCPH
Snail1-Pv	:	...LGALKMHIRTHTLPCCKCK	LCGKAF	SRPWLLQGH	IRTHHTG	EKPF	SCQH
Snail2-Pv	:	...LGALKMHIRTHTLPCCKCK	LCGKAF	SRPWLLQGH	IRTHHTG	EKPF	SCQH
Snail-Dm	:	YTTIGALKMHIRTHTLPCCKPI	CGKAF	SRPWLLQGH	IRTHHTG	EKPF	QCPD
Snail-Bf	:	...LGALKMHIRTHTLPCCKCK	ICGKAF	SRPWLLQGH	VRTHTG	EKPF	ACPH
Snail-Dr	:	...LGALKMHIRSHTLPCVCPT	CGKAF	SRPWLLR	GHIRTHHTG	ERPF	SCPH
Snail-Tr	:	...LGALKMHIRSHTLPCVCTT	CGKAF	SRPWLLR	GHIRTHHTG	ERPF	SCPH
Snail-Xl	:	...LGALKMHIRSHTLPCVCKI	CGKAF	SRPWLLQGH	IRTHHTG	EKPF	SCTH
Snail-Gg	:	...LGALKMHIRSHTLPCVCKM	CGKAF	SRPWLLQGH	IRTHHTG	EKPF	SCTH
Snail-Mm	:	...LGALKMHIRSHTLPCVCTT	CGKAF	SRPWLLQGH	VRTHTG	EKPF	SCSH
Snail-Hs	:	...LGALKMHIRSHTLPCVCGT	CGKAF	SRPWLLQGH	VRTHTG	EKPF	SCPH
Snail2-Dr	:	...LGALKMHIRSHTLPCVCST	CGKAF	SRPWLLR	GHIRTHHTG	ERPF	SCPH
Snail2-Tr	:	...LGALKMHIRSHTLPCVCPT	CGKAF	SRPWLLR	GHIRTHHTG	ERPF	ACQL
Snail2-Mm	:	...LGALKMHIRTHTLPCVCKI	CGKAF	SRPWLLQGH	IRTHHTG	EKPF	SCPH
Snail2-Hs	:	...LGALKMHIRTHTLPCVCKI	CGKAF	SRPWLLQGH	IRTHHTG	EKPF	SCPH
Snail3-Hs	:	...LGALKMHIRTHTLPCCTCKI	CGKAF	SRPWLLQGH	VRTHTG	EKPY	ACSH
Snail3-Mm	:	...LGALKMHIRTHTLPCICKV	CGKAF	SRPWLLQGH	IRTHHTG	EKPY	TCSH
Snail-Ci	:	...LGALRMHIRTHTLPCCECH	ICGKAF	SRTWLLQGH	IRTHHTG	EKPY	QCTV
Snail-Pc	:	...LGALKMHIRTHTLPCQCKI	CGKSF	SRPWLLQGH	IRTHHTG	ERPF	VCSY
Snail-Har	:	...LGALKMHIRTHTLPCCKCH	ICGKAF	SRTWLLQGH	IRTHHTG	EKPY	QCSV

	*	620	*	640	*																								
Snail-Pd	:	CSRA	FADRSN	LRAHLQ	THSEV	KKYSCK	KNCSK	.TF	SRM	FLL	KHE	DGG	CTE	:	421														
Snail-Lv	:	CQRA	FADRSN	LRAHLQ	THSEV	KKYSCK	KSCG	.TF	SRM	SLL	NKHE	ESG	CIS	:	333														
Snail1-Pv	:	CGRA	FADRSN	LRAHLQ	THAEI	KKYG	CKSC	.TF	SRM	SLL	NKHE	ESS	CMG	:	390														
Snail2-Pv	:	CGRA	FADRSN	LRAHLQ	THSDV	KKYS	CRSC	.TF	SRM	SLL	NKHE	DGC	CGT	:	441														
Snail-Dm	:	CPR	SEF	ADRSN	LRAHQ	QTHV	DVK	KYAC	QV	CHK	.SF	SRM	SLL	NK	HSS	NCTI	:	387											
Snail-Bf	:	CSRA	FADRSN	LRAHLQ	THSDI	KKYS	CKNC	.TF	SRM	SLL	NKHE	EAG	CCL	:	250														
Snail-Dr	:	CNRA	FADRSN	LRAHLQ	THADV	KKYS	QCST	.TF	SRM	SLL	NKHE	SA	AG	CCP	:	254													
Snail-Tr	:	CNRA	FADRSN	LRAHLQ	THAEV	KKYS	QCGI	.TF	SRM	SLL	NKHE	SS	G	CCS	:	255													
Snail-Xl	:	CNRA	FADRSN	LRAHLQ	THSDV	KKYS	QCKS	.TF	SRM	SLL	NKHE	ET	G	CTV	:	257													
Snail-Gg	:	CNRA	FADRSN	LRAHLQ	THSDV	KKYS	QCKT	.TF	SRM	SLL	NKHE	ET	G	CSG	:	254													
Snail-Mm	:	CNRA	F	AVRSN	LRAHLQ	THSDV	KKYS	QCQ	ACAR	.TF	SRM	SLL	NK	HQ	ESG	CSG	:	261											
Snail-Hs	:	CSRA	FADRSN	LRAHLQ	THSDV	KKYS	QCQ	ACAR	.TF	SRM	SLL	NK	HQ	ESG	CSG	:	261												
Snail2-Dr	:	CNRA	FADRSN	LRAHLQ	THSEV	KKYS	QCGS	CSR	RT	.TF	SRM	SLL	NK	H	K	T	L	S	G	CCP	:	255							
Snail2-Tr	:	CNRA	FADRSN	LRAHLQ	THSEV	KKYS	QCGS	CAR	.TF	SRM	SLL	NK	H	K	N	A	S	G	CCP	:	261								
Snail2-Mm	:	CNRA	FADRSN	LRAHLQ	THSDV	KKYS	QCKN	CSK	.TF	SRM	SLL	NK	H	K	H	E	S	G	CCV	:	267								
Snail2-Hs	:	CNRA	FADRSN	LRAHLQ	THSDV	KKYS	QCKN	CSK	.TF	SRM	SLL	NK	H	K	H	E	S	G	CCV	:	266								
Snail3-Hs	:	CSRA	FADRSN	LRAHLQ	THSDA	KKYS	RCRR	CTK	.TF	SRM	SLL	NK	H	E	S	G	CCP	:	290										
Snail3-Mm	:	CSRA	FADRSN	LRAHLQ	THVGT	KKYS	RC	AV	CPK	.AF	SRM	SLL	NK	H	E	E	A	G	CCP	:	285								
Snail-Ci	:	CSRA	FADRSN	LRAHM	QTH	ETV	KKYS	CVT	CEK	.TF	SRI	SLL	NK	R	H	Q	V	H	C	E	T	:	574						
Snail-Pc	:	CGRA	FADRSN	LRAHM	QTHV	DVK	KYE	CR	K	CMK	.SF	SRM	SLL	NK	H	E	F	D	C	T	:	333							
Snail-Har	:	CLRA	FADRSN	LRAHM	QTHQ	NV	KRY	A	C	T	G	C	E	K	.TF	SRT	SLL	NK	R	H	R	A	S	G	C	V	P	:	556

660

Snail-Pd	:	KQ	:	423
Snail-Lv	:	SGSD	:	337
Snail1-Pv	:	MVR	:	393
Snail2-Pv	:	VVH	:	444
Snail-Dm	:	TIA	:	390
Snail-Bf	:	PNH	:	253
Snail-Dr	:	STANVQ	:	260
Snail-Tr	:	AAV	:	258
Snail-Xl	:	AH	:	259
Snail-Gg	:	AR	:	256
Snail-Mm	:	GPR	:	264
Snail-Hs	:	CPR	:	264
Snail2-Dr	:	AL	:	257
Snail2-Tr	:	PS	:	263
Snail2-Mm	:	AH	:	269
Snail2-Hs	:	AH	:	268
Snail3-Hs	:	GP	:	292
Snail3-Mm	:	GP	:	287
Snail-Ci	:	SQVAQRKTAS		:	584
Snail-Pc	:	PFTEVPSV	..	:	341
Snail-Har	:		:	-

Abkürzungen: Bf *Branchiostoma floridae* Ci *Ciona intestinalis* Dm *Drosophila melanogaster*, Dr *Danio rerio*, Gg *Gallus gallus*, Ha *Helix aspersa*, Har *Halocynthia rorezi*, Hs *Homo sapiens*, Lv *Lytechinus variegatus*, Mm *Mus musculus*, Pd *Platynereis dumerilii*, Pc *Podocoryne carnea*, Pv *Patella vulgata*, Tr *Takifugu rubripes*, Xl *Xenopus laevis*

7.17 GenBank Accessionnumbers der Snail Homologen

Spezies	Accessionnumber
Snail-Lv	ABG56163
Snail1-Pv	AAL06240
Snail2-Pv	AAL12166
Snail-Dm	CAB62556
Snail-Xl	NP_001079925
Snail-Bf	AAC35351
Snail-Dr	CAA52795
Snail-Tr	CAB54535
Snail-Gg	NP_990473
Snail-Mm	AAH34857
Snail-Hs	NP_005976
Snail2-Dr	AAA87196
Snail2-Tr	CAB54536
Snail2-Mm	NP_035545
Snail2-Hs	NP_003059
Snail3-Mm	NP_038942
Snail3-Hs	AAI07059

8 Danksagung

An erster Stelle möchte ich Herrn Prof. Dr. Adriaan Dorresteyn für seine ständige Diskussionsbereitschaft und die freundschaftliche Betreuung meiner Arbeit danken. Seine konstruktive Kritik bei der Durchsicht dieses Manuskripts hat mir sehr dabei geholfen, das Wesentliche herauszuarbeiten und in schriftlicher Form zu präsentieren.

Bei Frau Prof. Dr. Renate Renkawitz-Pohl möchte ich mich für die kritische Durchsicht dieses Manuskripts und die Bereitschaft zur Übernahme der Begutachtung bedanken.

Bei Dr. Anne Holz möchte ich mich sowohl für die enorme Hilfe bei den Experimenten mit *Drosophila*, als auch für das immer offene Ohr bedanken. Ihre Tür stand immer für die Diskussion sowohl fachlicher, als auch sozialer Fragestellungen offen. Ebenfalls möchte ich ihr für die kritische Durchsicht meiner Arbeit danken.

Ferner gilt mein Dank den jetzigen und früheren Mitgliedern der Arbeitsgruppen Dorresteyn und Holz, im Speziellen Christian Melaun, Georg Wolfstetter, Björn Fuchs, Jan Sauer und Raphael Pajaziti. Die Arbeit mit Euch hat immer Spaß gemacht.

Dem technischen Personal möchte ich für die Betreuung der *Platynereis* Zucht und insbesondere Frau Brigitte Fronk für die Herstellung der Semidünnschnitte danken.

Feinmechanikermeister Jörg Schmandt möchte ich für seine exzellente Umsetzung und seine Verbesserungen meiner „Ideen für ein besseres Labor“ danken.

Insbesondere gilt mein Dank meinen Eltern und meinen Geschwistern Anne Katrin und Georg. Der „Heimaturlaub“ hat mir immer wieder geholfen die „Batterien neu aufzuladen“ und neue Ideen zu entwickeln. Katrin Domsch möchte ich für ihre Geduld und das Ertragen meiner Macken, wie auch ihre konstruktive Kritik und die kritische Durchsicht dieser Dissertation bedanken.

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere hiermit an Eides statt, dass ich die hier vorgelegte Dissertation zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades selbst und ohne unerlaubte Hilfe verfasst und mich dabei keiner anderen Hilfsmittel, als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen, bedient habe

Giessen, im November 2007

Dipl. Biol. Christoph Schaub