

**Morphologische und
molekularbiologische
Untersuchungen zur Segmentierung
bei *Platynereis dumerilii*
(Annelida, Polychaeta)**

Inaugural-Dissertation

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

am Fachbereich Biologie und Chemie
der Justus Liebig Universität Gießen

Vorgelegt von
Dipl. Biol. Raphael Pajaziti
geboren in Wiesbaden
Gießen, September

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 Dorresteijn
Zweite Gutachterin:	P.D. Dr. Bettina Westermann
Tag der mündlichen Prüfung: _____21.11.2008_____	

*Per aspera **ad** astra*

Seneca

1	Einleitung.....	1
1.1	Segmentierung im Tierreich.....	1
1.2	Bauplan und Systematik der Anneliden.....	3
1.2.1	Allgemeine Aspekte im Körperbau der Anneliden.....	3
1.2.2	Spezielle Betrachtung zu Polychaeten	5
1.3	Segmentregeneration bei Anneliden	7
1.4	Zielsetzung	9
2	Material und Methoden.....	11
2.1	Lebendmaterial.....	11
2.1.1	Tiermaterial	11
2.1.1.1	Haltung.....	11
2.1.1.2	Gewinnung der Regenerate.....	12
2.1.2	Bakterienkulturen für die Molekularbiologie	12
2.2	Verbrauchsmaterial und Geräte	12
2.2.1	Chemikalien	12
2.2.2	Puffer und Lösungen.....	15
2.2.3	Verwendete Primer für die Erforschung der <i>Wingless</i> Expression.....	19
2.2.4	Kits und Enzyme	19
2.2.5	Nähr- und Kulturmedien	20
2.2.6	Antikörper	20
2.2.7	Geräte	21
2.2.7.1	Falcon-Siebe	23
2.2.8	Verwendete Software.....	23
2.3	Histologische Methoden	23
2.3.1	Fixierungen	23
2.3.1.1	Fixierung für die Elektronenmikroskopie	24
2.3.1.2	Fixierung für die Immunhistochemie.....	24
2.3.1.3	Fixierung für die in situ Hybridisierung	25
2.3.2	Einbettungsverfahren	25
2.3.2.1	Araldit Einbettung.....	25
2.3.2.2	Paraffin Einbettung	27
2.3.3	Kontrastierung für die Transmissionselektronenmikroskopie	27

2.3.4	Behandlung für die Rasterelektronenmikroskopie.....	28
2.4	Immunhistochemie.....	28
2.4.1	Untersuchungen der Zellproliferation.....	28
2.4.1.1	BrdU-Inkorporation	29
2.4.1.2	Markierung mit anti-Phosphohiston3	30
2.4.2	Analyse von Aufbau und Entwicklung der Metanephridien.....	30
2.4.2.1	Markierung mit anti- α -Tubulin Antikörper	31
2.5	Molekularbiologische Methoden	31
2.5.1	Vektorkarte	32
2.5.2	Herstellung chemisch kompetenter Zellen.....	32
2.5.3	Transformation.....	33
2.5.4	Blau-Weiß Selektion.....	33
2.5.5	Plasmid-Präparation.....	34
2.5.6	Whole mount <i>in-situ</i> Hybridisierung (WMISH).....	34
2.5.6.1	Vorbereitung der Templates für die Sondensynthese	34
2.5.6.1.1	Linearisierung des Plasmids durch Restriktionsverdau	34
2.5.6.1.2	Alkoholische Fällung von Nukleinsäuren.....	34
2.5.6.1.3	Amplifikation mittels PCR	35
2.5.6.1.4	Aufreinigung von PCR Produkten aus Agarose Gelen.....	36
2.5.6.1.5	Sondensynthese	36
2.5.6.1.6	Dot-Blot-Analyse	37
2.5.6.2	Herstellung des präabsorbierten anti-Digoxigenin-Antikörper.....	37
2.5.6.3	WMISH-Protokoll für <i>Platynereis dumerilii</i>	38
2.6	Bildaufnahme und –analyse	39
2.6.1	Dreidimensionale Darstellung mit Amira	39
2.6.1.1	Aufnahme und Bearbeitung von Gewebeschnitten.....	39
2.6.1.2	Bearbeitung von optischen Schnitten aus dem KLSM	40
3	Ergebnisse	42
3.1	Morphologische Befunde zur Segmentbildung in postlarvalen Stadien und in Regeneraten.....	42
3.1.1	Entwicklung von postlarvalen Stadien.....	42
3.1.1.1	Bildung von Segmenten	42
3.1.1.2	Entwicklung der Oberflächenstruktur des Rumpfes	44
3.1.1.3	Organisation der inneren Organe	46

3.1.2	Entwicklungsprozesse in Regeneraten.....	51
3.1.2.1	Wundverschluss	51
3.1.2.2	Wachstums- und Differenzierungsprozesse.....	55
3.1.2.3	Nephridienentwicklung in Regeneraten.....	63
3.2	Befunde zur Zellproliferation in larvalen und postlarvalen Stadien sowie in Regeneraten nach caudaler Amputation	65
3.2.1	Zellproliferation in postlarvalen Stadien.....	65
3.2.1.1	Quantitative Beobachtungen an BrdU-markierten postlarvalen Wachstumsstadien.....	65
3.2.1.2	Proliferationsmuster der BrdU-markierten Zellen	66
3.2.1.3	Proliferationsanalyse mit Hilfe der Doppelmarkierung BrdU/ PH3	71
3.2.2	Zellproliferation während der Regeneration	71
3.2.2.1	Befunde zum Ursprung des Regenerates	71
3.2.2.2	Histologische Analysen der Regeneration mit Hilfe von BrdU- Markierungen	73
3.2.2.3	Proliferationsanalysen mit Anti-PH3	77
3.3	Lokalisierung der <i>pduwnt-1</i> Genexpression	79
3.3.1	Expressionen in larvalen und juvenilen Stadien	79
3.3.2	Expressionen von <i>pduwnt-1</i> in Regeneraten.....	82
4	Diskussion	89
4.1	Postlarvales Wachstum	89
4.1.1	Bildung von Oberflächenstrukturen.....	91
4.1.2	Organisation der inneren Organe	92
4.1.2.1	Muskulatur	92
4.1.2.2	Metanephridien	94
4.2	Regeneration	97
4.3	Proliferation in Postlarvalen- und Regenerationsstadien.....	102
4.3.1	Proliferation in postlarvalen Wachstum.....	102
4.3.2	Proliferation in Regeneraten	107
4.4	Untersuchungen zur <i>pduwnt-1</i> Expression	110
4.4.1	Segmentale Expression von <i>pduwnt-1</i> und <i>engrailed</i> in <i>Platynereis</i> <i>dumerilii</i>	110
4.4.2	Larvale Expressionsmuster von <i>Pduwnt-1</i> und <i>Pduen</i>	110
4.4.3	<i>Pduwnt-1/Pduen</i> Expressionsanalyse im Vergleich zu Arthropoden	111

4.4.4	<i>Engrailed</i> und <i>wnt-1</i> Expressionen in Anneliden	112
4.4.5	Nicht segmentale <i>pduwnt-1</i> Expression.....	113
4.5	Phylogenetische Diskussion der Segmententstehung	116
5	Zusammenfassung	119
6	Literatur	121
	Danksagung	134
	EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG	135

1 Einleitung

1.1 Segmentierung im Tierreich

Die Segmentierung, auch als Metamerie bezeichnet, wird dadurch definiert, dass in der Längsachse sich wiederholenden Grundeinheiten mit gleichem anatomischem Aufbau auftreten. Anneliden, Arthropoden und Chordaten sind wohl die artenreichsten Tierstämme, die in der Anatomie das Merkmal der Segmentierung aufweisen. Bei allen Arten dieser drei Stämme wird die segmentale Organisation während der Ontogenese durch eine strukturelle Reorganisation der Keimblätter entlang der künftigen Körperlängsachse erkennbar. Im Gegensatz zu Arthropoden und Anneliden ist die Segmentierung bei adulten Tieren vieler Chordatenklassen nicht auf den ersten Blick zu erkennen. Doch weisen auch diese eindeutige Segmentierungsmerkmale auf, z.B. Myomerie, Branchiomerie und Neuromerie, eine segmentale Anordnung bzw. Muskeln, Kiemenspalten und Nerven im Rumpfbereich.

Eine aktuelle Fragestellung im Zusammenhang der Segmentierung ist die des potenziell gemeinsamen phylogenetischen Ursprunges aller metameren Tiere. Sollte die metamere Körperorganisation bereits bei dem rezentesten gemeinsamen Vorfahr der heutzutage lebenden Formen existiert haben, dann ist auch anzunehmen, dass die basalen Mechanismen der Segmentbildung in der Entwicklung konserviert wurden. Alternativ könnte sich die Segmentierung mehrfach unabhängig voneinander entwickelt haben.

Am Ende des 18. Jahrhunderts sah Georges Cuvier in der Gemeinsamkeit des segmentalen Aufbaus bei Arthropoden und Anneliden noch ein primäres Argument für eine enge verwandtschaftliche Beziehung dieser Tierstämme und prägte hierzu ein eigenes Taxon, die "Articulata". Neuere molekularbiologische Untersuchungen, insbesondere der Vergleich von 18S-rRNA Sequenzen aber auch morphologische Untersuchungen stellen diese enge Verwandtschaft und das Taxon "Articulata" jedoch in Frage (Moore und Willmer, 1997; Aguinaldo et al., 1997; Giribet und Ribera, 1998; Eernisse et al., 1992; Adoutte et al., 1999). Nach diesen Autoren sind beide Stämme eher mit Stämmen nicht segmentierter Arten verwandt als untereinander. So gehören die Arthropoden nach Vorstellungen dieser Autoren zu den Ecdysozoa und stehen in einer engeren Verwandtschaft zu den nicht-segmentierten Nematoden. Die Anneliden werden der Gruppe der Lophotrochozoa zugeordnet und sind eng mit den nicht erkennbar

segmentierten Mollusken verwandt. Neuere vergleichende Genstudien, wie z.B. am Elongationsfaktor *1a*, dem Hox-Gen *abdominal B* und anderen Genen (Giribet, 2003) bestätigen das Taxon Ecdysozoa. Die Konsequenz für die Abstammung der Metamerie wäre bei dieser Aufteilung eindeutig: Der segmentierte Körperaufbau in Arthropoden und Anneliden wäre konvergent entstanden (Westheide und Rieger, 2007). Die Diskussion um eine Neuaufteilung der Protostomier ist aber keineswegs beendet. So wird zum einen die Annahme einer konvergenten Entwicklung der Segmentierung in Arthropoden und Anneliden bezweifelt (Scholtz, 2003), zum anderen gibt es einige Synapomorphien im Taxon Ecdysozoa, die durchaus fragwürdig sind. So ist die Cuticula in Arthropoden und Nematoden, beides Vertreter der Ecdysozoa, strukturell als auch funktionell unterschiedlich. Außerdem gibt es Häutungen der Cuticula auch bei einigen Vertretern der Lophotrochozoa, wie zum Beispiel bei einigen Polychaeten und Hirudineen (Westheide und Rieger, 2007).

Daneben besteht auch die Möglichkeit, dass Anneliden und Arthropoden trotz ihrer jeweiligen Nähe zu unsegmentierten Tierstämmen auf eine gemeinsame segmentierte Stammart zurückzuführen sind (Davis und Patel 1999, Shankland und Seaver 2000). Die Metamerie in unsegmentierten Taxa (wie z.B. Nematoda, Plathelminthes oder Mollusca) wäre dann aber mehrfach unabhängig wieder reduziert worden (Davis und Patel 1999).

Die Basis der Diskussion über die Ursprünge der Metamerie ist schmal und beruht auf der Grundlage von nur wenigen Modellsystemen, die für das jeweilige Taxon exemplarisch untersucht wurden. Zumeist sind solche Modellsysteme aufgrund ihrer Eignung für molekularbiologische Methoden ausgewählt worden, aber nicht auf der Basis ihrer phylogenetischen Stellung innerhalb der jeweiligen Gruppe. Ein gutes Beispiel hierfür ist *Drosophila melanogaster*, wo die Segmentierungsmechanismen in der Embryonalentwicklung schon länger bekannt und ausführlich beschrieben worden sind (Jackle et al., 1992; St Johnston und Nüsslein-Volhard, 1992). Zwar ist die Entwicklung von *Drosophila* ein gut untersuchtes Modellsystem, aber die Entwicklung der Dipteren ist stark abgeleitet und zeigt viele Apomorphien. So ist es nicht möglich, sämtliche Aspekte der Segmententstehung bei *Drosophila* auf die ursprünglichen Insekten oder anderen Arthropoden zu übertragen. Bei *Drosophila* werden Segmente im syncytialen Blastoderm spezifiziert. Gradienten von Transkriptionsfaktoren determinieren die Segmentgrenzen (Anderson und Nüsslein-Vollhard, 1984; Akam., 1987; Anderson 1989; Pankratz und Jäckle, 1993). Dabei werden zunächst anteriore und

posteriore Bereiche durch Maternalfaktoren determiniert und so auch die Expressionsorte der Lückengene festgelegt. Diese wiederum spezifizieren den Expressionsort der Paarregelgene, die dann Expressionsdomänen von Segmentpolaritätsgenen definieren. Segmentpolaritätsgene schließlich determinieren larvale Segmenteinheiten, die Parasegmente (Martinez-Arias und Lawrence, 1985).

Kurzkeiminsekten besitzen im Gegensatz zu *Drosophila* eine posteriore Wachstumszone. Hier werden die Segmente also nicht gleichzeitig angelegt, sondern entstehen sukzessiv. Ob die bei *Drosophila* geltende Hierarchie der Interaktion von Transkriptionsfaktoren bei der Spezifizierung von Segmenten auch bei Kurzkeiminsekten so auftritt, ist eher unwahrscheinlich (Tautz, 2004). Maternalfaktoren (wie z.B. *bicoid*) sind eher evolutionär spät entstanden und spielen bei Kurzkeiminsekten somit keine Rolle, Lücken- und Paarregelgene dagegen sind jedoch hoch konserviert (Tautz, 2004). Dabei scheinen Lückengene in Kurzkeiminsekten sogar direkt homöotische Gene (wie z.B. die Segmentpolaritätsgene) zu kontrollieren (Tautz und Sommer, 1995; Bucher und Klingler, 2004).

Der Aufbau von Parasegmenten und die Rolle der Segmentpolaritätsgene *wingless* und *engrailed* in der Spezifizierung der Segmentgrenzen ist dagegen wahrscheinlich ein ursprüngliches Merkmal in allen Arthropoden (Damen, 2002).

Weitere Untersuchungen an basalen Arthropoden, z.B. apteryogoten oder ametabolen pteryogoten Insekten, Chilopoden oder niederen Krebsen sind jedoch notwendig, um die phylogenetischen Fragen bezüglich der Metamerie in diesem Stamm sinnvoll zu beantworten. Außerdem sind vergleichende Studien, wie diese Doktorarbeit, die die Segmentierungsprozesse bei Lophotrochozoen untersucht und beschreibt dringend erforderlich.

1.2 Bauplan und Systematik der Anneliden

1.2.1 Allgemeine Aspekte im Körperbau der Anneliden

Der allgemeine Aufbau der Anneliden ist deutlich segmental. Dieser segmentale Aufbau äußert sich in einem gleichförmigen unterteilten Rumpf zwischen einem Vorderende, dem Prostomium und einem Körperhinterende, dem Pygidium. Dieser äußeren Segmentierung folgt die innere Organisation. Die einzelnen Segmente werden von Coelothel-umkleideten großen Coelomräumen ausgefüllt. Die linke und rechte Anlagen

dieses Cöloms bewirken die Entstehung der Mesenterien, und an der Segmentgrenze entwickeln sich die Dissepimente. Reste der primären Leibeshöhle in den Mesenterien und Dissepimenten bilden die Blutgefäße. Diese Kompartimentierung wird somit durch das geschlossene Blutgefäßsystem, welches aus einem kontraktilem Dorsal- und einem nicht kontraktilem Ventralhauptgefäß besteht, überwunden. Weitere Merkmale der inneren Segmentorganisation sind die Ganglien des Strickleiternnervensystems und das Exkretionssystem. Das Nervensystem besteht aus paarigen Oberschlundganglien, den Schlundkonnektiven, sowie ventral getrennten Nervenlängssträngen. Diese Nervenlängsstränge besitzen segmental angeordnete Ganglien, intersegmentale Kommissuren und die in die Peripherie projizierenden segmentalen Nerven. Das Exkretionssystem besteht aus Metanephridien: Wimperntrichter ragen in den Coelomraum eines unmittelbar anterior gelegenen Segmentes und führen über einen mehrfach gewundenen Kanal in den Nephridioporus, der sich in der Epidermis befindet. Dieser Aufbau gilt als ursprünglich (Westheide und Rieger, 2007). Andere Autoren dagegen schätzen diesen Aufbau als stark idealisiert und als phylogenetisch Irrelevant ein (Nielsen, 2001; Ruppert et al., 2003). Tatsächlich entsprechen viele Anneliden nicht diesem Aufbau, wie der folgende Abschnitt deutlich macht:

Die Anneliden werden in zwei systematischen Großgruppen unterteilt: Clitellaten und Polychaeten. In die Klasse der Clitellaten werden die parasitischen Hirudineen (z.B. *Hirudo medicinalis*) und die terrestrisch- oder limnisch-lebenden Oligochaeten, (z.B. *Lumbricus terrestris*), zusammengefasst. Die zweite Gruppe stellen die überwiegend marin lebenden Polychaeten dar. Es gibt jedoch große Unterschiede zwischen den Annelidengruppen. Die Clitellaten sind eine phylogenetisch hoch abgeleitete Gruppe, die im Zuge der Anpassung an das Süßwasser und an terrestrische Biotope für die Fortpflanzung ein Clitellum (eine durch zahlreiche Drüsen erhöhte Epidermisregion) entwickelt haben. Der Grund, warum gerade diese hoch abgeleiteten Tiere als Modelle für Annelidensegmentierung herangezogen werden, liegt sicherlich in der ausführlichen Beschreibung der Segmentbildungsmechanismen. Bei den Hirudineen leiten sich mesodermale als auch ektodermale Segmentstrukturen aus den so genannten Teloblasten. Durch wiederholte Teilungen aus diesen Teloblasten entstehen lange Bänder von kleinen Zellen, die untereinander verbunden sind. So bilden die Bänder der Teloblasten die so genannten Keimstreifen aus. Nach der Gastrulation liefern diese die Ventralplatte, aus der sofort simultan segmentale Strukturen hervorgehen (Irvine und Martindale, 1996). Dabei werden ektodermale und mesodermale Strukturen von

unterschiedlichen Teloblasten gebildet. Jeweils 4 Zellbänder jeder Seite vereinigen sich zum ektodermalen Keimstreif (EK). Aus den verbliebenen Keimstreifen, die nun unterhalb der EK liegen, entsteht die mesodermale Keimplatte (MK) (Fernandez und Stent, 1980). Alle 32 Segmente des Hirudineen Körpers entstehen simultan.

Die nächsten Verwandten der Egel sind die Oligochaeten (Willmer, 1990). Auch hier hat man schon sehr früh die Morphogenese untersucht und einige Gemeinsamkeiten mit den Hirudineen gefunden. Bei den Oligochaeten gibt es auch bilateral angeordnete Teloblasten, aus denen dann Keimplatten hervorgehen (Penners, 1924; Anderson, 1973; Devries, 1973). Doch die Frage nach gemeinsamen Entwicklungsmechanismen der Segmentierung von Hirudineen und Oligochaeten ist noch nicht abschließend beantwortet. Neuere Untersuchungen zeigen einige Differenzen auf. So gibt es Unterschiede in den Wechselwirkungen von der MK mit der EK. Egel brauchen diese Wechselwirkungen zur Ausbildung von mesodermalen und auch von ektodermalen Strukturen. Oligochaeten hingegen benötigen diese zur Ausbildung von segmentalen Strukturen nicht unbedingt. Untersuchungen am Oligochaeten *Tubifex* (Goto et al., 1999) zeigen die Ausbildung von mesodermalen Strukturen auch in Abwesenheit einer EK. Umgekehrt ist die Bildung von ektodermalen Strukturen von einer darunter liegenden mesodermalen Schicht abhängig (Nakamoto et al., 2000). Fundierte Erkenntnisse zur Segmententstehung sind bei Polychaeten nur bei wenigen Arten vorhanden. Im nachfolgenden Abschnitt sollen die wichtigsten dieser Erkenntnisse besprochen werden.

1.2.2 Spezielle Betrachtung zu Polychaeten

Die Polychaeten sind eine breit gefächerte Gruppe mit zum Teil erheblichen morphologischen Unterschieden, so dass bisher noch nicht einmal eine eindeutige Klassifizierung stattgefunden hat. Die phylogenetischen Beziehungen zwischen den einzelnen Polychaetengruppen sind Gegenstand einer anhaltenden Diskussion der Systematiker (Rouse und Fauchald, 1995; 1997; Westheide, 1997; Bartolomaeus et al., 2005). Die einzige gemeinsame Konstante aller Polychaeten ist das Fehlen eines Clitellums. Da die Unterschiede zwischen den Polychaetengruppen so groß sind, wird derzeit diskutiert, die Unterteilung in Polychaeta und Clitellata aufzugeben und beide Gruppen in einem gemeinsamen Paraphylum zusammenzufassen (Westheide und Rieger 2007).

Es gibt eine Reihe von Polychaetengruppen, die dem im Kapitel 1.2.1 beschriebenen als ursprünglich geltenden Annelidenaufbau entsprechen, wie z.B. die Nereiden. Das schon seit vielen Jahrzehnten bekannte Modellsystem dieser Gruppe ist *Platynereis dumerilii*. Bei postlarvalen Stadien von *Platynereis dumerilii* ist eine äußerliche Segmentierung gut zu erkennen (Hauenschild und Fischer 1969; Dorresteijs 1990). Bei der Trochophora-Larve ist diese Segmentierung jedoch nur andeutungsweise sichtbar. Sie besitzt eine Episphäre und Hyposphäre, die räumlich von einem Wimpernkranz (Prototroch) getrennt werden. Die Hyposphäre der Trochophoralarve verlängert sich longitudinal und bildet zwischen der Kopfanlage (Episphäre) und der Anlage des Pygidiums erste Segmente (Deutomere). Diese haben ihren Ursprung in der Ventralplatte (Dorresteijs, 1990). Mit dem Nectochaeta-Stadium, in dem das Tier dann drei vollständig ausgebildete Segmente besitzt, endet die Larvalphase.

Der heranwachsende Wurm ist bei *Platynereis* mit Ausnahme des Kopfes und des Pygidiums weitgehend homonom segmentiert. Der gesamte Rumpf wird von einem wenig gegliederten Darm (Schlund, Mitteldarm und Enddarm) sowie von einem unvollständig segmental getrennten Coelom durchzogen. Die Segmentierung des Rumpfes ist äußerlich durch die Parapodien erkennbar. Parapodien sind bewegliche Extremitäten im Bereich der seitlichen Körperwand, die neben der Lokomotion auch respiratorische Aufgaben übernehmen. Außerdem enthalten sie Spinndrüsen, die das Material für die Gespinsthöhle, in der die Tiere leben, produzieren. Das Pygidium schließt den Rumpf posterior ab. Es enthält den After und zwei caudale Tastanhänge, die Analzirren (Hauenschild und Fischer, 1969).

Die für das Wachstum notwendige Neubildung von Segmenten erfolgt erst postlarval. Die Zellen der neuen Segmente entstehen aus der unmittelbar vor dem Pygidium sitzenden Proliferationszone (Hauenschild und Fischer, 1969). Die Mechanismen der Segmententstehung sind im Gegensatz zu Clitellaten bisher noch nicht gut verstanden. Es wird zwar von einer teloblastischen Segmentsprossung gesprochen, jedoch konnten Teloblasten bisher noch nicht nachgewiesen werden.

Wie die Proliferationszone neue Segmente bildet, war der Gegenstand einiger Staatsexamens- und Diplomarbeiten (Tachezy, 1999; Pajaziti, 2001; Janaitis, 2002). Sie dokumentierten die Zellteilungsaktivität und Morphogenese während der Segmentbildung, konnten jedoch keine abschließende Antwort auf die Frage nach Ursprung des segmentalen Materials und genauen Segmentbildungsmechanismen liefern.

1.3 Segmentregeneration bei Anneliden

Möglichkeiten zur Erforschung der Segmentierung gibt es nicht nur in der Normalentwicklung, sondern auch während der Regeneration von Segmenten.

Sowohl bei Clitellaten als auch bei Polychaeten gibt es eine große Anzahl an regenerierenden Spezies (Gates, 1950; Herlant-Meewis, 1964; Hoffmann, 1966; Boilly, 1968; Clark, 1968; Hill, 1970). Innerhalb der Clitellaten sind nur Oligochaeten (in der Gruppe der Lumbricidae (Gates, 1950; Chapron, 1970; Gras, 1984)) in der Lage, ganze Segmente zu ersetzen. Hirudineen hingegen können nur kleine Wunden reparieren (LeGore und Sparks, 1973), jedoch keine Segmente regenerieren. Im nachfolgenden Abschnitt sollen die Prozesse der Regeneration nach Amputation caudaler Segmente analysiert werden:

Nach der Verletzung oder Amputation zeigen regenerierende Anneliden die Wundheilung. Danach wird ein so genanntes Regenerationsblastem aufgebaut, aus dem schließlich ein neues Pygidium mit einer Proliferationszone erwächst (Hofmann, 1966). Hier entsteht die Frage nach dem Ursprung der Zellen im Regenerationsblastem. Langhammer (1908) hat bei Syllidae den ektodermalen Ursprung von allen Blastemzellen postuliert. Okada (1929) hingegen glaubte an separate Ekto- und mesodermale Vorläuferzellen (Stammzellen) die in das Wundareal einwandern würden. Die Frage der potentiellen Existenz von Neoblasten (=Stammzellen) in *Nereis diversicolor* wurde von Nussbaum (1908) untersucht, blieb aber unbeantwortet. Jahrzehnte später aber dennoch von Stephan-Dubois (1958) als Ursprung des Regenerationsblastems postuliert. Stephan-Dubois (1958) sah Coelomocyten als Neoblasten an. Morphologische Untersuchungen an *Nephtys* und *Platynereis* (Clark und Clark, 1962; Clark, 1968; Hofmann, 1966) sahen in Coelomocyten allerdings keine totipotenten Stammzellen.

Insgesamt ist also auch die Regeneration von Segmenten bei Anneliden weit von einem schlüssigen Modell entfernt. Daher sollen in der vorliegenden Arbeit die Regenerationsprozesse in *Platynereis*, die von Hofmann (1966) beschrieben worden sind, aktualisiert und ergänzt werden. Neuere Untersuchungen an *Dorvillea bermudensis* (Paulus und Muller, 2006) haben gezeigt, dass weitgehende Regenerationsfähigkeiten und asexuelle Reproduktion eng gekoppelt sind. Da es bei Polychaeten allerdings eine Reihe von Spezies gibt, die regenerieren, aber keine

Fähigkeit zur asexuellen Reproduktion besitzen, können beide Mechanismen der Regeneration (in Tieren mit geschlechtlicher und Tieren mit ungeschlechtlicher Fortpflanzung) verglichen werden. Einer dieser Polychaeten Gruppen mit geschlechtlicher Fortpflanzung und der Fähigkeit zur Regeneration sind die Nereiden.

1.4 Zielsetzung

Wie bereits in Kapitel 1.2.2 beschrieben, ist *Platynereis dumerilii* ein Vertreter dieser Gruppe. Neuere molekulare Studien konnten *Platynereis* als ein ursprüngliches Modell in der Entwicklung von Bilateriern etablieren (Arendt et al, 2001; 2002; Prud'home et al, 2003; Raible et al, 2005; Kerner et al, 2006; Kulakova et al, 2007). Diesen molekularen Studien stehen Jahrzehnte alte morphologische Daten gegenüber. Um diese neuen Daten besser interpretieren zu können, müssen die morphologischen Studien der Normalentwicklung und der Regeneration mit aktuellen Methoden erweitert werden.

Ziel dieser Arbeit war es, die Prozesse der Segmentierung in der Normalentwicklung und während der Regeneration bei *Platynereis dumerilii* zunächst sorgfältig zu beschreiben. Rasterelektronen-, transmissionselektronen- und lichtmikroskopische Aufnahmen von Gewebeschnitten und Totalpräparaten wurden für die Beschreibung eines werdenden Segmentes und der verschiedenen Regenerationsstadien gemacht. Die daraus resultierende detaillierte anatomische Beschreibung diente als Basis für weitergehende Analysen von Segmentbildungsmechanismen mit molekularen Ansätzen. Die initialen Zellmaterialien postlarvaler Segmente (Tritomere) entstehen in der so genannten Proliferationszone (PZ). Diese hier neu gebildeten Zellen teilen sich in rascher Folge weiter und differenzieren anschließend in der Wachstumszone aus. Um postlarvale Segmentbildungsmechanismen zu verstehen muss daher, neben den bereits erfolgten morphologischen Beschreibungen, die Zellproliferation in der PZ und in der Wachstumszone genau studiert werden. Für diesen Zweck sollen zwei verschiedene Proliferationsmarker verwendet werden.

Ein hier verwendeter Marker für Proliferation ist das Thymidin Analogon Bromdesoxyuridin (BrdU). Während der S-Phase des Zellzyklus wird BrdU statt Thymidin¹ in die neu synthetisierte DNA eingebaut und im Zuge der Mitose auf die Tochterzelle übertragen. Der Nachweis von BrdU erfolgt über einen Antikörper (Gratzner 1982). Die Inkubation mit BrdU über einen begrenzten Zeitraum wird als Pulse Phase, während die Zeit nach dem Pulse (bis zur Fixierung des Tieres) als Chase Phase bezeichnet wird. Durch Pulse-Chase Experimente können Teilungsaktivität und -polarität von BrdU markierten Zellen über einen begrenzten Zeitraum analysiert werden.

¹ Obwohl Thymidin normalerweise von der Thymidilatsynthese gebildet wird, verhindert Fluordesoxyuridin (FdU), dass zeitgleich mit BrdU angeboten wird, diese Enzymaktivität.

Als zweiter Proliferationsmarker wird der Antikörper gegen Phosphohiston3 (PH3) verwendet. Während der Mitose wird im Zellkern u.a. Histon3 phosphoryliert. Mit anti-PH3 können jene Zellen detektiert werden, die sich zum Zeitpunkt der Fixierung in Mitose befanden. Im Unterschied zur BrdU Markierung, wo die Zellen der S-Phase detektiert werden lassen sich mit antiPH3 teilende Zellen zum Zeitpunkt der Mitose detektieren.

Die anatomischen Beschreibungen und die zellulären Studien sollen durch molekulare Studien zur Segmententstehung ergänzt werden.

Im Zuge des postlarvalen Wachstums entstehen aus den in der PZ entstandenen Zellen neue Segmente. Dabei ist unbekannt welche Mechanismen hinter der Grenzziehung der einzelnen Segmente stehen. In *Drosophila* ist der molekulare Hintergrund der Segmentierung gut erforscht (Kapitel 1.1).

Das *wnt-1* Ortholog in *Drosophila*, *wingless*, gehört zu den Segmentpolaritätsgenen. Zusammen mit dem Segmentpolaritätsgen *engrailed* sind beide Gene für die Bildung von Parasegmentgrenzen in *Drosophila* verantwortlich und erzeugen eine wechselseitige Rückkopplung (Martinez Arias et al, 1988). Andere *wnt* *Drosophila* Orthologe spielen in der Segmentierung keine Rolle. In Kapitel 1.1 wurde beschrieben, dass der Aufbau von Parasegmenten in vielen Arthropoden homolog zum *Drosophila* Segmentaufbau ist. Dabei spielen jeweilige *wnt-1* Orthologe eine wichtige Rolle. Darüber hinaus sind *wnt* Gene bei vielen verschiedenen Tierstämmen anzutreffen (Miller, 2002). So sind *wnt* Gene für Arthropoden, Nematoden und Cnidarier beschrieben worden. Damit sind *wnt-1* Ortholge gute Kandidaten für die Untersuchung von Segmentbildungsmechanismen in anderen segmentierten Tieren. Aus diesem Grund wurde in Kooperation mit G. Balavoine (Prud'homme et al, 2003) ein *Platynereis* *wingless* Ortholog geklont und in der vorliegenden Arbeit das Expressionsmuster von *pduwnt1* in larvalen, postlarvalen und Regenerationsstadien analysiert.

Zusammen mit den morphologischen und zellbiologischen Ergebnissen sollen diese Expressionsstudien die Segmentbildungsmechanismen in *Platynereis dumerilii* beschreiben und damit auch einen Beitrag zur phylogenetischen Diskussion der Segmentierung liefern

2 Material und Methoden

2.1 Lebendmaterial

2.1.1 Tiermaterial

Als Untersuchungsobjekt dienten larvale Entwicklungsstadien, sowie postlarvale und subadulte Wachstumsstadien des marinen Polychaeten *Platynereis dumerilii* (Annelida).

2.1.1.1 Haltung

Das Untersuchungsobjekt stammt aus der Laboraufzucht der Arbeitsgruppe Dorresteijs. Die Zucht wurde Anfang der 60er Jahre von Hauenschild und Fischer etabliert und dreimal genetisch aufgefrischt. Teile dieser Zucht wurden als Grundlage für die Laboraufzucht in Gießen verwendet. Die Tiere werden in Seewasser bei einer Temperatur von 18°C in belüfteten Polystyrol-Boxen und unter Langtagbedingungen (16 h Hell/8 h Dunkel) mit künstlichen Mondzyklen gehalten, d.h. alle vier Wochen wird eine Mondphase von einer Woche simuliert.

In den darauf folgenden zwei Wochen verlassen die geschlechtsreifen Tiere die Wohnröhren in den Schalen und können erkannt und abgesammelt werden. Nach Geschlechtern getrennt werden diese in Glasschalen mit Belüftung aufbewahrt und später in natürlichem Seewasser (NSW) einzeln verpaart. Die freigesetzten Gameten werden vermischt und die Eizellen darin besamt. Nach 24 h werden die Trochophora-Larven abgesammelt und in unbelüfteten Hälterungsschalen ebenfalls in NSW gehalten und mit einer *Oxyrrhis*-Algensuspension gefüttert. Nach einigen Wochen werden die Tiere in die belüfteten Schalen umgesetzt und ab dann mit einer Mischung aus Trockenfutter und Spinat gefüttert.

Die Geschlechtsreife tritt in einem Alter zwischen 3-20 Monaten auf. Da alle vier Wochen neue Zuchten angesetzt werden, stehen Tiere fast aller Altersgruppen permanent zur Verfügung. Weitere Details zur Aufzucht siehe Hauenschild und Fischer (1969).

Für meine Untersuchungen der Segmentierungsvorgänge wurden larvale Entwicklungsstadien von 24 h- 60 h und Wachstumsstadien von drei bis 50 Segmenten selektiert.

2.1.1.2 Gewinnung der Regenerate

Im Gegensatz zur Entwicklung, die fast synchron verläuft, ist das postlarvale Wachstum von *Platynereis dumerilii* individuell unterschiedlich. In der gleichen Haltungsbox können gleichaltrige Tiere mit unterschiedlichen Segmentanzahlen auftreten. Daher wurden nur Tiere mit der jeweils gleichen Segmentanzahl in einer separaten Schale gesammelt. Danach erfolgte die Betäubung mit einer 7,5% MgCl_2 -Lösung (1:1 gemischt mit Seewasser). Je nach Versuchsansatz wurde das caudale Ende mit einem Skalpell nach dem fünften, zehnten, 15. und dem 20. Segment entfernt. Es folgten drei Waschschrte mit natürlichem Seewasser, um die Betäubungslösung wieder zu entfernen. Da die Tiere oft Opfer gegenseitiger Attacken waren, wurden sie nach der Amputation einzeln gehalten und mit Nahrung versorgt.

2.1.2 Bakterienkulturen für die Molekularbiologie

Der Bakterien Stamm XL1-Blue MRF' von Stratagene (mit einer Tetracylin Resistenz) wurde für die Herstellung von kompetenten Zellen und der anschließenden Transformation verwendet.

2.2 Verbrauchsmaterial und Geräte

2.2.1 Chemikalien

Produkt	Hersteller
• 3,3'-Diaminobenzidin Tetrahydrochlorid	Sigma D 5905
• 4-Nitroblautetrazoliumsalz (NBT)	Roche 1087479
• 5-Brom-4-Chlor-3- Indolylphosphat (BCIP)	Roche 1585002
• 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D- galactopyranosid (X-Gal)	Sigma 16664
• Agarose	Roth 2267,4
• Araldit-Kunstharz,	CY 212 (SERVA)
• Bakto-Agar	Life Technologies

• Beschleuniger (für Araldit)	Dy 961 (SERVA)
• Blocking Reagent	Roche, 1096176
• Borax ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$)	Merck A47 2008
• DABCO	1,4-Diazabicyclo-2,2,2-Octan Fluka, 33480/9
• Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma Aldrich, D5758
• Dimethylformamid	Serva 20270
• Dimethylpyrocarbonat (DMPC)	Sigma Aldrich, D5520
• di-Natriumhydrogenphosphat dihydrat	Roth 1T879
• EDTA	Serva 11278
• EGTA	Sigma E-4378
• Eisessig	Sigma-Aldrich A9967
• Formamid,	Fluka, ultra pure 47671
• Formamid Deionisiert	Roth P046,1
• Glutardialdehyd	Sigma-Aldrich Taufkirchen G5882
• Glycerin	Roth 3783.1
• Glycin	Roth 3908,2
• Härter der Araldikomponenten	HY 964 (SERVA)
• Hefe-Extrakt	Life Technologies
• Heparin	ICN Biochemicals, 101931
• Isopropyl-β-D- thiogalactopyranosid (IPTG)	Sigma I6758
• Kaliumchlorid	Roth 67810
• Kalium-dihydrogenphosphat- anhydrid	Roth P744,1
• Kaliumdihydrogenphosphat	Roth 39640
• Magnesiumchlorid	Roth 3532,1
• Maleinsäure	Sigma 0375
• Methylenblau	Sigma 66721-25G
• MgSO₄	Merck 146686
• NaCl	Roth 9265,1

• NaOH	Roth P031,2
• Natriumhydrogencarbonat	Merck 7446402
• Natriumhydrogenphosphat	Merck 7446402
• Natrium-Laurylsarcosin	Fluca 61743
• Osmiumtetroxid	Next Chimica, South Africa, OS 003
• Paraformaldehyd	Sigma 16005
• Pepton	Merck 30342-021
• PIPES	Piperazin-N,N`-bis-(2-ethan)sulfonsäure Sigma P-6757
• Proteinase K	Sigma P-2308
• SDS	Roth 2326.1
• Tris-HCl	Roth 9090.1
• Triton X-100	Roth 30512
• Tween20	Serva

2.2.2 Puffer und Lösungen

Produkt	Herstellung
• Standard-Hybridisierungspuffer + 50% Formamid	50% 5x SSC, 50% Formamid , 0,1% Natrium-Laurylsarcosin (w/v), 0,02% SDS (w/v), 2% Blocking Reagent (Roche, Best.Nr. 1096176)
• 0,2 M Phosphatpuffer nach Sorensen	Stammlösung A: 2,72 g Kalium-dihydrogenphosphatanhydrid in 100 ml Aqua dest. lösen. Stammlösung B: 3,56 g di-Natriumhydrogenphosphatdihydrat in 100 ml Aqua dest. lösen. Stammlösung B mit Hilfe von Stammlösung A auf einen pH Wert von 7,4 einstellen.
• 0,5x Stringenzwaschpuffer	0,5x SSC-Puffer, 0,1% SDS
• 10x PCR- Puffer	100 mM Tris-HCl pH 8,4, 500 mM KCl, 15 mM MgCl ₂
• 20x SSC Puffer	175,3 g NaCl, 188,2 g Natriumcitrat, 800 ml Aqua dest. mit NaOH auf pH 7,0, dann auf 1 l auffüllen
• 2x PTW	2x PBS (pH 7.5), 0,1% (v/v) Tween 20, Lösung mit 0,2 µm Nitrocellulose-Filter steril filtrieren
• 2x Stringenzwaschpuffer	2x SSC, 0,1% SDS
• 50x TAE-Puffer	242 g TRIS Base, 57,1 g Eisessig, 100 ml 0,5 M EDTA pH 8,0
• Araldit	26 g Araldit-Kunstharz, 24 g Härter ,1 g Beschleuniger. Der Araldit Kunstharz wird in einem Plastikgefäß mit dem Härter versetzt und dann mit einem Glasstab so lange verrührt, bis keine Schlieren mehr

zu sehen sind und eine gelbbraune Färbung auftritt. Anschließend wird der Beschleuniger dazugegeben und etwa 10 Minuten lang untergerührt.

- **BCIP/NBT**

0,75 g NBT in 10 ml 70% Dimethylformamid lösen, 0,5 g BCIP in 10 ml 100% Dimethylformamid lösen. Aliquots (100µl) bei -20°C lagern.
pro ml Färbelösung 3,5 µl BCIP und 4,5 µl NBT / ml Detektionspuffer zufügen.
- **Blocking Reagent Stammlösung**

10% (w/v) Blocking Reagent in Maleinsäure-Puffer
- **DABCO-Glycerin**

1 Teil DABCO 25 mg/ml PBT; 9 Teile Glycerin.
- **DAB-Lösung:**

3,3'-Diaminobenzidin Tetrahydrochlorid in 20 ml Sörensen-Phosphatpuffer (pH7,2) gelöst, Aliquots bei -20°C gelagert.
- **Detektionspuffer:**

100 mM Tris, 100 mM NaCl, 50 mM MgCl₂, 0,1% Tween 20 (optional 5mM Levamisol) pH 9,5
- **Glutardialdehyd-Fixans (Fixierlösung 1):**

9 ml 0,2 M Phosphat Puffer (pH 7,4), 82 mg NaCl,
1 ml Glutardialdehyd-Ampulle (25%)
9 ml Phosphatpuffer werden mit 82 mg NaCl versetzt und bei 4° C gelagert. Kurz vor Gebrauch wird 1ml Glutardialdehyd dazugegeben.
- **Heparin-Stammlösung:**

50 mg/ml Heparin in Reinstwasser
- **In situ Hybridisierungs-Puffer**

50% Formamid (Fluka, ultra pure, Best.Nr. 47671), 50% 5 x SSC, 50 µg/ml Heparin, 0,1% Tween20, 5 mg/ml

- Torula RNA, (zum Schluss dazugeben ca. 10 - 20 Minuten im Wasserbad bei 65°C erwärmen und dann möglichst waagrecht das Falcon Tube schütteln, um die Torula-RNA in Lösung zu bringen)
- **Magnesiumchloridlösung zur Betäubung von *Platynereis*** 7,5 g Magnesiumchlorid wird in 100 ml Aqua dest gelöst und 1:1 mit natürlichem Seewasser gemischt
- **Maleinsäure-Puffer** 0,1 M Maleinsäure, 0,15M NaCl (pH=7,5)
- **Methylenblau-Farbstofflösung** 10 mg Methylenblau in 0,85% NaCl-Lösung suspendieren und filtrieren.
- **Natriumhydrogencarbonat-Puffer** 2,5 g Natriumhydrogencarbonat in 100 ml Aqua dest., mit 1 N HCl auf einen pH-Wert von 7,5 einstellen
- **Osmiumtetroxid-Fixans (Fixierlösung 2)** 6,25 ml 4% Osmiumtetroxid, 6,25 ml 2,5% Natriumhydrogencarbonat-Puffer (pH 7,5)
- **Osmiumtetroxid-Lösung:** 250 mg Osmiumtetroxid-Kristalle in Glasampulle. Die Glasampulle wird äußerlich gereinigt, mit einem Diamantstift angeritzt und gebrochen. Der Inhalt der Ampulle wurde mit 6,25 ml Aqua dest. versetzt und bei Raumtemperatur bis zur vollständigen Lösung (ca. 2 Tage) stehen gelassen.
- **PBS** 137 mM Natriumchlorid (NaCl), 2,7 mM Kaliumchlorid (KCl), 8,0 mM di-Natriumhydrogenphosphat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), 1,5 mM Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4 .

- 1H₂O), mit NaOH auf pH 7.4 bringen und auf 1 Liter auffüllen
- **PBT** 500 ml PBS, 1,5 ml Triton X-100
- **PEM-FA** 9 Teile PEM (0,1 M PIPES, 2 mM EGTA, 1 mM MgSO₄·7H₂O, mit NaOH auf pH 6,95 bringen), 1 Teil Formaldehyd 37%.
- **PFA (16%)** 16 g Paraformaldehyd werden in 100 ml PBS gegeben und unter Rühren bis zu 75°C erwärmt. 1N NaOH-Lösung tropfenweise solange zusetzen, bis die Lösung klar wird und einen PH von 7,5 hat. Die Lösung wird bei 4°C aufbewahrt.
- **Proteinase K-Stammlösung** 20 mg Proteinase K pro ml PTW.
Lösung kann bei -20°C gelagert werden.
Bei Antikörpermarkierung wird diese Stammlösung für die Permeabilisierung der Cuticula mit NSW (1:200) verdünnt (Endkonzentration 100µg/ml). Für die *in situ* Hybridisierung wird die Stammlösung mit PTW (1:200) verdünnt (Endkonzentration 100 µg/ml).
- **PTW** PBS+ 0,1% (v/v) TweenTM-20 steril filtrieren (0,2 mm Nitrocellulose)
- **RNAse freies Wasser** Reinstwasser (MilliQ) wird über Nacht mit 0,1% (v/v) DMPC, oder DEPC behandelt und nachfolgend 20 min bei 120°C autoklaviert.
- **Sörensen-Phosphatpuffer** Stammlösung A:
1,38 g Kalium-dihydrogenphosphat monohydrat (KH₂PO₄·1H₂O) lösen in 100 ml Aqua dest.

Stammlösung B:
1,78 g di-Natriumhydrogenphosphat

- | | |
|---|---|
| | dihydrat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) lösen in 100 ml Aqua dest. Stammlösung |
| • TAE- Puffer | B mit Stammlösung A auf den gewünschten pH einstellen
40 mM Tris-Acetat, 1 mM EDTA, |
| • Uranylacetat-Lösung | Eine Spatelspitze Uranylacetat wird in 10 ml 70% Methanol p.A. gelöst, so dass eine gesättigte Lösung entstand. |
| • Waschlösung der EM – Fixierung | 1,75 g NaCl in 100 ml 0,2 M Phosphat-Puffer (PH 7,4) |
| • Waschpuffer | 0,3% (w/v) Tween20 in Maleinsäure-Puffer |

2.2.3 Verwendete Primer für die Erforschung der *Wingless* Expression

M13 FW: 5'- CGC CAG GGT TTT CCC AGT CAC GAC-3'

M13 RW: 5'-CAC ACA GGA AAC AGC TAT GAC C-3'

2.2.4 Kits und Enzyme

Kit	Hersteller
• E.Z.N.A. Plasmid Miniprep Kit II	Peqlab, Bestell Nr.12-6945-00
• E.Z.N.A. Gel Extraction Kit	Peqlab , Bestell Nr. 12-2501-01
• DIG RNA Labeling (SP6/T7)	Roche, Bestell Nr. 11 75 025
• RNAeasy Protect Mini Kit	Qiagen. 74124
• Restriktionsenzym (Eco R V)	MBI 13U0732
• Restriktionsenzym (Hind III)	MBI 2111931
• Taq-Polymerase	New England Biolabs, M0267S

2.2.5 Nähr- und Kulturmedien

Produkt	Herstellung/Bezugsquelle
• KSW	Hergestellt aus pA-Salzen nach Hauenschild und Fischer (1969)
• NSW (natürliches Seewasser)	AWI Bremen
• LB-Agar	1,5% Bakto-Agar in LB-Medium lösen
• LB-Medium:	0,5% Hefe-Extrakt, 1,0% Pepton 140, 1,0% NaCl in 100 ml ddH ₂ O lösen und autoklavieren
• NZY Agar	5 g NaCl, 2 g Magnesiumsulfat heptahydrat, 5 g Hefeextrakt, 10 g Caseinhydrolysat oder Pepton, 15g Bacto-Agar, mit Aqua dest. auf ein Volumen von 1 Liter auffüllen und pH-Wert auf 7,5 einstellen. Autoklavieren
• NZY-Broth	5g NaCl, 2g Magnesiumsulfat heptahydrat, 5g Hefeextrakt, 10g Caseinhydrolysat oder Pepton, auf 1 Liter Aqua dest. auffüllen und autoklavieren
• SOB-Medium	5% Hefe-Extrakt, 2,0% Pepton 140, 0,05% NaCl, 2,5 mM KCl, 10mM MgSO ₄ in 100 ml ddH ₂ O lösen und autoklavieren
• SOC Medium	10mM Glucose in SOB Medium

2.2.6 Antikörper

1. Antikörper	Hergestellt in	Verdünnung	Hersteller
• Anti-BrdU	Maus	1:500	Roche 1170376
• Anti-phospho-Histone H3	Kaninchen	1:1000	Biomol 905-752-100
• Anti-tubulin	Maus	1:200	Sigma T9028-.2ML
• Anti-DIG	Schaf		Roche 11 75 025

2. Antikörper	Hergestellt in	Verdünnung	Hersteller
• Anti-Maus cy3	Ziege	1:100	Dianova 115-165-062
• Anti-Kaninchen cy2	Ziege	1:40	Dianova 111-225-045
• Anti-Maus Peroxidase	Ziege	1:100	Sigma A-4416
Serum			
Schafserum			Sigma S-2263
Ziegenserum			Sigma G-9023

2.2.7 Geräte

Produkt	Typ	Hersteller
• Analysenwaage	Sartorius CP 124S	Sartorius AG
• Autoklav	Systec 2540 EL	Astell Scientific
• Binokular	Leica MZ16	Leica Mikrosystems
• critical point dryer	CPD 030	Balzer
• Cycler (PCR)	Peqlab 25	Peqlab
• Digitalkamera	CC-12	Soft Imaging Systems
• Elektrophoresekammer	Peqlab	PeqLab
• Feinwaage	Sartorius BL 310	Sartorius AG
• Knife-Maker	Typ 7890-04 LKB	PCSX Glass Strips zur Herstellung von Glasmessern
• Heizblock	Rotilabo-Block Heater H250	Roth
• Heizplatte	Medax Typ:Sp13; F-Nr: 5057	Nagel AG

• Inkubator	Certomat H7 HK	B. Braun Biotech International
• Kamera-Aufsatz	U-CMAD3	Olympus
• Knifemaker	LKB Knifemaker	LKB Typ: 7801B
• Konfokales Laserscan Mikroskop	TSC SP2	Leica
• Kühlzentrifuge	Mikro 22R	Hettich Zentrifugen
• Magnetheizr�hrer	Modell L-81	MBT Brandt
• Magnetrührer	Modell L-71	MBT Brandt
• Mikroskop	BX 51TF	Olympus
• MiliPore Anlage	Simplicity water	B. Braun Biotech International
• pH-Meter	pH 211; Mikroprocessor	Hanna Instruments
• Reaktionsgefäße		Eppendorf
• Rasterelektronenmikroskop	XL 20	Philips
• Rotator		Universit�tswerkst �tten Mainz
• Schlitten-Mikrotom		Leitz
• Schüttler	Rotamax 120	Heidolph Instruments
• Spektralphotometer	SmartSpec 3000	BioRad
• Sputter Coater	0712 B	(Balzer/Leitz)
• Stereolupe	Om U3	Reicher
• Tisch Zentrifuge	Mikro 20	Hettich Zentrifugen
• Transmissionselektronenmik roskop	TEM Leo 912	Zeiss

- | | | |
|-----------------------|---|-----------|
| • Ultramikrotom | OM3 | Reichert |
| • UV Transilluminator | Typ LS1, VL Vilber
Lourmat TCP-20.0C | Firma VLM |
| • Wärmeschrank | | Memmert |
| • Wasserbad | EC-19 | Julabo |

2.2.7.1 Falcon-Siebe

Zum raschen Überführen von *Platynereis* Gelegen oder verschiedenen *Platynereis* Entwicklungsstadien dienten Falcon-Siebe.

50 ml Falcon Tubes wurden quer zur Längsachse in zwei bis drei Teile gesägt, so dass mehrere beidseitig offene Zylinder entstanden. Dann wurden die Schnittkanten in einer Flamme erhitzt und diese Kante auf eine Nylongaze mit 100 µm großer Maschenweite (je nach Größe der Tiere können auch 70 oder 90 µm Maschenweite benutzt werden) gedrückt. Nach Abkühlung wurde die überstehende Gaze abgeschnitten.

2.2.8 Verwendete Software

- | | | |
|---------------------------|------|---|
| • AnalySIS | 2.3 | Soft Imaging Systems, Münster,
Germany |
| • Amira | 3.0 | TGS, Düsseldorf
Germany |
| • Leica Confocal Software | | Leica |
| • Microsoft Office | 2003 | Microsoft |
| • Adobe Photoshop | 7.0 | Adobe Systems Incorporated, San Jose, USA |

2.3 Histologische Methoden

2.3.1 Fixierungen

Je nach Anwendung (Raster- und Transmissionselektronenmikroskopie, Immunhistochemie oder *in situ* Hybridisierungen) wurden verschiedene Fixierungsverfahren (auf die in den folgenden Kapiteln explizit eingegangen wird) durchgeführt.

Für die Fixierung von postlarvalen Stadien wurden 3-50 segmentige Würmer verwendet. Regenerate wurden in verschiedene Gruppen, abhängig von der Zeit nach der Amputation eingeteilt.

2.3.1.1 Fixierung für die Elektronenmikroskopie

Die hier verwendeten REM und TEM Fixierungen unterscheiden sich nur marginal. Die Proben wurden in ein 2ml Eppendorf Reaktionsgefäß überführt und zunächst für 1 h bei Raumtemperatur in der Fixierlösung 1 (1 ml 25% Glutaraldehyd in 9 ml 0,2 M Phosphatpuffer pH7,2 und 82 mg NaCl) fixiert. Anschließend wurden die Proben dreimal 10 Minuten in der Waschlösung (0,2 M Phosphatpuffer pH 7,4) gewaschen. Danach erfolgte die Nachfixierung mit Fixierlösung 2 (6,25 ml 4% Osmiumtetroxid in 6,25 ml 2,5% Natriumhydrogencarbonat-Puffer pH 7,5). Überschüssige Fixierlösung wurde durch zweimaliges Waschen der Proben in Leitungswasser entfernt. Nach der Fixierung wurden die Proben in einer aufsteigenden Ethanol-Reihe wie folgt dehydriert.

Dauer	Alkoholreihe
20 min	50%
20 min	70%
20 min	80%
20 min	90%
2 x 20 min	96%
20 min	98%

Für die weitere REM Prozedur wurden die Proben in Aceton überführt. Alternativ wurde für REM die Nachfixierung mit Osmiumtetroxid weggelassen und gleich nach den Waschschritten die aufsteigende Alkoholreihe durchgeführt

2.3.1.2 Fixierung für die Immunhistochemie

Immunhistochemische Färbungen wurden bei Regeneraten und verschiedenen Stadien von postlarvalen Tieren durchgeführt. Sofort nach dem Sammeln der Tiere erfolgte zur Permeabilisierung der Cuticula der Verdau mit Proteinase K (100 µg/ml in NSW) für 10 Minuten bei Raumtemperatur. Die Inkubationszeit in Proteinase K wurde für älteren Stadien und Regeneraten um 5 min erhöht. Nach dieser Behandlung folgten zwei Waschriffe in NSW.

Danach wurden die Proben einzeln in 2 ml Reaktionsgefäße in PEM/FA Lösung für 1 h fixiert. Die jungen Stadien wurden mit Hilfe der Falcon Siebe in die entsprechende Fixierlösung überführt. Die Inkubation erfolgte bei Raumtemperatur und unter leichtem Schütteln. Anschließend folgten drei fünfminütige Waschriffe in PBS, um das Formol zu entfernen. Die Proben konnten nun für die Antikörperreaktion weiter verwendet werden. Zur Lagerung wurden die Proben in 100% Methanol überführt und bei -20°C aufbewahrt.

2.3.1.3 Fixierung für die *in situ* Hybridisierung

Die Fixierung erfolgte in 4% Paraformaldehyd (PFA, gelöst in 2x PTW) für 4 h unter leichtem Schütteln bei Raumtemperatur. Anschließend wurden die Proben viermal 5 min in PTW gewaschen. Nach diesen Waschriffen wurden die Tiere in 100% Methanol überführt. Nach nochmaligem Austauschen des Methanols wurden die Proben über Nacht bei -20°C gelagert. Die so behandelten fixierten Stadien können in diesem Zustand bis zur weiteren Verwendung über mehrere Wochen aufbewahrt werden.

2.3.2 Einbettungsverfahren

Für die Herstellung von histologischen Schnitten wurden die Proben in ein Einbettungsmedium überführt. Die Art der Einbettung richtete sich nach der gewünschten Schnittdicke und der anschließenden Weiterverarbeitung. Für Semi- und Ultradünnschnitte wurden Einbettungen in Araldit vorgenommen. Für 5-10 µm dicke Schnitte für *in situ* Hybridisierungen und immunhistochemische Untersuchungen wurden Stadien in Paraffin eingebettet.

2.3.2.1 Araldit Einbettung

Die Proben wurden nach der Fixierung (2.3) in der nachfolgenden aufsteigenden Alkoholreihe entwässert.

Ethanolkonzentration	Inkubationsdauer
70% Ethanol	20 min
80% Ethanol	30 min

90% Ethanol	30 min
96% Ethanol	4 x 30 min

Anschließend wurden die Proben für dreimal 20 min in Propylenoxid (SERVA) inkubiert und anschließend in einem 1:1 Gemisch aus Propylenoxid und Araldit über Nacht belassen. Das Propylenoxid verdampft über Nacht aus den offenen Behältern, so dass am nächsten Tag die Proben aus dem verbliebenen Araldit in neue Schnappdeckelgläser mit reinem Araldit überführt werden konnten. Diese wurden über Nacht im Rotator belassen. Die Proben wurden nun einzeln in Formen aus Silikonkautschuk überführt. Mit Hilfe eines Glasstabes konnten die Kautschukformen vorher mit Araldit aufgefüllt werden. Bei sehr kleinen Tieren wurden die Schnappdeckelgläser auf eine Glasplatte entleert und unter dem Binokular jedes einzelne Tier mit einer Metallsonde aufgenommen und in die Formen überführt. Dort wurden die Tiere für die späteren Semidünnschnitte in Längsrichtung orientiert. Nach der Polymerisierung des Araldits (drei Tage im Wärmeschrank bei 65°C) erfolgte die Herstellung von Semidünnschnitten am Ultramikrotom (Reichert OM3).

2.3.2.2 Paraffin Einbettung

Die fixierten Proben wurden zunächst mit der aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert:

Ethanolkonzentration	Inkubationszeiten
50% Ethanol	30 min
70% Ethanol	über Nacht (ca.10 h)
80% Ethanol	3x 20 min
90% Ethanol	3x 20 min
96% Ethanol	3x 30 min

Die Proben wurden in 100% Isopropanol überführt und darin für 1 h bei Raumtemperatur belassen und anschließend ein Isopropanol/Paraffin Gemisch (Verhältnis 3:1) bei 50°C überführt. Es folgte eine Inkubation über Nacht. Darauf wird die Probe für 1 h in ein Isopropanol/Paraffin Gemisch von 2:1, anschließend für eine Stunde in ein Gemisch von 1:1 gestellt. Nach einer 1 h Inkubation mit reinem Paraffin wurde die Probe ausgegossen. Nach dem Abkühlen wurden die Proben auf einem Holzblock aufgeblickt und 5 µm Schnittserien hergestellt. Die Paraffinschnitte wurden auf Objektträger übertragen und 24 h auf einer Wärmeplatte getrocknet. Die Entparaffinierung erfolgte über drei Stufen in Rotihistol. Anschließend wurden die Proben durch eine absteigende Alkoholreihe rehydriert.

2.3.3 Kontrastierung für die Transmissionselektronenmikroskopie

Die angefertigten Ultradünnschnitte wurden für 22 min in Uranylacetat nachkontrastiert. Nach dem Waschen mit ddH₂O erfolgte eine fünfminütige Behandlung mit Bleicitrat und das erneute Waschen mit ddH₂O Wasser.

Die anschließende Auswertung der Proben erfolgte am Transmissionselektronenmikroskop (LEO AB912).

2.3.4 Behandlung für die Rasterelektronenmikroskopie

Alle Proben wurden Kritisch-Punkt-getrocknet (critical point dryer: Balzer) und anschließend mit einer dünnen Goldschicht überzogen (Sputter-Anlage: Leitz). Die Methoden erfolgten nach Angaben des Herstellers. Die Proben wurden im Rasterelektronenmikroskop (Philips XL20, EDXA) untersucht.

Für die Untersuchung der inneren Organe am REM wurden subadulte Tiere mit einer Größe von etwa 40 Segmenten in Paraffin eingebettet. Nach dem Entfernen der dorsalen Schichten des Tieres mit Hilfe des Mikrotoms erfolgte die Entparaffinierung mit Rotihistol und die Überführung in Aceton mit sich anschließender „Kritisch-Punkt-Trocknung“. Eine weitere Methode zur Ablösung der Körperwand war das „abzupfen“ von äußeren Körperschichten mit zwei Urmacherpinzetten nach der Trocknung.

2.4 Immunhistochemie

2.4.1 Untersuchungen der Zellproliferation

Zur Detektion der Zellproliferation wurde in dieser Arbeit die BrdU Methode und ein Antikörper gegen phosphoryliertes Histon3 benutzt. 5-Brom-2-desoxyuridin (BrdU) ist ein Thymidin-Analogon und wird nach Hemmung der Thymidilatsynthase durch Fluorodeoxyuridine (FdU) während der S-Phase des Zellzyklus anstatt Thymidin in die DNA eingebaut (Gratzner 1982). Das so eingebaute BrdU wird auf die Tochterzellen weitergegeben. Das eingebaute BrdU kann mittels eines Antikörpers nachgewiesen werden. Mit Hilfe der BrdU-Markierung sollen die Geschwindigkeit und Ausrichtung der Teilungen von proliferativ-aktiven Zellen in der Proliferations- und Wachstumszone analysiert werden. Um die BrdU-Markierungen einzelner Geweben wie Epidermis oder Muskulatur zuordnen zu können, wurden Semidünnschnitte von Tieren angefertigt, die BrdU/DAB Markierungen aufwiesen (siehe Kapitel 2.3).

Kernhistone werden im Zuge der mitotischen Chromosomenkondensation phosphoryliert. Anti-phospho-Histon H3 bindet spezifisch an das phosphorylierte Kernhiston 3 und kann damit Zellen, die sich im Moment der Fixierung in der Mitose befanden, detektieren.

2.4.1.1 BrdU-Inkorporation

Aufgrund der unterschiedlichen Wachstumsgeschwindigkeit wurden die Tiere nach ihrer Größe und Segmentanzahl in einzelne Gruppen zusammengefasst.

Tabelle 1: Einteilung der Tiere nach Segmentgröße

Gruppe 1	Gruppe 2	Gruppe 3	Gruppe 4	Gruppe 5
3 Segmente	4-10 Segmente	10 bis 20 Segmente	20- 40 Segmente	>40 Segmente

Die lebenden Tiere in diesen Gruppen wurden für die Dauer von 30 min 1, 2, 4 oder 6 h mit BrdU inkubiert (Pulse Phase). Nach Auswaschen des BrdUs werden die lebenden Tiere noch einen Tag im Seewasser belassen und dann fixiert. Mit dieser „Pulse-Chase-Strategie“ markiert man also zunächst die DNA jener Kerne mit BrdU, die sich während der Pulse-Phase in der S-Phase des Mitosezyklus befinden, um während der „Chase-Phase“ auf die Kerne der Tochterzellen verteilt zu werden. Wegen der semikonservativen Weitergabe des Erbgutes, sind alle Kerne eines Klons im Idealfall gleichermaßen markiert und bleiben erkennbar zusammen. Um die Proliferationsrichtung der mit BrdU markierten Tochterkerne zu untersuchen, wurden Proliferationsversuche mit einer BrdU Inkubationsdauer von 30 Minuten und einer Chase-Phase von jeweils 0, 1, 2 oder 3 Tagen gewählt. Nach Abschluss der Chase Phase wurden die Tiere für die Immunhistochemie fixiert (2.3.1.2).

Für die Untersuchung der Proliferation während der Regeneration wurden 7 Tage alte Regenerate 30 Minuten mit BrdU inkubiert und (nach Auswaschen des BrdUs) jeweils 0, 1, 2 oder 3 Tage im Seewasser belassen und wie unter 2.3.1.2 fixiert. Um den Zeitpunkt des Beginns und die Dauer der Proliferation während der Regeneration bestimmen zu können, wurden Tiere unmittelbar nach der Amputation oder in Abständen von jeweils einer Stunde nach der Amputation (bis zu 48 h) mit BrdU inkubiert. Nach Auswaschen des BrdU erfolgte die „Chase Phase“ von 0-7 Tagen.

Nach der Fixierung erfolgte der Nachweis des eingebauten BrdUs. Die Proben wurden zweimal 30 min in PBS und anschließend für 1 Stunde in einer 0,4 M Glycinlösung gewaschen. Die DNA wird durch eine Inkubation von 45 min in 2 N HCl denaturiert. Um den pH-Wert für die Antikörper-Bindung wieder einzustellen, muss zweimal 5 min mit einer 0,1 M Natriumborat-Lösung gewaschen werden. Anschließend wird für eine Stunde in PBT gewaschen. Die so behandelten Proben wurden mit 100 µl primärem Antikörper (1:500, α -BrdU Maus-IgG;) auf dem Schüttler im Kühlraum (4°C) über

Nacht inkubiert. Um nicht-spezifische Bindestellen für den sekundären Antikörper (goat-anti-Maus-Peroxidase-konjugiert oder Cy3-konjugiert-goat-anti-Maus) abzudecken, wurden die Proben zuvor dreimal 30 min in PBS mit einer 0,2% BSA-Lösung (Rinderserumalbumin) behandelt. Anschließend wurden die Proben über Nacht mit jeweils 100 µl sekundärem Antikörper im Kühlraum inkubiert. Um nicht gebundenen Antikörper zu entfernen, wurden die Proben dreimal 30 min in PBS gewaschen. Dann erfolgte die Färbung mit Diaminobenzidin (DAB) für den Nachweis der Peroxidase konjugierten AK.

Um die Peroxidase-Aktivität des gebundenen sekundären Antikörpers nachweisen zu können, wurde ein Gemisch von Wasserstoffperoxid und 3,3-Diaminobenzidin gewählt. Für die Färbereaktion wurden fertige DAB-Aliquots aufgetaut und mit Wasserstoffperoxid (30%) versetzt (20 µl auf 2 ml DAB). Die Proben wurden einzeln in die so hergestellte Färbelösung gegeben und für mehrere Stunden (unter ständiger Sichtkontrolle) gefärbt. Erst wenn eine deutliche braun-schwarze Färbung einzelner Zellkerne auftrat, konnte die Reaktion mit 5% Ethanol gestoppt werden. Anschließend wurden die Proben fotografiert und für die Aralditeinbettung vorbereitet (s. Aralditeinbettung). Der Nachweis von Cy3-konjugiertem Antikörper erfolgte im Fluoreszenz-(Olympus) oder Konfokalmikroskop (Leica).

2.4.1.2 Markierung mit anti-Phosphohiston3

Der primäre Antikörper (Anti-PH3) wurde in einer Verdünnung von 1:1000 mit der Probe über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach drei Waschschritten in PBT und die Blockierung für 1 Stunde in 0,1% BSA Serum folgte die Inkubation mit dem sekundärem Antikörper (Anti-Rabbit-cy2-Konjugiert; max. Anregung 492 nm und max. Emission 510 nm) bei Raumtemperatur für 2 h. Die Analyse dieser Markierung erfolgte mit dem konfokalen Laserscan Mikroskop (Leica TSC SP2).

2.4.2 Analyse von Aufbau und Entwicklung der Metanephridien

Nephridien sind typische segmentale Strukturen. Die Entwicklung und Struktur der Metanephridien wurde deswegen in den postlarvalen Stadien (3-50 Segmenter) und in Regeneraten untersucht. Da die Kanäle der Metanephridien zum Teil mit Cilien ausgestattet sind, lässt sich deren Struktur mit einem gegen Tubulin gerichteten Antikörper gut untersuchen. Der hier verwendete Antikörper bindet spezifisch an die α -Untereinheit der Mikrotubuli.

2.4.2.1 Markierung mit anti- α -Tubulin Antikörper

Die Proben wurden direkt nach der Fixierung (siehe 2.3.1.2) 3x 5 min mit PBT gewaschen und 1 St mit Ziegenserum inkubiert. Der primäre Antikörper (α -tubulin) wurde in einer Verdünnung von 1:100 aufgetragen und über Nacht auf dem Schüttler bei 4°C inkubiert. Es folgten 3 Waschschrte mit PBT und einer Inkubation mit Ziegen Serum für 1 St. Der sekundäre Antikörper (cy3-konjugierter-Anti-Maus, Dianova) wurde in einer Verdünnung von 1:100 bei Raumtemperatur für 2-3 St aufgetragen. Im Anschluss wurden die Proben im Konfokalen Laserscan Mikroskop (Leica SP2) analysiert.

2.5 Molekularbiologische Methoden

Für die molekularbiologischen Versuchen wurde ein *wnt1*-Fragment, welches von Balavoine und Dorresteiin aus Regeneraten isoliert worden war und in einem pCR II-TOPO Vektor von Invitrogen (Vektorkarte) einkloniert wurde als Grundlage, genutzt. Dieses Fragment wird in den folgenden Abschnitten als *Pduwnt-1* bezeichnet. Das Plasmid wurde als 100ng/ μ l Aliquots bei -80°C gelagert.

2.5.1 Vektorkarte

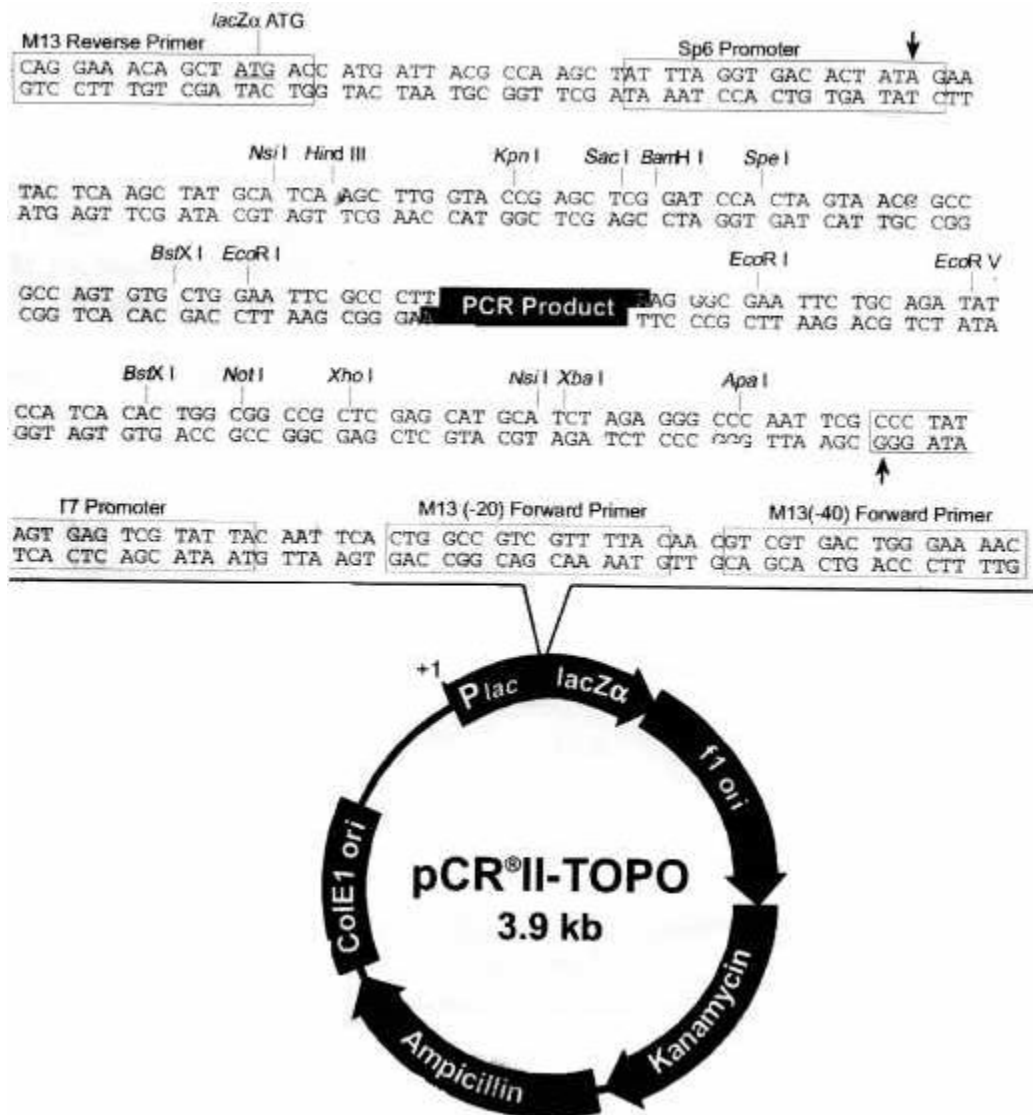


Abbildung 1 Vektorkarte des pCR-TOPO II-Vektors (nach Angabe des Herstellers: Invitrogen):

2.5.2 Herstellung chemisch kompetenter Zellen

Die *Escherichia coli* Bakterien (Stamm: XL1-Blue MRF) wurden aus einer Dauerkultur entnommen und auf LB-Platten mit 12,5 µg/ml Tetracyclin bei 37°C über Nacht inkubiert. Einzelne gewachsene Kolonien wurden mit einer sterilen Impföse in 5 ml LB-Medium überführt und über Nacht bei 37°C inkubiert. 300 µl dieser Kultur wurden dann am nächsten Tag in 30 ml neuem LB-Medium verdünnt und für ca. 3-6 h bei 37°C auf dem Schüttler inkubiert. Nach ca. 2 h erfolgte bei 600 nm eine photometrische Messung der optischen Dichte (OD) der Suspension. Diese Messung wurde halbstündig wiederholt bis die Lösung eine OD₆₀₀=0,5 erreicht hat. Nun wurde die Lösung für

10 min auf Eis gestellt. Die Bakteriensuspension wurde anschließend bei 4°C und 4000 x g 10 min lang zentrifugiert. Alle nachfolgenden Schritte erfolgten auf Eis. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet mit einer sterilen 0,1 M MgCl₂-Lösung (15 ml) gelöst und 15 min inkubiert. Die Bakterien wurden erneut pelletiert. Nun wurde das Pellet mit einer sterilen 0,1 M CaCl₂-Lösung resuspendiert. Das Volumen der CaCl₂-Lösung betrug das 0,1-fache der ursprünglichen Bakterien-Lösung, also 3 ml. Zur Lagerung wurden je 100 µl Bakteriensuspension mit 100 µl Glycerin in Eppendorfgefäßen vermischt, in flüssigen Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

2.5.3 Transformation

200 µl kompetente Zellen wurden mit 100 ng Plasmid DNA auf Eis für zwei Stunden inkubiert. Dabei wurde die Bakterienlösung nach Zufügen der Plasmidlösung leicht geschwenkt. Anschließend kamen die Zellen für 100 s in ein auf 42°C aufgewärmtes Wasserbad. Danach wurden die nun transfizierten Zellen sofort wieder auf Eis gelegt und mit 800 µl kaltem SOC Medium aufgestockt. Diese Lösung wurde so bei 37°C auf dem Schüttler inkubiert und über Nacht auf Ampicillin-LB-Platten (50 µg/ml) ausgestrichen. Nur transformierte Zellen, d.h. Bakterien, die das PCR-II TOPO Plasmid aufgenommen haben, sind auch resistent gegen Ampicilin. Um nicht nur den Transformationserfolg zu überprüfen, sondern auch zu testen, ob sich das gewünschte DNA-Fragment als Insert in das Plasmid einschleusen ließ, wurde eine Blau-Weiß Selektion durchgeführt.

2.5.4 Blau-Weiß Selektion

Der PCR-II TOPO Plasmid-Vektor (2.5.1) besitzt eine multiple Klonierungsstelle (MCS), welche auf einem Abschnitt des lacZ Gens liegt. Dieser Abschnitt codiert einen Teil des Enzyms β-Galactosidase. In Anwesenheit des Farbstoffs X-Gal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranosid) bilden sich blaue Kolonien. Ist die MCS mit Fremd-DNA beladen, wird kein lacZ produziert, und wachsen sich weiße Kolonien. Auf die LB-Platte wurden 40 µl 2% X-Gal und 6,7% IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid, (dient als Aktivator des lacZ-Operons und sorgt dafür dass das LacZ Gen in die β-Galactosidase transkribiert wird)) pipettiert und anschließend ausplattiert. Die so behandelten Platten waren für mindestens 3 h geöffnet, damit das DMSO verdampfen konnte. Die transfizierten Zellen wurden auf diesen Platten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die weißen Kolonien wurden weiter verwendet.

2.5.5 Plasmid-Präparation

Für die Isolierung der Plasmide wurde ein E.Z.N.A. Plasmid Miniprep Kit II (Peqlab) verwendet. Dazu wurde ein Volumen von jeweils 10 ml LB mit einer transfizierten weißen Kolonie *E.coli* angeimpft und über Nacht bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Danach wurde nach Protokoll des Herstellers vorgegangen. Am Ende dieser Prozedur erhält man die Plasmide mit dem inserierten DNA-Fragment. Die Konzentration der entsprechenden Lösungen an DNA wurde im Spektralphotometer gemessen. Die Absorption wird bei 260 nm und 280 nm in Quarz-Küvetten bestimmt. Als Referenzwert bzw. Nullwert wurden die Messwerte von reinem LB-Medium verwendet.

2.5.6 Whole mount *in-situ* Hybridisierung (WMISH)

2.5.6.1 Vorbereitung der Templates für die Sondensynthese

2.5.6.1.1 Linearisierung des Plasmids durch Restriktionsverdau

Wie die Vektorkarte demonstriert, wird das Fragment jeweils von der T7-, SP6- bzw. T3-Promotorregion flankiert. Um bei der *in vitro*-Transkription des einklonierten Inserts RNA-Sonden in sense und anti-sense-Form zu erhalten, müssen die Plasmide zunächst linearisiert werden. Daher wurden 3 µg Plasmid jeweils mit einem der entsprechenden Restriktionsenzymen behandelt. ECO-RV schneidet eine Schnittstelle in 5'-Bereich vom Insert, während Hind III eine Schnittstelle in 3'-Richtung vom Fragment schneidet. Es wurden dementsprechend zwei Ansätze nach folgendem Pipettierschema angelegt:

3 µg	Plasmid DNA
2 µl	10 x Puffer (Fermentas, entsprechend des Enzyms)
0,5 µl	Restriktionsenzym
ad 20 µl	ddH ₂ O

Die zwei Ansätze wurden dann bei 37°C für 4 h inkubiert. Die Kontrolle des Restriktionsverdaus erfolgte über ein analytisches Agarosegel.

2.5.6.1.2 Alkoholische Fällung von Nukleinsäuren

Um die linearisierte DNA zu reinigen wurde eine alkoholische Fällung nach Sambrook et al. (1989) durchgeführt. Dazu wurden 1/10 Volumen 3 M Na-Acetat-Lösung (pH 5,5)

zur Nukleinsäurelösung dazugegeben und gemischt. Zu Fällung wurde diese Lösung mit eiskaltem 96%igem Ethanol versetzt und weiter über Nacht bei -20°C. Mit einer Tischzentrifuge wurden die DNA-Lösung für eine Stunde bei maximaler Geschwindigkeit (~13.000 x g) zentrifugiert. Es folgten zwei Waschschriffe in 70% Ethanol. Das Pellet wurde nach dem Trocknen in ddH₂O gelöst. Zum Schluss wurde die DNA mit einem 1,5%igem Agarosegel und durch eine photometrische Quantifizierung bei einer Wellenlänge von 260/280 nm überprüft.

2.5.6.1.3 Amplifikation mittels PCR

Alternativ zum Restriktionsverdau kann man das gewünschte Insert auch im PCR Verfahren amplifizieren. Der PCR II-TOPO-Vektor von Invitrogen besitzt flankierend zum Insert jeweilige M13 Forward und Reverse Promotoren (für die Bindung der M13 Primer), welche einige Basenpaare strangauf- bzw. strangabwärts liegen (s. Vektorkarte 2.5.1).

Pipetierschema:

50-100 ng	Plasmid-DNA
5 µl	10 x PCR Puffer
1 µl	dNTP-Mix (10 mmol)
1 µl	Forward Primer (10pmol/µl)
1 µl	Reverse Primer (10 pmol/ µl)
0,5 µl	Taq-Polymerase (New England Biolabs)
ad 50 µl	ddH ₂ O

Folgendes PCR-Schema wurde gewählt:

Initiale Denaturierung	94°C 5 min	
Denaturierung der DNA	94°C 45 sec	30 Zyklen
Anealing	50°C 45sec	
Elongation	75°C 45sec	
Finale Elongation	75°C 5min	

2.5.6.1.4 Aufreinigung von PCR Produkten aus Agarose Gelen

Die Größe, der mit diesem Verfahren gewonnenen DNA-Fragmente, wurde mittels Gelelektrophorese mit einem 1,5%igem Agarosegel überprüft. Auf dem UV-Transilluminator wurde die Bande mit dem Insert herausgeschnitten und mit dem Gelextraktionskit von Peqlab nach Herstellerangabe eluiert und aufgereinigt.

2.5.6.1.5 Sondensynthese

Der Vektor mit dem inklonierten Insert besitzt flankierende RNA-Polymerase-Promotoren (SP6 und T7). Mit Hilfe der entsprechenden RNA-Polymerasen konnten jeweils zwei gegenläufige (sense und antisense) RNA-Proben hergestellt werden. Es wurde das *in vitro*-Transkriptionskit von Roche benutzt. Bei diesem Kit werden zur Synthese von RNA Digoxigenin-konjugierte Ribonukleotide angeboten, die in die neu synthetisierte RNA integriert werden. Die Arbeitsschritte wurden nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

Pipettierschema:

1 µg	Plasmid DNA
2 µl	10 x DIG-RNA labeling Mix
2 µl	Transkriptionspuffer
2 µl	RNA Polymerase
ad20 µl	(RNase freies) ddH ₂ O

Der Reaktionsansatz wurde 2 h bei 37°C inkubiert. Durch Überführung des Reaktionsgefäßes in -20°C wurde die Reaktion gestoppt. Anschließend wurde 1,5 µl RNase freie DNaseI dem Reaktionsgemisch zugefügt. Die Aufreinigung erfolgte mit dem RNAeasy Protect MiniKit (Qiagen).

2.5.6.1.6 Dot-Blot-Analyse

Um möglichst schnell den Transkriptionserfolg und den Einbau von Digoxigenin in einer Sonde überprüfen zu können, wurde eine Dot-Blot-Analyse durchgeführt. Dazu wurde von der aufgereinigten Sonde eine Verdünnung angefertigt, die 10 ng Sonde/ μ l Lösung enthielt. Ausgehend von dieser Lösung wurden weitere Verdünnungen angefertigt (1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000) und davon jeweils 1 μ l punktförmig auf einen Nylonmembran aufgetragen, kurz getrocknet und anschließend 2 h bei 80°C gebacken. Die RNA ist nun kovalent an den Filter gebunden. Der Nachweis der markierten RNA erfolgte colorimetrisch (siehe in WMISH Protokoll die Färbereaktion).

2.5.6.2 Herstellung des präabsorbierten anti-Digoxigenin-Antikörper

Um unspezifische Bindungen von anti-DIG-Antikörper an *Platynereis*-Proteinen zu vermeiden, wurde das Antikörperkonjugat (Roche) in Vorbereitung auf die gesamte Hybridisierungsprozedur mit einem Proteinhomogenat von fixierten, geschlechtsreifen *Platynereis*-Weibchen (deckt das gesamte Proteinspektrum von *Platynereis* ab) präinkubiert. Der so gereinigte anti-DIG-Antikörper bindet mit hoher Spezifität nur an DIG-konjugierte RNA-Hybriden, so dass eine nur sehr geringe Hintergrundfärbung entstand. Die Präparation dieser Proteinsuspension erfolgt nach folgender Methode: Die reifen Weibchen werden in 4% PFA (in 2x PTW) fixiert. Es folgten vier Waschschrte (je 5 min) mit PTW. Danach wurden die fixierten Weibchen in 100% Methanol überführt und mindestens über Nacht bei -20°C gelagert. Nach dieser Methanolbehandlung wurden die Tiere dreimal 5 min mit PTW gewaschen, in 2 ml Eppendorfreaktionsgefäße überführt und mit Ultraschall homogenisiert. Das Homogenat wurde auf ein Volumen von 1 ml mit PTW aufgefüllt, mit 10 μ l Antikörper vermischt (entstandene Verdünnung 1 : 100) und über Nacht bei 4°C inkubiert. Danach wurde die Suspension abzentrifugiert (5 min bei 13.000 x g) und der Überstand sterilfiltriert (Cellulose-Acetat, Porengröße 0,2 μ m). Das Pellet wurde mit PTW resuspendiert, abzentrifugiert und der Überstand sterilfiltriert. Beide Filtrate wurden gereinigt und mit PTW auf ein Endvolumen von 20 ml aufgefüllt (entstandene Endverdünnung 1 : 2000). Die hergestellten präadsorbierten Antikörper können bei 4°C bis zu einem Monat gelagert werden.

2.5.6.3 WMISH-Protokoll für *Platynereis dumerilii*

Die Digoxigenin-markierten RNA-Sonden (Sense und Anti-sense) wurden nun bei der *in situ*-Hybridisierung eingesetzt. Subadulte Tiere und verschiedene Regenerationsstadien (2, 4, 6, 8 und 10 Tage nach der Amputation) wurden für die *in situ* Hybridisierung verwendet. Vor der Hybridisierung müssen die fixierten Tiere (siehe Fixierung für die *in situ* Hybridisierung) rehydriert werden. Dazu wurde eine absteigende Methanolreihe benutzt. Die Tiere wurden für jeweils 10 min in 75%, 50% und 25% Methanol (in PTW) behandelt. Danach wurden die Tiere zweimal 5 min in PTW gewaschen. Es folgte die Behandlung mit Proteinase K (100 µg/ml, frisch hergestellt aus Proteinase K-Stammlösung). Während der Inkubation in Proteinase K-Lösung durften die Tiere nicht geschüttelt werden. Die Dauer der Behandlung mit Proteinase K betrug bei subadulten Würmern und Regeneraten 15 min bei Raumtemperatur. Nach der Proteinase K Behandlung wurden zwei Waschschrte mit frisch hergestelltem Glycin in PTW (0,2% w/v) ausgeführt. Danach wurden die Tiere zur Stabilisierung 20 min in 4% PFA in 2x PTW nachfixiert. Nach Entfernung des Fixans wurden die Proben fünfmal mit PTW gewaschen.

Die Proben wurden 1-2 h in 1 ml *in situ*-Hybridisierungspuffer bei 65°C im Wasserbad prähybridisiert. Zwischenzeitlich wurde die DIG-markierte RNA-Sonde 10 min bei 80°C denaturiert und mit auf 65°C vorgewärmtem *in situ*-Hybridisierungspuffer entsprechend verdünnt (Verdünnung: 4 µl Sonde/ 200 µl *in situ*-Hybridisierungspuffer pro Aliquot Probenmaterial). Nach der Prähybridisierung wurde der Überstand entfernt und 200 µl *in situ*-Hybridisierungspuffer mit der verdünnten Sonde pro Aliquot dazugegeben. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 65°C im Wasserbad. Nach der Hybridisierung wurden Stringenzwaschschrte durchgeführt. Beim ersten Waschschrte wurden die Larven zweimal 30 min in 2 ml 50% Formamid in 2x SSCT bei 65°C gewaschen. Es folgte ein zweiter Waschschrte, bei dem die Tiere 15 min in 2 ml 2x SSCT bei 65°C inkubiert wurden. Beim dritten Waschschrte wurden die Proben zweimal 30 min mit 2 ml 0,2x SSCT bei 65°C gewaschen. Alle Waschlösungen wurden auf 65°C vorgewärmt.

Nach den Stringenzwaschschrten wurden die Larven eine Stunde lang mit 1 ml 5% Schafserum in PTW bei Raumtemperatur vorbehandelt. Danach wurde das Schafserum abgenommen und 200 µl präadsorbierter anti-DIG-Antikörper zu jedem Ansatz gegeben. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4°C. Nach der Inkubation wurden die Tiere sechsmal 10 min mit jeweils 1 ml PTW gewaschen. Es folgte eine

Äquilibrierung mit Detektionspuffer (zweimal 5 min). Die Larven wurden in 6-well-Zellkulturplatte überführt und mit kurz zuvor zusammengestellter Färbelösung (pro 1 ml Detektionspuffer: 4,5 µl NBT (Endkonzentration: 337,5 µg/ml) und 3,5 µl BCIP (Endkonzentration: 175 µg/ml)) überschichtet. Die Färbung erfolgte im Dunkeln und kann zwischen einer halben Stunden bis zu zwei Tagen dauern. Die Färbereaktion wurde mit einem Binokular regelmäßig, d.h. in 30-minütigen Intervallen überprüft. Die Reaktion wurde nach Entfernung der Färbelösung durch Zugabe von 2 ml Detektionspuffer gestoppt. Anschließend wurden die Proben dreimal 5 min in PTW gewaschen. Die gefärbten Tiere wurden in 87% Glycerin überführt und über Nacht äquilibriert. Danach wurden die Tiere auf Objektträger gebracht und mit einer Digitalkamera (auf das Mikroskop montiert) fotografiert. Positiv markierte Tiere wurden in Paraffin eingebettet und davon Schnittserien angefertigt. Diese Schnitte wurden digitalisiert und dreidimensional rekonstruiert.

2.6 Bildaufnahme und –analyse

Gewebeschnitte wurden am Mikroskop (20X) digitalisiert und mit Hilfe von verschiedenen Programmen (Photoshop, Irfanview) bearbeitet. Antikörpermarkierungen mit fluorochrom-konjugiertem Antikörper wurden mit dem KLSM analysiert und als Bildserien entlang der z-Achse (Image stacks) gespeichert.

2.6.1 Dreidimensionale Darstellung mit Amira

Optische (KLSM) - und Gewebeschnitte können mit Hilfe des Programms Amira (TGS, Düsseldorf) zusammengefasst und so bearbeitet werden, dass daraus eine dreidimensionale Rekonstruktion entsteht. Darüber hinaus kann das Objekt „segmentiert“ werden, um einzelne Gewebe oder Organsystem gesondert zu kennzeichnen. Im Folgenden soll kurz erläutert werden, welches Programmmodul für die einzelnen Schritte verwendet und welche Parameter dabei eingesetzt worden sind.

2.6.1.1 Aufnahme und Bearbeitung von Gewebeschnitten.

Schnittserien von Paraffin und Araldit Gewebeschnitten wurden digital aufgenommen und als Datensatz in das Programm Amira geladen. Daten, wie die Bildgröße oder die Farbinformation werden durch das (nach dem Transfer der Daten automatisch erscheinenden) Modul „Image Read Parameter“ eingegeben. Dieses besteht aus verschiedenen Menüfeldern. Das Menüfeld „Channel conversion“ wurde auf „maximum“ gesetzt um eine „bestmögliche“ Umwandlung der vorhandenen Farben in

Grauwerte zu erhalten. Die spätere Segmentierung des Datensatzes ist nur möglich wenn alle Farben in dementsprechende Grauwerte umgewandelt werden. Unter „Resolution“ wurden im Menüfeld „Voxelsize“ (Voxel: dreidimensionale Bezeichnung für einen Bildpunkt) die Größenverhältnisse des Datensatzes eingestellt. Die x und y Komponente wird durch die mitgelieferte Bildinformation (also Vergrößerung des Mikroskops und der Auflösung des aufgenommenen Bildes) festgelegt und wurde nicht verändert. Die Z-Komponente hingegen wird aus der „Schnittdicke“ und der Anzahl der einzelnen Bilder innerhalb der Schnittserien zusammengesetzt. Dabei werden auch Schnitte hinzugezogen, die im Datensatz fehlen, jedoch für die realistische Darstellung des Tieres vom Rechner interpoliert werden sollen. Bei 1 μm Schnittdicke, wäre der jeweilige Abstand 1, bei einem entsprechenden Verlust von 25% der Schnitte, erhöht sich der Wert auf 1,5. Aufgrund der begrenzten Rechenkapazitäten wurden die Bilder mit Hilfe des Moduls „Compute/resample“ auf die halbe Auflösung heruntergerechnet. Anschließend erfolgte mit dem Modul „Compute/align slices“ die Alignierung (deckungsgleich verschoben) der Bilder einer Schnittserie.

Um das Objekt zu segmentieren, muss das Modul „Labelfield“ aktiviert und der „segmentation editor“ geöffnet werden. Damit war es möglich Keimblatt Derivaten (entodermale, mesodermale und ektodermale Strukturen) und einzelnen BrdU markierten Zellkernen bzw. *Pduwnt-1* exprimierenden Zellen spezifische Farben zuzuordnen und separat darzustellen.

Nach dieser Bearbeitung wurde die Rekonstruktion mit dem Modul „Labelfield/compute/ Surface gen“ visualisiert. Mit dem Befehl „Smooth surface“ wurde die Oberfläche geglättet, so dass die eventuell unregelmäßigen Übergänge der einzelnen Schnitte nicht mehr sichtbar waren. Die so rekonstruierten Objekte wurden dann nach 3D-Rotation aus verschiedenen Perspektiven aufgenommen.

2.6.1.2 Bearbeitung von optischen Schnitten aus dem KLSM

Liegen optische Schnitte als Image stacks im Leica Format aus konfokalen Aufnahmen vor, kann dies von Amira direkt eingelesen werden. Da alle Informationen zur Bildgröße und Abstand zwischen den Schnitten dort enthalten sind, ist die Parameter Eingabe und die Alignierung der einzelnen Bilder nicht notwendig. Da auch hier die Datensätze sehr groß sind, wurde mit dem Modul „compute/resample“ die Bildauflösung auf 50% reduziert. Die Visualisierung erfolgte hier mit dem Modul Isosurface und Voltex. Bei dem Modul Isosurface werden Bildpunkte ab einem

Helligkeitswert, den man selbst bestimmen kann, dreidimensional dargestellt. Der Nachteil bei dieser Methode ist, dass innere Strukturen von Oberflächen verdeckt werden. Mit dem Modul Voltex (direktes Volumen Rendering) werden alle Bildpunkte des Datensatzes erfasst und dargestellt. Die Darstellung ist transparent. Mit diesen Methoden wurden die BrdU und PH3 Markierungen drei-dimensional dargestellt. Für die Darstellung des Nervensystems und der Metanephridien wurde, aufgrund der vielfältigen Tubulin-Strukturen im Körper des Wurmes, auf den Segmentierungseditor zurückgegriffen. Metanephridien und Nervensystem wurden, wie in Kapitel 2.6 markiert.

3 Ergebnisse

3.1 Morphologische Befunde zur Segmentbildung in postlarvalen Stadien und in Regeneraten

3.1.1 Entwicklung von postlarvalen Stadien

3.1.1.1 Bildung von Segmenten

Vor Beginn des postlarvalen Wachstums besteht *Platynereis dumerilii* aus Kopf (vorwiegend Prostomium), Rumpf und dem posterior gelegenen Pygidium (Abb. 1 A). Der Rumpf besteht in dieser Phase aus drei parapodientragenden Segmenten (Deutomere). Parapodien sind laterale Körperanhänge und werden in einen ventralen Teil, dem Neuropodium, und einem dorsalen Teil, dem Notopodium unterteilt. Im dreisegmentigen Jungwurm bestehen Neuro- und Notopodium aus sehr kurzen Körperauswölbungen und sehr langen Borsten (Abb. 1A). Zusammengesetzte Borsten ragen sowohl aus Noto- als auch aus dem Neuropodium hervor (Abb. 1C). Die postlarvale Entwicklung des Wurmes beginnt am Ende des Nectochaeta-Stadiums mit dem Auswachsen des ersten postlarvalen Segmentes (Tritomer). Im Gegensatz zu den Deutomeren entsteht das Zellmaterial der Tritomere in einer prepygidialen Proliferationszone (PZ). Die Zone zwischen PZ und dem ausdifferenzierten Segment entspricht der Wachstumszone. Diese besteht anfangs aus einer Segmentanlage ohne sichtbare Differenzierungsmerkmale (Abb. 1B). Zunächst erfolgt ein Längenwachstum des Segmentes. Die Segmentanlage breitet sich in anteriorer Richtung aus, wobei es Unterschiede zwischen dorsalen und ventralen Wachstumsgeschwindigkeiten gibt. Der ventrale Teil der Segmentanlage ist in der Anfangsphase des Segmentwachstums deutlich breiter als der dorsale Teil (Abb. 1 C). Als erste äußere Differenzierungen sind die ventro-lateralen Knospen der sich entwickelnden Parapodialanlagen sichtbar. In der weiteren Entwicklung setzt sich das Wachstum des Segmentes fort und die Parapodialanlagen wachsen. Neuro- und Notopodium werden größer und erste Borsten treten hervor. Als ausgewachsen gilt ein Segment, wenn Ventral- bzw. Dorsalcirrus vollständig ausdifferenziert sind. Während dieser ersten Differenzierungsphase der Segmentanlage setzt erneut ein Schub der Zellproliferation in der PZ ein. Diese wächst durch weitere Zellteilungen und durch Streckung ebenfalls zunächst in die Länge. Eine weitere Differenzierung erfolgt jedoch erst, wenn die vorangegangene anterior liegende Segmentanlage vollständig ausgewachsen ist. Bis zu dieser Ausdifferenzierung

verbleibt die folgende Segmentanlage ohne sichtbare Parapodialanlagen (Abb. 1C und D).

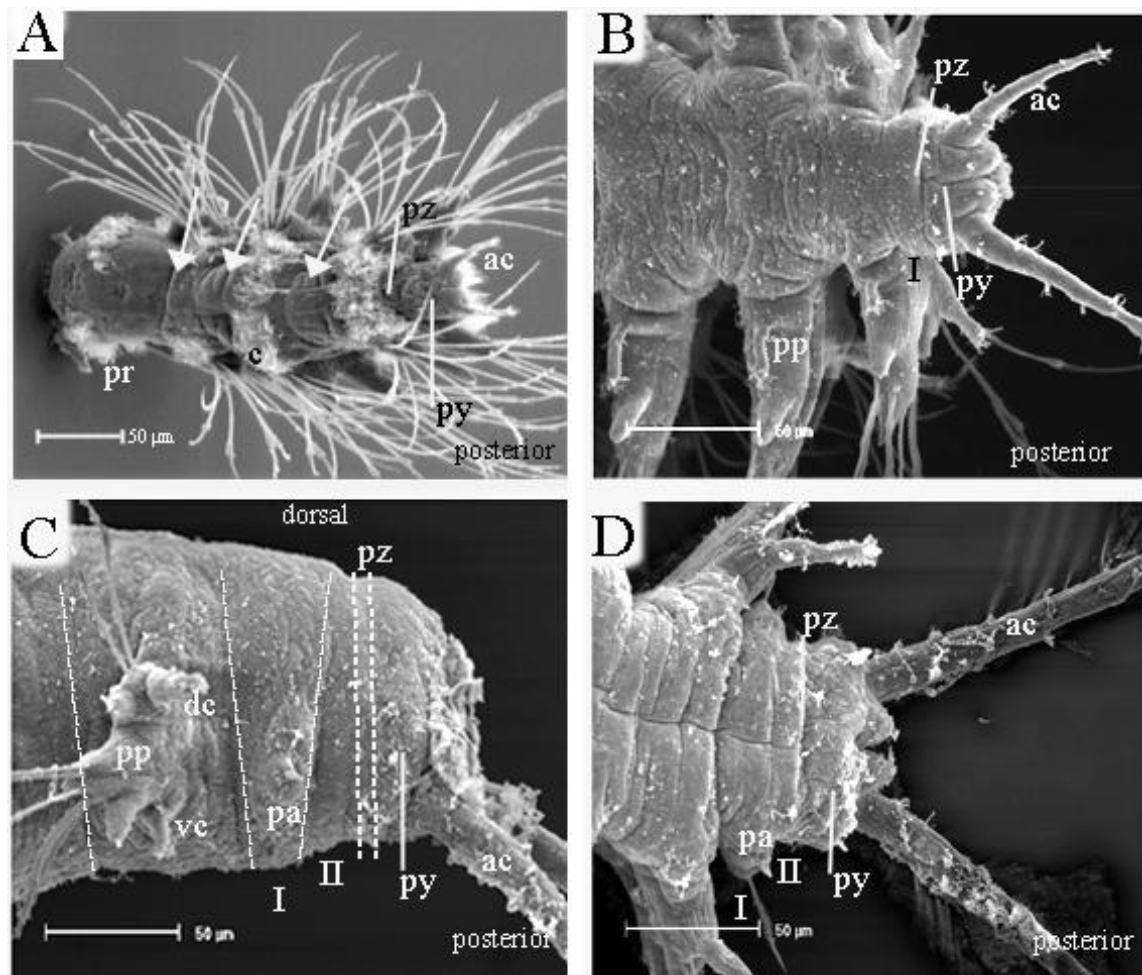


Abbildung 1

REM Aufnahmen, postlarvale Stadien

A: Jungwurm mit drei Deutomeren (weißer Pfeil), Cilienbändern (c) Pygidium (py), Proliferationszone (pz) und Prostomium (pr) **B-D:** 5-8-segmentige Jungwürmer, posterior. **B:** ventrale Ansicht mit einer Segmentanlage (I) **C:** laterale Ansicht mit zwei Segmentanlagen (I und II) I zeigt Parapodialanlagen (pa). II ist dorsal schmaler als ventral und zeigt keine sichtbaren Differenzierungen. **D:** ventrale Ansicht mit zwei Segmentanlagen (I/II). Der Differenzierungsgrad der Parapodialanlagen ist im Vergleich zu I in C deutlich vorangeschritten, sichtbar an den Borsten die aus der Parapodialanlage herausragen. II hingegen unterscheidet sich nicht von II in C. **B-D:** Pygidium (py), Proliferationszone (pz), Parapodium (pp), Parapodialanlage (pa), Ventralcirrus (vc), Dorsalcirrus (dc), Analcirren (ac)

3.1.1.2 Entwicklung der Oberflächenstruktur des Rumpfes

Der äußere sichtbare segmentale Körperbau von *Platynereis dumerilii* zeichnet sich unter anderem durch unterschiedliche Cuticularstrukturen aus.

Die Oberfläche der Cuticula ist durch einzelne, ca. 2 µm großen Vorwölbungen gekennzeichnet, die unterschiedlich geformt und angeordnet sind (Abb. 2A). Diese Cuticularstruktur wird in unregelmäßigen Abständen von deutlich abgegrenzten Öffnungen unterbrochen (Abb. 2A). Im Gegensatz zur Cuticula von Arthropoden ist die Cuticula von *Platynereis dumerilii* kein starrer Panzer, sondern passt sich den Formen, bzw. dem segmentierten Körperbau des Wurmes an. So kommen nicht nur an der Segmentgrenze, sondern auch innerhalb eines Segmentes verdickte Cuticularstrukturen vor. Dabei gibt es Unterschiede in Position und Alter der Cuticula. Bei 4-20 Segmentern ist z.B. die dorsale Seite eben und weist keinerlei Unterteilungen auf. Auf der ventralen Seite eines Rumpfsegmentes hingegen ist die Cuticula insgesamt dünner, und es zeichnen sich die Konturen innerer Organe ab, wie z.B. die ventralen Längsmuskelstränge (Abb. 2B). Die beiden ventralen Muskelstränge (im REM als Leistenstruktur sichtbar) werden in jedem Segment über eine Querleiste miteinander verbunden. Die Segmente sind posterior und anterior durch eine schmale Einbuchtung voneinander getrennt.

Im Laufe der Entwicklung verdickt sich die Cuticula über die gesamte dorsale und ventrale Seite eines Segmentes (Abb. 2C). Dabei nimmt die Stärke der Verdickungen von der Segmentmitte zum posterioren Rand hin ab. Zusätzlich befindet sich an den jeweiligen posterioren Grenzen eines jeden Rumpfsegmentes eine zentral leicht abgesenkte Einbuchtung (Abb. 2C). Die Segmentgrenzen selbst werden von der Verdickung der Cuticula ausgelassen. Dort gibt es einen deutlichen abgesetzten Streifen zum benachbarten Segment. Lateral werden die Segmente durch eine dünne Einbuchtung voneinander getrennt (Abb. 2D) Diese dünne Linie zieht sich von der ventralen Seite bis zur Höhe des Dorsalcirrus. Dort geht die Segmentgrenze in den oben beschriebenen abgesetzten Streifen zwischen den verdickten Cuticularstrukturen über. Leicht ventral gelegen sind die beschriebenen Parapodialstrukturen (Kapitel 2.1).

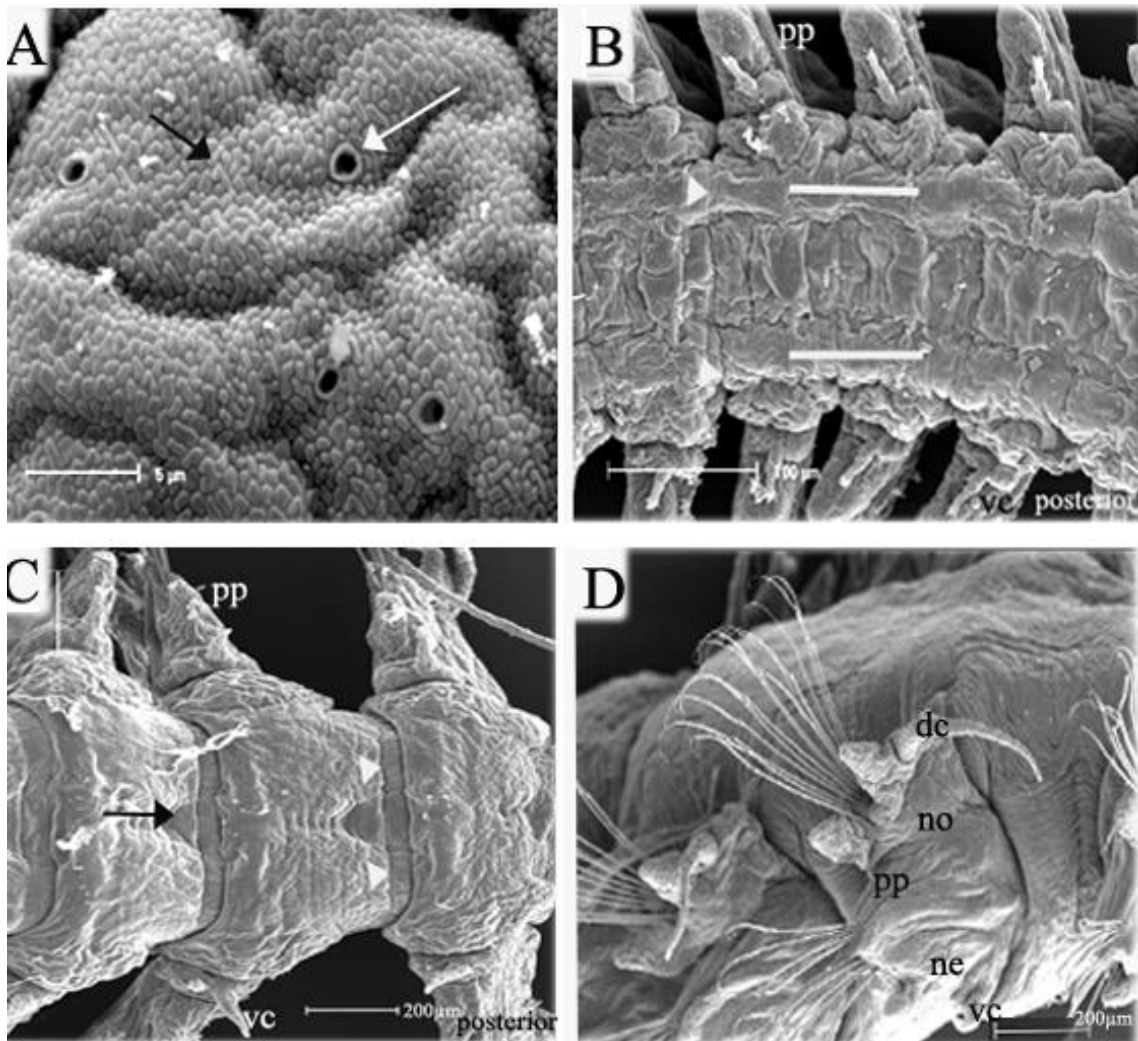


Abbildung 2

REM Aufnahmen, Rumpfoberfläche von 20-50 segmentigen subadulten Tieren.

A: Detailaufnahme der Oberfläche der Cuticula. Die plättchenartigen Vorwölbungen (schwarzer Pfeil) werden von Drüsenöffnungen (weißer Pfeil) unterbrochen. **B:** ventrale Rumpfansicht von jüngeren Tieren (ca. 10 Segmente). Zwischen Parapodien und Rumpf befinden sich segmentübergreifende Leisten (äußerlich sichtbare ventrale Muskelstränge), die median im jeweiligen Segment miteinander verbunden sind (weiße Linien). Die Segmentgrenzen sind durch schmale Einbuchtungen gekennzeichnet (weiße Pfeile). **C:** ventrale Ansicht von älteren Rumpfsegmenten (>30 Segmente). Die Cuticularstrukturen verdichten sich zu einer verdickten Struktur die anterior und posterior durch schmale abgesetzte Streifen (weiße Pfeile) von den Nachbarsegmenten getrennt ist. Posterior befindet sich eine halbkreisförmige Einbuchtung (schwarzer Pfeil). **D:** Lateralansicht eines Rumpfsegmentes. Die Segmentgrenze ist bis zur Höhe des Dorsalcirrus (dc) als schmaler Streifen erkennbar. Cirren (b), Neuropodium (ne), Noto-podium (no), Parapodien (pp), Ventralcirrus (vc)

3.1.1.3 Organisation der inneren Organe

Im vorangehenden Kapitel wird die äußerlich erkennbare homonome Segmentierung beschrieben. Um die inneren Organe zu untersuchen, wurden Teile der Körperwand durch Teilanschnitte oder durch Abzupfen entfernt. Deutliche segmental organisierte Strukturen sind die Coelomräume, sowie das Nerven- und das Exkretionssystem. Das Coelom umfasst den gesamten Raum zwischen der Darmwand und der Epidermis an den Parapodien (Abb. 3A). In anterior-posteriorer Richtung werden die einzelnen Segmente von Dissepimenten getrennt (Abb. 3A und B). Die Coelomräume sind mit muskulären Strukturen ausgekleidet. Die Wände der Dissepimente sind mit langen gestreckten Muskelbändern bedeckt. Muskelbänder sind auch auf der Darmwand zu finden. Hier sind diese Bänder jedoch nicht gestreckt sondern vielmehr zusammengepresst zu kleinen kugelartigen Strukturen (Abb. 3 B). Weiterhin finden sich parapodiale oder transversale Muskelgruppen im Coelomraum. Diese Muskelbänder inserieren am ventralen Parapodialboden und ziehen durch den Coelomraum zum Notopodium. Diesen beidseitig verankerten Muskelsträngen stehen die Acicularmuskeln entgegen. Die Aciculae sind stabile Stützborsten, die an der Basis von strahlenförmig verlaufenden Muskelsträngen umgeben sind. Diese Muskelstränge verlaufen somit zur Grenze zwischen Dissepiment und Parapodialwand (Abb. 3 A). So wird die Stützborste fest an der parapodialen Wand verankert, ist jedoch am proximalen Ende frei beweglich. Neben diesen Muskeln des Coelomraums durchziehen außerdem zwei dorsale und zwei ventrale Längsmuskelstränge das gesamte Tier (Abb. 3A und 4A). Dabei wird das Dissepiment, wie in Abbildung 3A deutlich wird, durchbrochen. Ventral liegen beide Muskelstränge in unmittelbarer Nachbarschaft zum Hauptnervenstrang, dorsal flankieren sie das Dorsalgefäß (Abb. 4A). Ringmuskeln befinden sich unter der gesamten Epidermis (Abb. 4A und 4B). Das Tier enthält außer den segmental angeordneten Coelomräumen auch durchgehende Organstrukturen, wie z.B. den Darm. Der Darm ist in Vorder-, Mittel- und Enddarm unterteilt, wobei der Mitteldarm fast den gesamten Rumpf ohne eine segmentale Begrenzung durchzieht (Abb. 3A). Weitere segmentale innere Strukturen sind Blutgefäße und Nervenbahnen. Das Dorsalgefäß durchzieht den gesamten Rumpf (Abb. 4A und B). Ventral liegt es dem „Darmdach“ auf, und dorsal ist es eng verknüpft mit der Ringmuskelschicht (Abb. 4B). Um das Dorsalgefäß herum sind Gefäße mit Verknüpfungen in lateraler und ventraler Richtung angeordnet. Auf dem Darmdach gibt es ein rechtwinklig aufgebautes Nervengeflecht (Abb. 4B).

Das Nervensystem von *Platynereis dumerilii* ist nach dem „Strickleiter“-Muster segmental aufgebaut. Im jungen vier-segmentigen Wurm besteht das Nervensystem aus einem zweilappigen Cerebralganglion im Protostomium und dem ventralen Nervenstrang oder Bauchmark. Dieser ist paarig aufgebaut und zieht bis in die Analcirren (Abb. 5A und 6A). Das Exkretionssystem von *Platynereis dumerilii* besteht in der postlarvalen Entwicklungsphase aus paarig angeordneten Metanephridien. Diese gliedern sich in ein bewimpertes Nephrostom und einem Nephridialkanal, der in einen Nephridioporus nach außen mündet. Zu Beginn des postlarvalen Wachstums besitzt der Wurm ein Paar Metanephridien im 3. Deutomer (Abb. 5A/B). Der Nephridioporus befindet sich an der lateralen ventralen Parapodialbasis. REM Aufnahmen zeigen jedoch, dass in dieser Region keine cuticuläre Öffnung sichtbar ist (s. Diskussion).

Der Nephridialkanal zieht vom Nephridioporus über mehrere Windungen zunächst in dorsale Richtung und dann in Höhe des ventralen Nervenstranges in anteriore Richtung. Kurz vor Erreichen des Dissepiments zieht der Kanal wieder in dorsale Richtung und öffnet im Nephrostom. Damit ist die Ausrichtung und Position des Nephrostoms dorsal und deutlich über dem ventralen Nervenstrang (Abb. 5B). Am zweiten Tritomer befindet sich das nächste Nephridien-Paar. Dabei unterscheidet sich die Position und Größe des Metanephridiums vom deutomeren Nephridien-Paar (Abb. 5B). Das Nephrostom ist deutlich vom Nephridialkanal abgesetzt und anterior ausgerichtet. Zudem befindet es sich auf Höhe des ventralen Nervenstranges. Dieser Aufbau findet sich auch bei allen nachfolgenden Tritomeren. Bei subadulten Tieren hat die Größe des Nephrostoms deutlich zugenommen (Abb. 5C). Einzelne Wimpern des Nephrostoms sind erkennbar, und die Länge des Nephridialkanals ist mit dem Segment gewachsen. Die ventrolaterale Lage hat sich im Vergleich zum Nephridialpaar des 1. Tritomers nicht verändert (Abb. 5D).

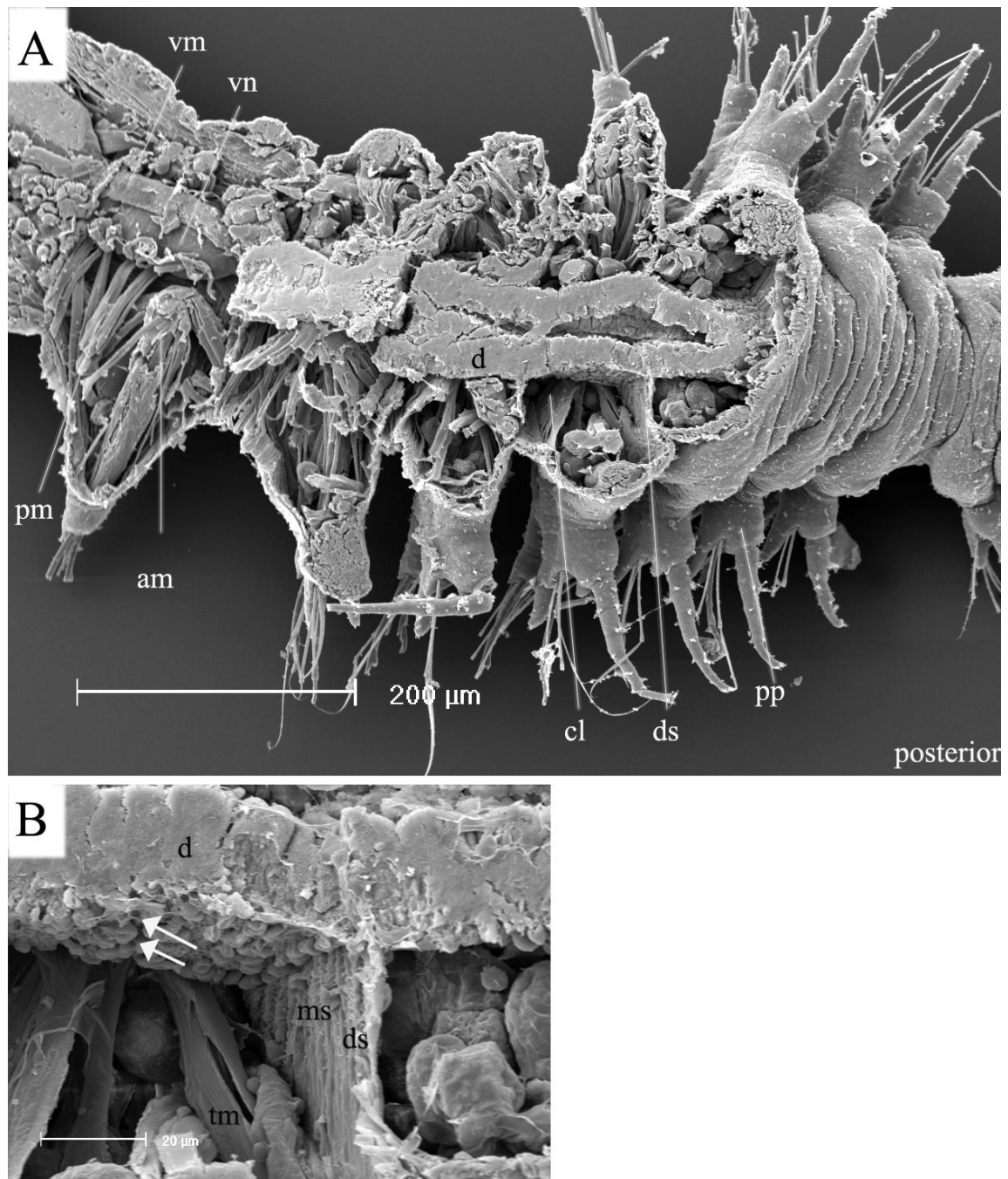


Abbildung 3

Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der inneren Rumpforanen eines ca. 40-segmentigen Wurmes.

A: Übersicht der Coelomraumverhältnisse und der Oberflächenstruktur verschiedener Muskeln in mehreren Segmenten. Die Acicularmuskeln (am) inserieren am Dissepiment und am proximalen Ende des Aciculum. **B:** Die Dissepimente werden von gestreckten Muskelbändern (ms) bedeckt (ms). Im Gegensatz dazu sind die Muskeln auf der Darmwand (Doppelpfeil) zu mit deren cytoplasmatischen Zellkörper gut erkennbar. Transversale Parapodialmuskeln (tm) ziehen von der ventralen Darmwand zur distalen Parapodialwand (pm) durch den Coelomraum. Acicularmuskeln (am) Coelom (cl). Dissepiment (ds), Mitteldarm (d), Muskelbändern (ms), ventraler Muskelstrang (vm), ventraler Nervenstrang (vn), Parapodium (pp).

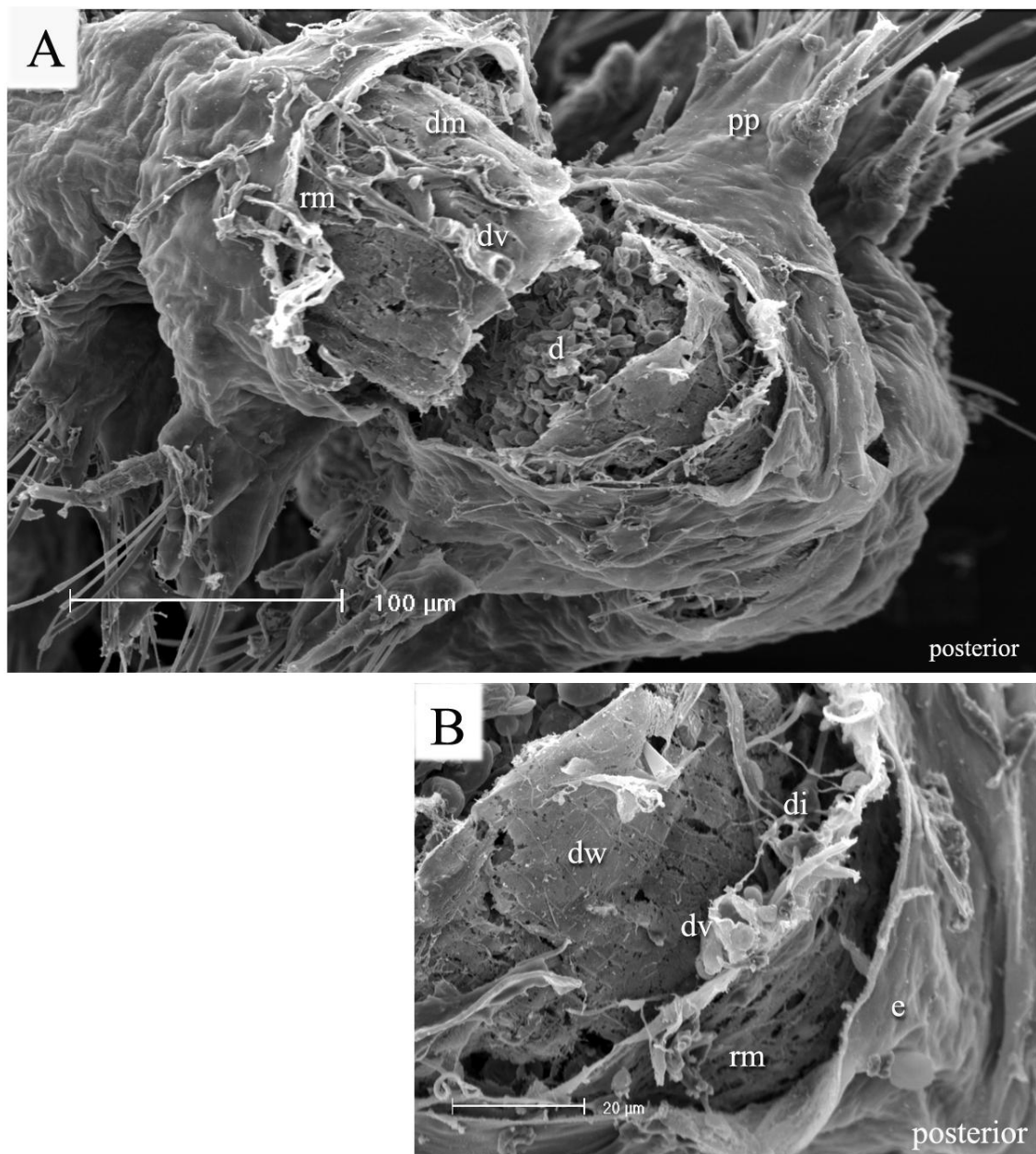


Abbildung 4

REM Aufnahmen der dorsalen inneren Organen.

A: Dorsalseite mit geöffneter Epidermis und Darmwand (dm). Das Dorsalgefäß (dv) verläuft median und wird von dorsalen Längsmuskelstreifen flankiert (Pfeile). **B:** In dorsale Richtung wird der Coelomraum von einer Ringmuskelschicht (rm) gegen die Epidermis (e) abgegrenzt. Nervenzellen und Nervenstränge finden sich unterhalb der Ringmuskeln und als feines Nervennetz auf der Darmwand (dw). Darmwand (dw), Dorsalgefäß (dv), Dorsointestinalgefäße (di), Epidermis (e), Nervennetz (nb1), Ringmuskelschicht (rm)

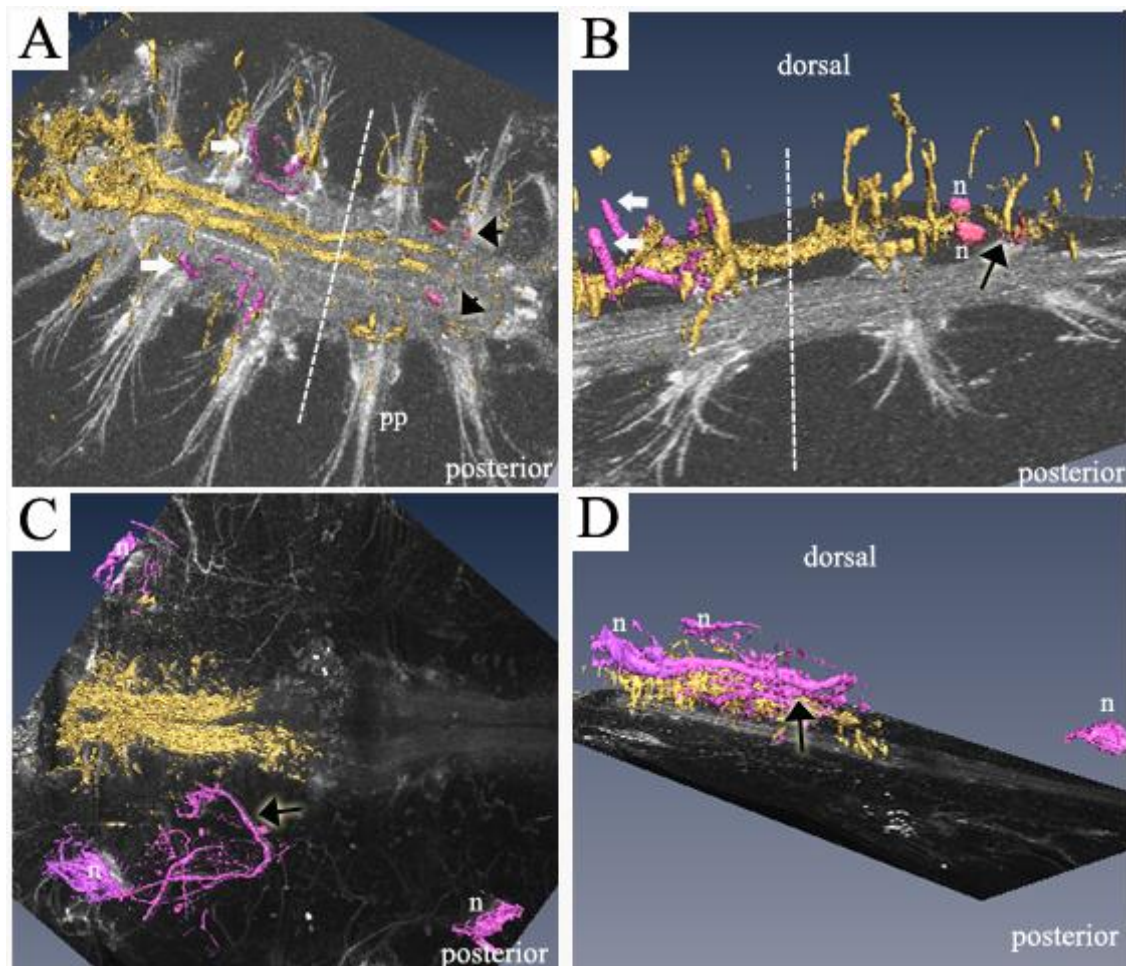


Abbildung 5

3D Rekonstruktionen von KLSM Bildserien nach Tubulin Markierung in postlarvalen Stadium von *Platynereis dumerilii*.

A-B: 5-segmentiger Jungwurm. **A:** dorsale Aufsicht, die ventralen Nervenstränge (gelb) ziehen beidseits des Körpers von posterior zum Prostomium in das Cerebralganglion. Metanephridien (violett) sind paarweise im dritten (weiße Pfeile) und im fünften Segment (schwarze Pfeile) zu finden. Im fünften Segment durchstoßen sie mit den Nephrostomen die Segmentgrenze zum dritten Segment. Die gestrichelte Linie trennt Deutomere von Tritomeren. **B:** Lateralsicht, die Nephrostome des Nephridienpaares im 3. Segment (weiße Pfeile) befinden sich deutlich dorsal über den ventralen Nervenstrang und unterscheiden sich in Größe und Form nicht vom Nephridialkanal. Die Nephrostome (n) des zweiten Paares sind dagegen deutlich vom Nephridialkanal abgesetzt (schwarze Pfeile) und befinden sich auf Höhe des ventralen Nervenstranges. **C-D:** Ausschnitt aus einem subadulten Rumpfsegment. **C:** Dorsale Aufsicht; Nephrostome (n) und Nephridialkanal (Pfeil) sind deutlich größer als in A und B und einzelne Wimpern des Nephrostoms sind voneinander unterscheidbar. **D:** Lateralsicht; Nephrostome (n) und Nephridialkanal (Pfeil) befinden sich auf Höhe des ventralen Nervenstranges.

3.1.2 Entwicklungsprozesse in Regeneraten

Bisher wurden äußere und innere segmentale Strukturen in der Normalentwicklung beschrieben. Der folgende Abschnitt soll die Morphogenese der Segmente in der Regeneration behandeln.

Aus Studien von Hofmann (1966) ist bekannt, dass *Platynereis* Pygidium und Proliferationszone ersetzen kann, und dass die Regenerationsgeschwindigkeit vom Alter und der Position der Amputationsstelle abhängig ist. Daher wurden Tiere aus verschiedenen postlarvalen Stadien ausgewählt und caudale Körpersegmente amputiert. Bei Tieren mit bis zu 20 Segmenten bei der Amputation war die Regeneration nach der Bildung von 2-3 neuen Segmentanlagen abgeschlossen und das normale Wachstum setzte wieder ein. Um die Entwicklung von möglichst vielen Segmenten in verschiedenen Stadien zu analysieren, wurden Tiere mit ca. 50 Segmenten für die weitere Analyse der Regeneration herangezogen (diese Tiere regenerierten bis zu 15 Segmente innerhalb von zwei Wochen). Amputationen wurden an drei unterschiedlichen Segmentpositionen, posterior vom zehnten, 15. und 20. Segment durchgeführt. Die Mortalität lag in der ersten Gruppe bei 80-90%, während beim zweiten und dritten Ansatz bei entsprechender Behandlung (s. Material und Methoden) fast alle Tiere überlebten.

Da die Regenerationsgeschwindigkeiten beim zweiten und dritten Ansatz nicht zu unterscheiden war, erfolgten alle folgenden Untersuchungen mit Tieren, die hinter dem 15. Segment amputiert worden waren. Analog zum postlarvalen Wachstum ist auch hier die Geschwindigkeit der Regeneration individuell verschieden. Bei der Amputation hinter dem 15. Segment dauerte die Regeneration ein bis drei Wochen. Insbesondere der Zeitraum zwischen der Amputation und der Bildung von neuem Pygidium mit einer PZ variierte in einem Rahmen von zwei bis acht Tagen. Im Nachfolgenden sollen die Phasen der Regeneration analysiert werden.

3.1.2.1 Wundverschluss

Unmittelbar nach der Amputation wird die Wunde provisorisch durch die partielle Ausstülpung des Darmes verschlossen (Abb. 6A). Dabei kann die Ausstülpung des Darmes in unterschiedlichen Formen auftreten, dennoch kommt in jedem Fall der Darm mit der Epidermis in Berührung (Abb. 6A und D). Der Darm wird mit ca. einer Segmentlänge ausgestülpt und das Darmepithel so umgestülpt, dass die Wunde zunächst

geschlossen wird. Eine andere Möglichkeit des Wundverschlusses ist die Kontraktion der Ringmuskeln unmittelbar anterior der Amputationsstelle, so dass der Darm so zusammengepresst wird, dass innere Bereiche des Darmes ausstülpfen und so die Wunde ebenfalls geschlossen wird. In diesem Falle ist der Wundverschluss bereits nach ca. 24-30 h zu beobachten. Ist der Darm ausgestülpt worden, kann sich diese Zeit auch bis zu 48 h verlängern. Bei schrägen Anschnitten kann der Wundverschluss sogar bis zu 80 h dauern. Im Zuge der Wundheilung wird der Darm langsam wieder eingezogen, und gleichzeitig ein Gerüst von Zellfortsätzen im ringförmigen Wundbereich aufgebaut (Abb. 7A-D). Die Kontaktstelle zwischen Darm und Epidermis wird von einzelnen ca. 12 µm großen Zellen ausgefüllt. Diese Zellansammlungen werden über lange Fortsätze miteinander verbunden. Diese Zellfortsätze treten auch mit dem angrenzenden Darm und der Epidermis in Kontakt. Dadurch bildet sich ein gerüstartiges Konstrukt im Wundbereich aus.

20-24 h nach Amputation haben sich um den langsam zurückziehenden Darm eine Reihe von beulenartigen Strukturen gebildet (Abb. 7C). Die Größe der Strukturen variiert von 25-50 µm, und sie bestehen aus einer Ansammlung von dicht gepackten Zellen (Abb. 7D). Die Cuticula in diesem Bereich entspricht der im Abschnitt Segmentoberflächen beschriebenen Oberflächenstrukturen. Das oben beschriebene Zellgerüst im Wundbereich ist deutlich erweitert und vergrößert worden. Zu diesem fortgeschrittenen Zeitpunkt ist diese Struktur mehrere Zelldiameter breit und die Zellfortsätze zu einer weitgehenden homogenen Masse verschmolzen (Abb. 7D). Der Darm ist während des gesamten Wundheilungsprozesses geöffnet.

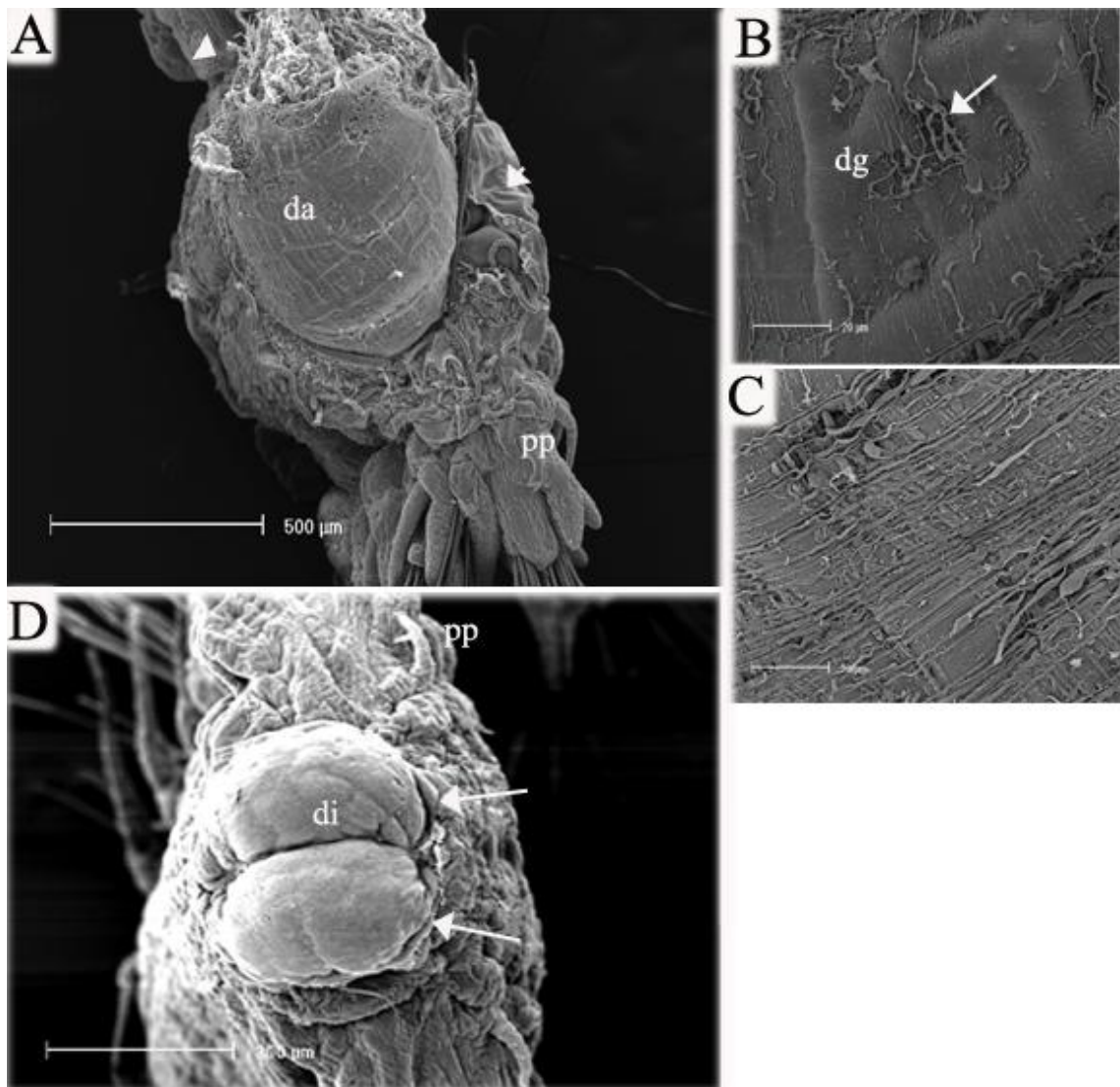


Abbildung 6

Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen unmittelbar nach der caudalen Amputation.

A: posteriore Ansicht, Die Schnittkante verläuft an der Segmentgrenze mit großen Verletzungen des Stumpfes (Pfeil). Der Darm (da) ist teilweise ausgestülpt und schließt damit die Wunde. **B-C:** Detailaufnahmen der Darmwand; Die Gefäßwände in der Darmwand sind stark erweitert (dg), degradierte Muskelfasern (Pfeile) sind in der Nähe der Schnittwunde zu finden (B), während die Muskelfasern unmittelbar vor dem Stumpf noch intakt und stark gestreckt sind (C). **D:** posteriore Ansicht. Apikale Bereiche des Darm (g) quellen aus der Schnittebene hervor und bedecken so die Wunde. Die Schnittkante lässt den Stumpf weitgehend unverletzt (Pfeile).

Parapodien (pp)

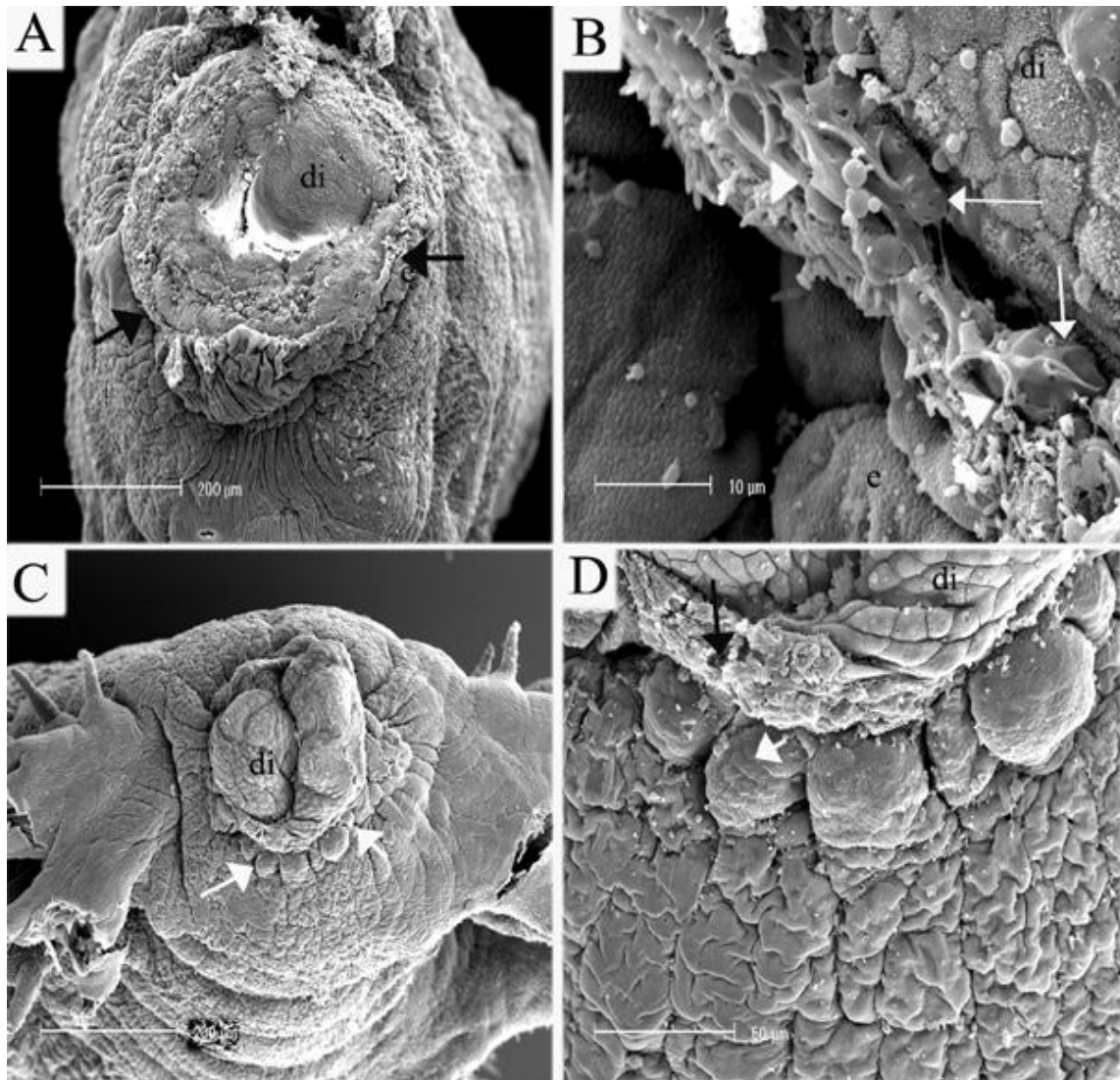


Abbildung 7

Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen 10 h-24 h nach der Amputation.

A: posteriore Ansicht 10 h nach der Amputation, Darminnenseite (di) und Teile der Epidermis stehen im Bereich der Wundstelle in direktem Kontakt (Schwarze Pfeile). **B:** Detailaufnahme aus dem Wundbereich; Zwischen Darminnenseite (di) und Epidermis (ep) befinden sich verschiedene Zellkörper (weiße Pfeile) mit Filopodien (schwarzer Pfeil), die miteinander, der angrenzenden Epidermis (e) und der Darminnenseite (di) verknüpft sind.

C: Posteriore Ansicht; 24 h nach der Amputation sind Teile des Darmbereiches (di) im Wundbereich zu finden. Der Wundbereich wird flankiert von knospenartigen Strukturen (weiße Pfeile). **D:** Detailaufnahme aus dem Wundbereich; zwischen Darm (di) und den (in C beschriebenen) Knospen hat sich der (in B beschriebene) Kontaktbereich stark erweitert und überzieht Teile des nach außen stehenden Darmes (schwarzer Pfeil). Die Knospen bestehen aus mehreren vertikal angeordneten Zellreihen (weißer Pfeil)

3.1.2.2 Wachstums- und Differenzierungsprozesse

Nach Abschluss der Wundheilung wird der Darm vollständig in den Stumpf zurückgezogen und die Zellansammlungen um den Wundbereich sind verschwunden. Ventral und dorsal ziehen Zellreihen radiär vom Anus in anteriorer Richtung (Abb. 8A). Die ventrale Seite zeigt einen schmalen Spalt, der vom Anus in anteriore Richtung zieht.

In einem Zeitraum von etwa drei Tagen nach der Amputation sind die Analcirrenanlagen und ein deutlich vom Stumpf hervorgehobener Bereich zu erkennen. Die oben beschriebenen Zellreihen sind nur noch unmittelbar an der Afteröffnung und einige Zelldiameter davon entfernt zu erkennen. Es folgt ein nicht differenzierter Bereich, welcher aus einer Ansammlung von unterschiedlich großen Zellen besteht. Ventral und dorsal verbindet sich dieses Gewebe mit dem Stumpf übergangslos. Die lateralen Bereiche sind jedoch deutlich abgesetzt. Einzelne Segmentanlagen sind innerhalb dieses Gewebes nicht zu erkennen.

Ca. vier Tage nach der Amputation sind deutlich abgegrenzte Bereiche innerhalb des Regenerates zu erkennen. Zwischen den Analcirren ist nun eine Vertiefung zu erkennen, die sich über das gesamte ventrale Regenerat ausbreitet und mit der ventralen Mittellinie des Stumpfes verbindet. Unmittelbar anterior zum Pygidium befindet sich ein dünnes Band von Zellen. Alle zu erkennenden Zellen innerhalb, aber auch unmittelbar anterior dieser Linie besitzen die gleiche Größe. Diese Zelllinie ist die neue Proliferationszone (PZ). Zu diesem Zeitpunkt lassen sich jedoch nicht eindeutig einzelne Segmentanlagen identifizieren.

Die Oberfläche des Regenerates unterscheidet sich von der des Stumpfes. Es fehlen die in 3.1.1.2 beschriebenen Cuticularstrukturen. Eindeutige Segmentanlagen, lassen sich etwa viereinhalb Tage nach der Amputation erkennen (Abb. 8B und C). Die einzelnen Segmentanlagen sind durch schmale Spalten voneinander getrennt. Die Größe der Segmentanlage variiert in Abhängigkeit von Position und Alter. Dabei ist die erste, also die älteste, Segmentanlage nahezu doppelt so breit, wie die folgende Anlage. Das setzt sich bis zur jüngsten, unmittelbar der PZ angrenzenden Segmentanlage fort. Innerhalb der einzelnen Segmentanlagen lassen sich Zellmuster feststellen. So sind abgegrenzte Zellareale deutlich vorhanden. Zum einen gibt es ganze Zellreihen, die sich von posterior nach anterior (longitudinal) orientieren und zum anderen aber auch vertikal angeordnete Reihen. Im Vergleich zu den großen Zellverbänden im Pygidium und den

neuen Segmentanlagen ist die PZ unverändert ein dünnes Zellband geblieben. Deutlich erkennbar sind Zellreihen in anteriorer Richtung (Abb. 8C). Die Oberfläche der Segmentanlagen ist im Vergleich zum Stumpf glatt und entspricht damit den zuvor beschriebenen vier Tage alten Regeneraten. Auf der ventralen Mittellinie lassen sich gehäuft große Porenöffnungen erkennen (Abb. 8D).

Die histologischen Befunde zeigen einen deutlichen Unterschied zwischen der Gewebeorganisation im Stumpf und dem neugebildetem Gewebe. Im Stumpf ist die Epidermis von einer deutlich lichtmikroskopisch sichtbaren Cuticula nach außen hin abgegrenzt (Abb. 9B). Die Cuticula ist im Stumpf 2-4 μm dick und im elektronenmikroskopischen Bild wird sie von alternierenden Längs- und Querfasern durchzogen. Mikrovilli durchziehen die Cuticula außerdem von distal der angrenzenden Epidermis-seite bis zur Außenseite hin. In den apikalen Bereichen der Cuticula sind keine Längs- und Querfasern mehr zu erkennen. Dieser Bereich wird als Epicuticula bezeichnet und weist faltenartige Abgrenzungen nach außen auf, die in Größe und Häufigkeit mit den Wölbungen auf SEM Bildern übereinstimmen (3.1.1.2).

Im drei Tage alten Regenerationsblastem hingegen ist die Cuticula dünner (etwa 1 μm), und die oben erwähnten Faserstrukturen sind nicht erkennbar. Ein weiterer Unterschied sind die großen Freiräume zwischen Epidermis und Cuticula. Dort und in der angrenzenden Epidermis sind viele Vesikel erkennbar. Regenerierende Cuticula besitzt im Gegensatz zur Stumpfcuticula eine sehr unregelmäßig geformte Oberfläche. Auch die Epidermis im Regenerat unterscheidet sich von der Epidermis im Stumpf. Zum einen sind in den Zellen des Regenerates zahlreiche Vesikel erkennbar, zum andern finden sich große Vakuolen und Interzellularräume zwischen den epidermalen Zellen. Im Stumpf grenzen Ringmuskelschicht und Längsmuskelstränge an die Epidermis. Im Unterschied dazu sind unter der Epidermis im neuen Blastem viele kleine Zellen sichtbar, die sich z.T. in der Mitose befinden (Abb. 9C). Die inneren Bereiche des Blastems lassen keine geordneten Strukturen oder Gewebe erkennen. Im Unterschied zu späteren Regenerationsphasen (siehe folgendes Kapitel) sind weder Segmentanlagen, noch geordnete Zellformationen vorhanden. Kennzeichen von frühen Regeneraten sind undifferenzierte Zellen, die sich ungeordnet im gesamten Blastem befinden. Daneben gibt es kleine Bereiche mit Muskelabbauprodukten oder nekrotischem Material. Auffällig ist der Übergangsbereich zwischen Stumpf und Regenerationsblastem. Dort gibt es eine große Ansammlung von Muskel und vermutlich anderen Zell oder Produkten aus Abbau von Organen (Abb. 9A).

Fünf Tage nach der Amputation treten erste äußerlich erkennbare Differenzierungen der Segmente auf (Abb. 10A). Das Regenerat besteht aus ca. sechs Segmentanlagen, die nun in Größe, Breite und Differenzierungsgrad voneinander zu unterscheiden sind. Die erste Segmentanlage besitzt nun ein Paar zweigeteilte-, die zweite ein Paar einfache ventrolaterale Ausbuchtungen. Diese Parapodialanlagen sind auf den nachfolgenden Segmentanlagen nicht zu finden. Die dritte, vierte und fünfte Segmentanlage sind jeweils nur durch eine dünne Einfaltung der Epidermis bzw. der Cuticula voneinander getrennt. Die sechste befindet sich unmittelbar vor der PZ und besitzt keine eindeutigen Abgrenzungen zur PZ (Abb. 10B). Sechs Tage nach dem Wundverschluss besitzt das Regenerat neun bis zehn Segmentanlagen, woran man die gesamten Entwicklungsstufen der Parapodien beobachten kann (Abb. 10C). Die ältesten Segmentanlagen des Regenerates besitzen im Wesentlichen alle Parapodialstrukturen und unterscheiden sich nur in der Größe voneinander. Die fünfte Segmentanlage besitzt Borsten an der Außenfläche der Parapodialanlage. Bei der sechsten Anlage sind die Borsten kurz nach dem Auswachsen durch die Außenwand zu sehen, während die siebte Segmentanlage nur zweigeteilte ventrolaterale Ausknospungen zeigt. Die achte Segmentanlage besitzt eine einfache Ausknospung und die neunte und zehnte keine sichtbaren Differenzierungen. Darüber hinaus besitzt das Regenerat nun eine strukturierte Cuticulaoberfläche, die sich nicht mehr von der Oberfläche des Stumpfes unterscheidet. Die PZ ist klar als einzelliges Zellband unmittelbar vor dem Pygidium erkennbar (Abb. 10D). Vom Anus über das Pygidium und die PZ führen symmetrisch angeordnete Furchen in anteriore Richtung. Diese setzen sich in den anschließenden jüngsten Segmentanlagen fort und verbreitern sich. In den jüngsten Segmentanlagen lässt sich auch die frühe Parapodialentwicklung beobachten. Die ventrolateralen Ausknospungen sind aus übereinander angeordneten Zellschichten aufgebaut. Mit voranschreitender Segmententwicklung werden zunächst pyramidenförmig neue Zellen aufgesetzt und anschließend verbreitert (Abb. 10D). 14 Tage nach der Amputation besitzt der Wurm 14 neue Segmente (Abb. 11A). Die ersten 13 Segmente sind ausdifferenziert, besitzen also voll entwickelte Parapodien. Trotzdem unterscheiden sich die neuen Segmente entsprechend ihrer Lage in ihrer Größe voneinander. Dementsprechend besitzt das erste neue Segment die größten Parapodien und den breitesten Rumpf, ohne aber die Größe der Stumpfes zu erreichen. Nur die jüngste, also die 14. Segmentanlage zeigt keine sichtbaren Differenzierungen. Damit unterscheidet sie sich deutlich von der 13. Segmentanlage, die vollständige Parapodienstrukturen besitzt. Damit ist die

Wachstumszone wieder so groß, wie in der Normalentwicklung. Tatsächlich ist ab diesem Zeitpunkt die Regeneration beendet und die Segmente wachsen wieder im postlarvalen Modus aus (siehe Kapitel 2.1).

Bei schrägen Anschnitten zur Längsachse des Tieres, wachsen die linke und die rechte Seite unterschiedlich schnell aus. Dabei wird die unverletzte, gesunde Seite nicht „eingeschmolzen“, sondern bleibt bestehen. Die Seite mit dem noch unverletzten Segment entwickelt sich in der Regel langsamer, als die gegenüberliegende. Diese asynchrone Wachstumsgeschwindigkeit gleicht sich normalerweise im Verlauf der Regeneration wieder aneinander an. In einzelnen Fällen kam es jedoch dazu, dass sich diese Asynchronität nicht nur in der Wachstumsgeschwindigkeit äußerte sondern auch im Fehlen von Parapodialstrukturen. Dabei kann es dazu kommen, dass eine Seite voll ausdifferenzierte Parapodialstrukturen besitzt, während die andere nur einfache Ausbuchtungen aufweist (Abb. 11B). Auch innere Strukturen wie Metanephridien sind von diesen asynchronen Wachstumsvorgängen betroffen, was im nächsten Kapitel behandelt wird.

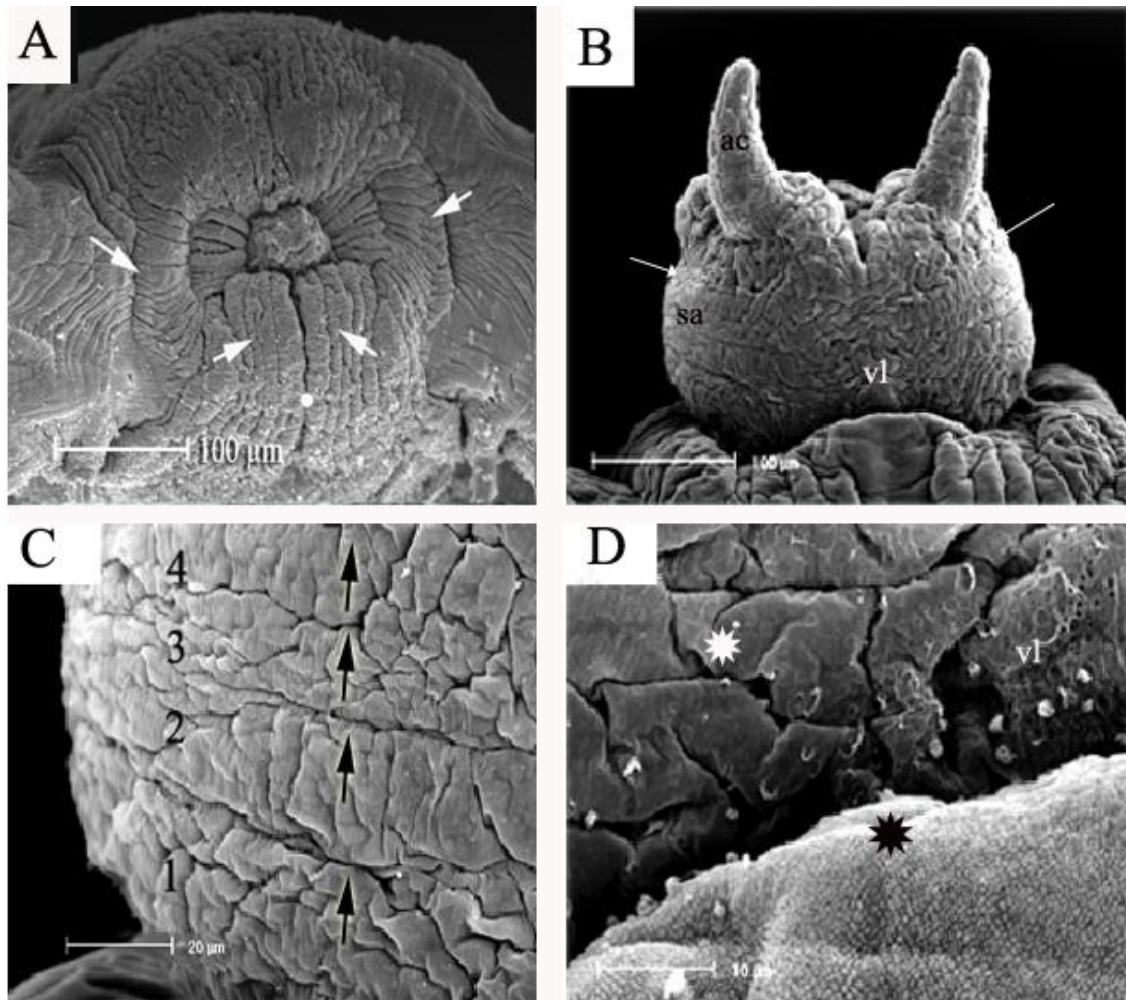


Abbildung 8

Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von 2-4 Tage alten Regeneraten.

A: posteriore Ansicht: 2 Tage nach Amputation ist die Wunde geschlossen und um den Darmausgang sind vertikale Zellreihen zu erkennen (weiße Pfeile), ventral zieht ein Spalt vom Darmausgang in posteriore Richtung (weißer Punkt) **B:** ventrale Ansicht eines 4 Tage alten Regenerates mit 4 Segmentanlagen (sa), ventraler Mittellinie (vl) und einer als dünne Zelllinie erkennbaren Proliferationszone (weiße Pfeile). **C:** Detailaufnahme der Segmentanlagen (posterior=oben): Das Wachstum verläuft sukzessiv, die älteste Segmentanlage (1) ist deutlich breiter als die folgenden (2-4). Die Segmentgrenzen (Pfeile) sind ebenfalls zwischen der Segmentanlage (1) und (2) am deutlichsten ausgeprägt. Während einheitlich geordnete dicht gepackte Zellpakete in (4) zu finden sind, besitzen weiter entwickelte Segmentanlagen unterschiedlich eng gepackte Zellanordnungen, erkennbar an den Einfaltungen der Cuticula. Die Segmentanlage (1) besitzt an der posterioren Grenze kleinere Zellen die in zwei horizontal verlaufenden Reihen aufeinander folgen, während an der anterioren Grenze deutlich größere Zellpakete in vertikalen Reihen zu finden sind (schwarzer Pfeil) **D:** Detailaufnahme des Übergangs zwischen Regenerationszone und altem Segment. Deutlich erkennbare cuticuläre Strukturen wie auf dem Stumpf (schwarzer Stern) fehlen den neuen Segmentanlagen (weißer Stern).

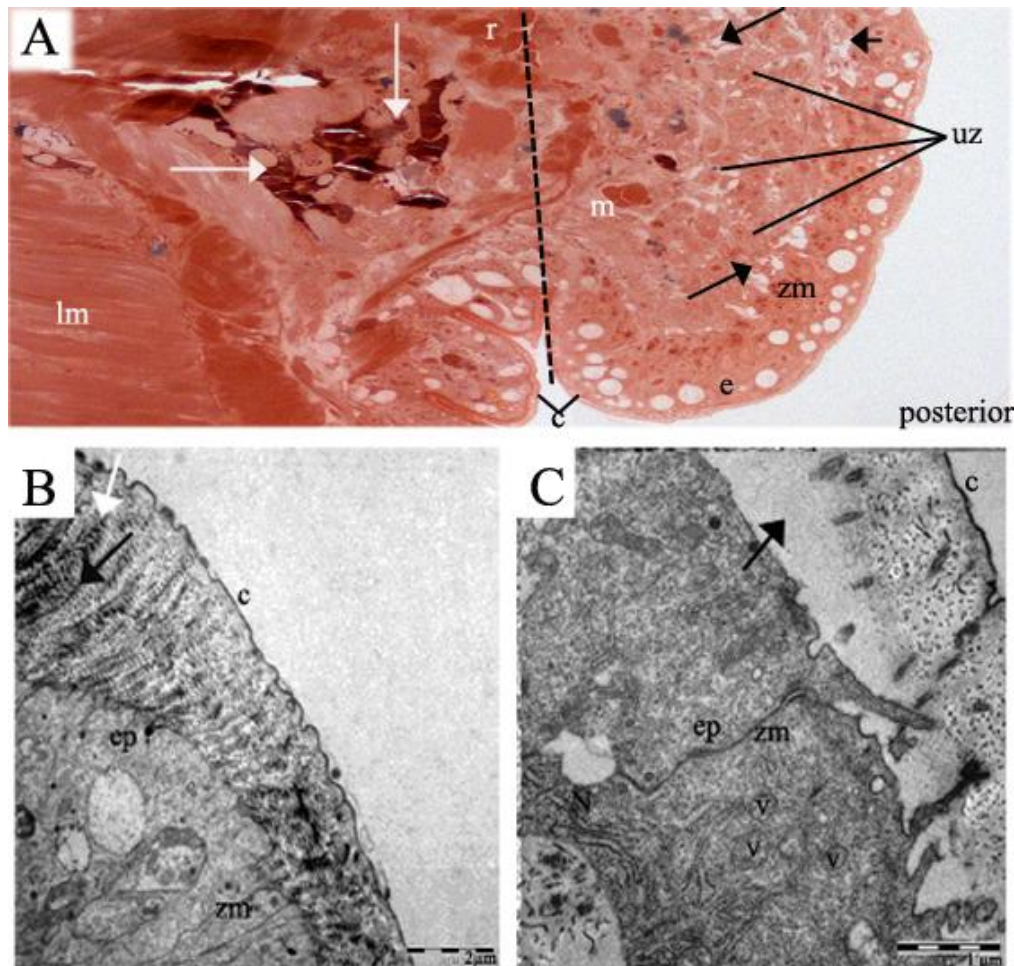


Abbildung 9

LM-Aufnahmen eines Semidünnschnittes und TEM-Aufnahmen von Dünnschnitten der posterioren Region eines 3-Tage alten Regenerates (Längsschnitt, Safranin Anfärbung)

A: Übersicht der posterioren Region; Anterior der Amputationsstelle (gestrichelte Linie) befindet sich stark degeneriertes Gewebe (weiße Pfeile). Flankiert wird diese Region von Ringmuskeln (r), anterior befindet sich der Stumpf mit einer Längsmuskelschicht (lm). Posterior der Amputationsstelle (gestrichelte Linie) befindet sich das Regenerationsblastem, welches gekennzeichnet ist durch viele undifferenzierte Zellen (uz), entstehenden Muskelzellen (m) und großen Interzellularbereichen (schwarze Pfeile). Die epidermale Schicht (e) im Regenerationsblastem besteht aus kleinen Zellen die sich in Mitose befinden. Die Cuticula (c) ist posterior der Amputationsstelle (gestrichelte Linie) im Vergleich zur Stumpf Cuticula (anterior der Amputationsstelle) nur eine dünne Schicht.

B: TEM Aufnahmen der Cuticularstruktur im Stumpf: Die Cuticula (c) setzt direkt an der Epidermis (ep) an und besteht aus alternierenden Quer- (schwarzer Pfeil) und Längsfasern (weißer Pfeil). Am distalen Rand wird die Cuticula durch wellenartige Falten begrenzt. Die Dicke der Cuticula beträgt 2-4 μm

C: Regenerat Cuticula: Zwischen Cuticula (c) und Epidermis (es) sind große Lücken im Gewebe vorhanden (Pfeil). In der Epidermis gibt es gut sichtbare Golgi Apparate mit vielen Vesikeln (v). Die Cuticula befindet sich noch im Aufbau, dementsprechend gibt es die in B beschriebenen Faserstrukturen nicht. Die Dicke der Cuticula beträgt 0,5-1 μm .

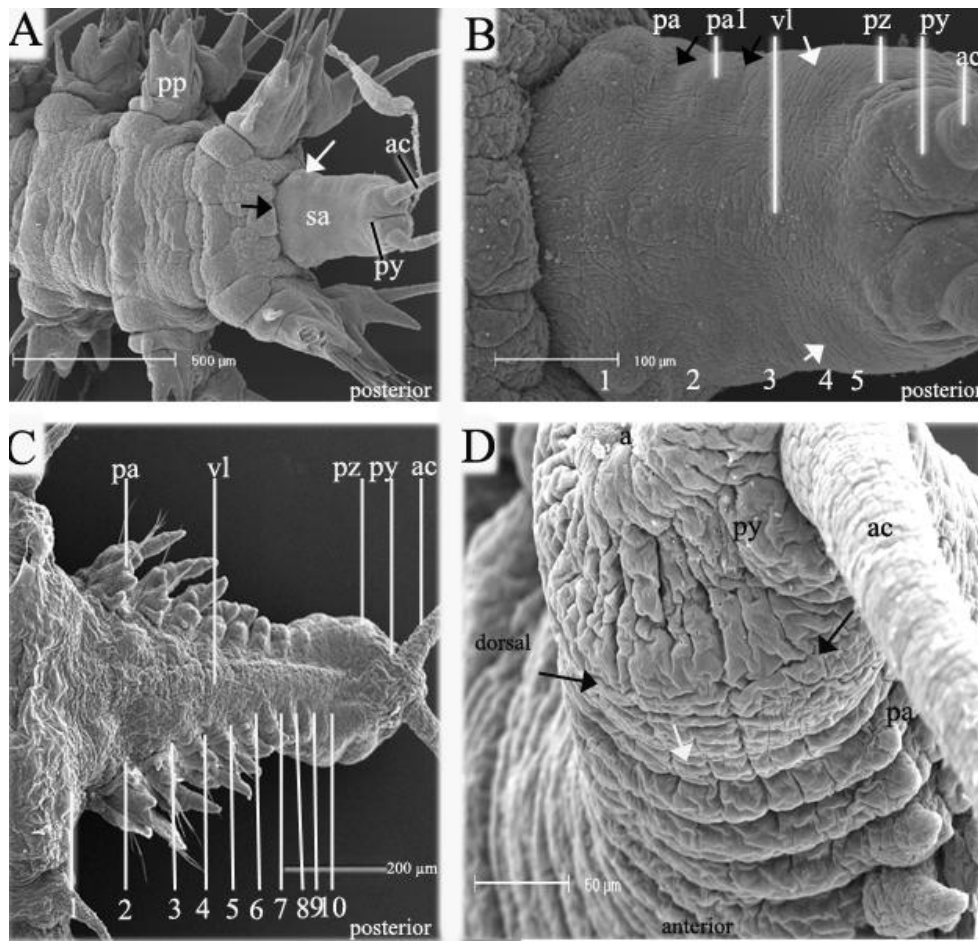


Abbildung 10

Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von 5-8 Tage alten Regeneraten.

A: ventrale Ansicht eines 5 Tage alten Regenerats. Die Regenerationszone ist deutlich vom Stumpf abgegrenzt (schwarzer Pfeil), Pygidium (py) und Analcirren (ac) sind im Vergleich zu früheren Regenerationsstadien deutlich (ca. 80 – 90 µm) verlängert. Die Segmentanlagen (sa) zeigen erste Differenzierungsmerkmale (weißer Pfeil) **B:** Detailansicht der Segmentanlagen. Die älteste Segmentanlage (1) besitzt lateral zwei geteilte Ausknospungen, Parapodialanlagen (pa). Die darauf folgende SA (3) besitzt nur eine einfache Ausbuchtung (pa1). Die Segmentanlagen 3, 4, 5 und 6 (direkt neben der PZ) unterscheiden sich nur in ihrer Größe voneinander. **C:** ventrale Ansicht 8 Tage altes Regenerat mit 10 Segmentanlagen (1-10). Die Parapodialanlagen (pa) spiegeln den Differenzierungsgrad der Segmentanlagen wider. Auf 1, 2 und 3 sind ventral Cirren zu sehen, während bei 4 und 5 erste Borsten die Körperwand durchstoßen, 6 und 7 besitzen zwei geteilte Ausbuchtungen, 8 und 9 einfache Ausbuchtungen und 10 keine sichtbaren Differenzierungen. Zwischen den lateralen Parapodialanlagen zieht die ventrale Mittellinie (vl), zudem gibt es keine sichtbare Trennung zum Stumpf. **D:** dorsolaterale Ansicht eines 8 Tage alten Regenerats. Die Proliferationszone (schwarzer Pfeil) ist deutlich vom Pygidium (py) abgesetzt. Anterior setzen sich Zellreihen über mehrere Segmente hinweg fort (weiße Pfeile) Frühe Parapodialanlagen (pa) sind aus aufgesetzten Zellreihen aufgebaut Parapodien (pp), Analcirren (ac), Anus (a).

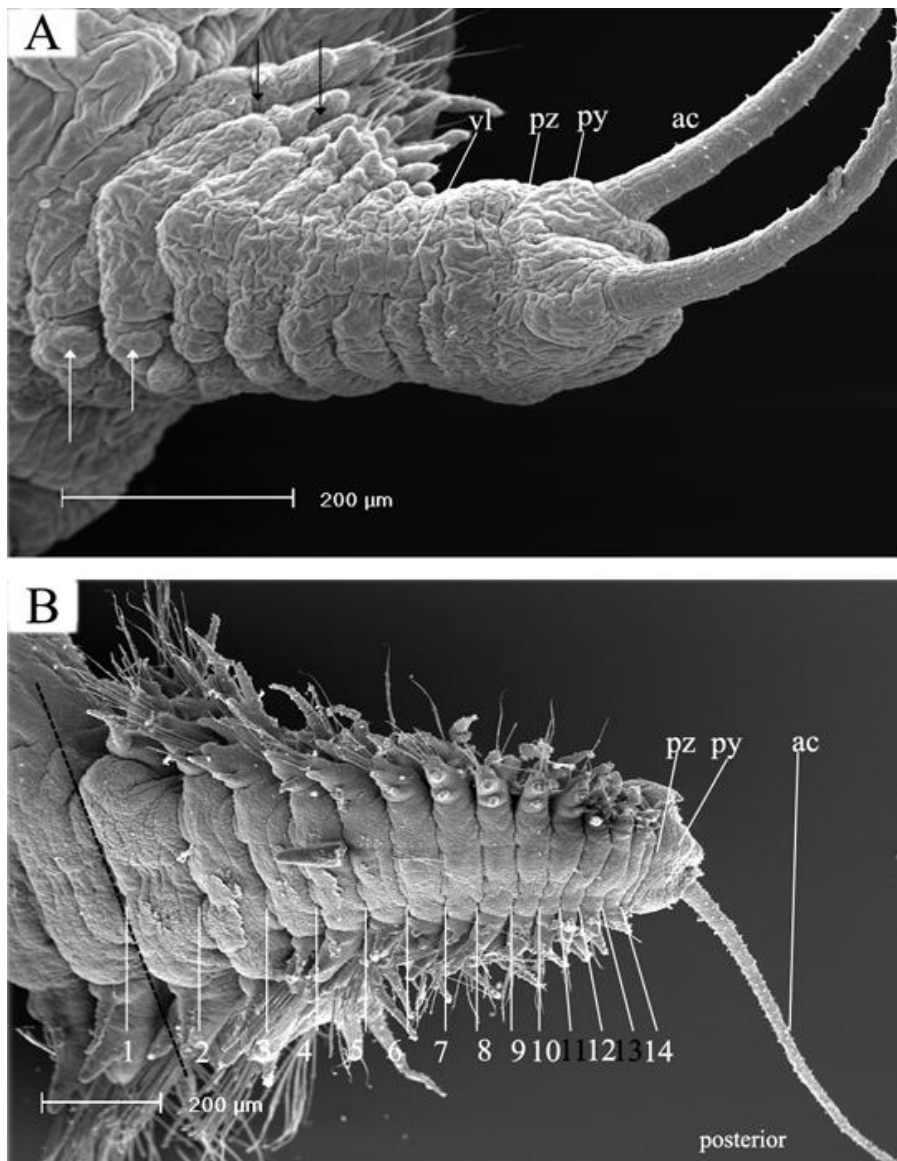


Abbildung 11

Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von 8-14 Tage alten Regeneraten.

A: dorsal Ansicht eines 8 Tage alten asynchronen Regenerates. Während eine Seite normal entwickelte Parapodialanlagen besitzt (schwarze Pfeile), fehlen diese fast vollständig auf der gegenüberliegenden Seite (weiße Pfeile). Pygidium (py), Analcirren (ac) und ventrale Mittellinie sind normal entwickelt. Amputationsstelle: gestrichelte Linie neu entstandenes Segment (NS) Parapodialanlagen (pa) Proliferationszone (pz) Pygidium (py) ventrale Mittellinie (vl), **B:** dorsale Ansicht eines 14 Tage alten Regenerates. Die Parapodien im Stumpf (anterior der gestrichelten Linie)) sind größer als die Parapodialstrukturen der neu entstandenen Segmentes (NS). Diese unterscheiden sich zwar in der Größe, nicht aber im Differenzierungsgrad. Einzig die unmittelbar anterior zur Proliferationszone (pz) liegende Segmentanlage (schwarzer Pfeil) weist kein vollständig ausdifferenziertes Parapodium auf.

3.1.2.3 Nephridienentwicklung in Regeneraten

Da die Entwicklungsvorgänge während der Regeneration rasch verlaufen und mehrere Segmentanlagen mit unterschiedlich weit entwickelten Segmentstrukturen vorgefunden werden, lässt sich hier ein großer Teil der Metanephridialentwicklung verfolgen. Nephridialstrukturen tauchen während der Regeneration erst mit dem Beginn von sichtbaren Parapodialdifferenzierungen auf. Nephridioporus und Nephridialkanal befinden sich ventral an der Parapodialbasis. (Abb. 12A/B). Das Nephrostom befindet sich an der posterioren Grenze des Segmentes, der Nephridialkanal zieht durch das Dissepiment in das posteriore Segment. Die Nephridialentwicklung in Regeneraten entspricht dem postlarvalen Typus. Das Nephrostom wird im Zuge des Nephridialwachstums länger (Abb. 12C/D) und bleibt während seiner gesamten Entwicklung ventral in der Nähe des Bauchmarks. Im Regenerat kann es abhängig von der Art der Verletzung zu asynchronen Entwicklungsvorgängen kommen. Im Falle eines schiefen Anschnitts bei der Amputation kommt es zu asynchronen Entwicklungsgeschwindigkeiten zwischen der linken und der rechten Seite einer Segmentanlage (Abb. 12C). Da Metanephridien- und Parapodialwachstum eng gekoppelt sind, besitzt in diesem Falle die Seite mit weiterentwickelten Parapodien auch größere Metanephridien. Damit decken sich die im letzten Kapitel gezeigten asynchronen Regenerationsvorgänge auch mit der Nephridien-Entwicklung.

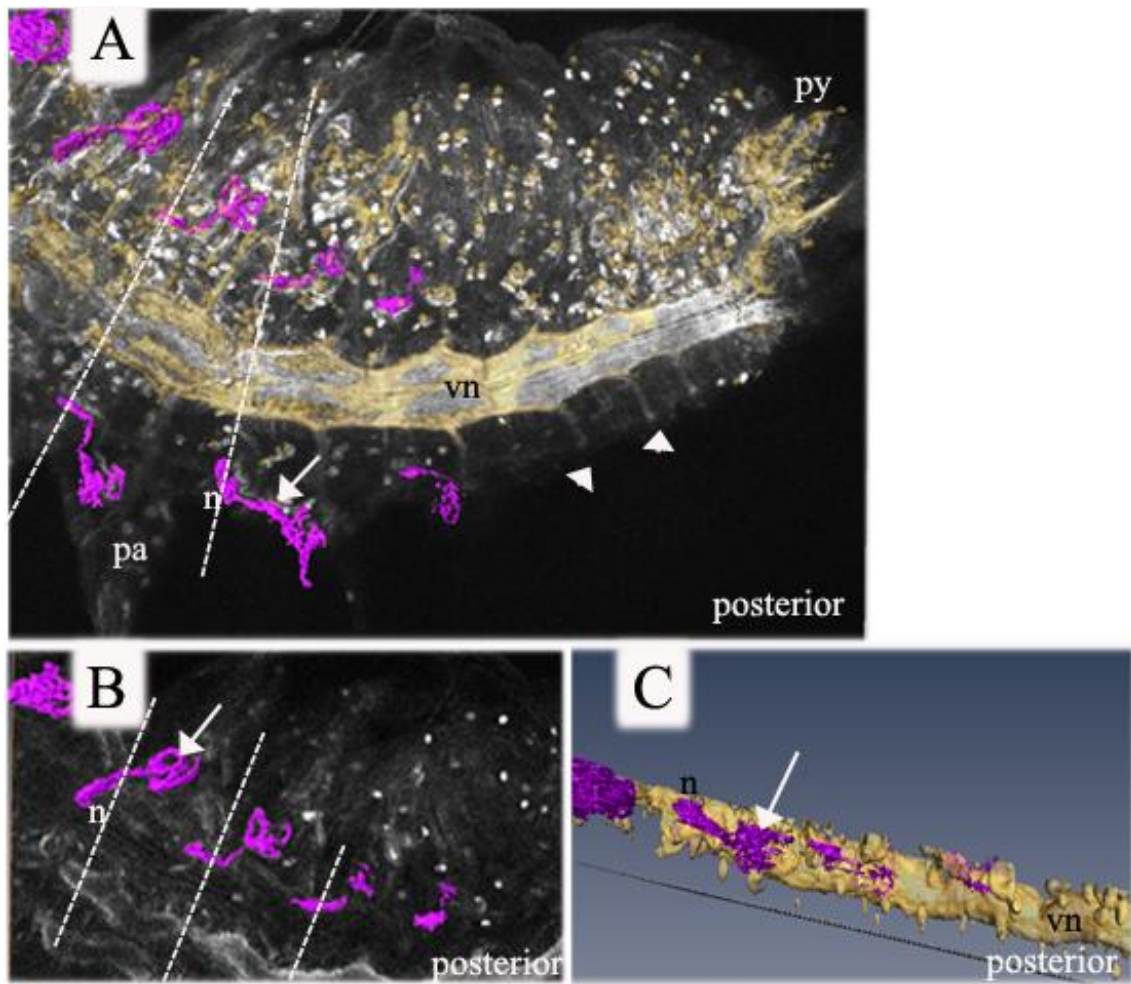


Abbildung 12

3D Rekonstruktionen einer KLSM Bildstapelserie eines 10 Tage alten Regenerats mit einer Tubulin/PH3 Doppelmarkierung.

A: ventrale Ansicht der posterioren Region mit Pygidium (py), Segmentanlagen (Pfeilköpfe) und Parapodialanlagen (pa). Die Segmentgrenzen werden durch gestrichelte Linien dargestellt. Das Nervensystem (gelb) durchzieht das gesamte Regenerat bis zum posterioren Rand. Metanephridien (violett) befinden sich lateral zum ventralen Nervenstrang (vn) und treten paarweise pro Segmentanlage auf. Das Nephrostom (n) befindet sich am posterioren Rand eines Segmentes und mündet in den Nephridienkanal (Pfeil) des posterioren Segmentes. **B:** Detailaufnahmen der Metanephridienentwicklung in Regeneraten: In Abhängigkeit des Entwicklungsstandes einer Segmentanlage (von posterior nach anterior) werden jeweilige Nephrostome (n) länger und größer. Der Nephridialkanal (Pfeil) wird dementsprechend auch länger und baut mehr Windungen auf. **C:** laterale Ansicht, Nephrostome (n) und Nephridialkanal (Pfeil) liegen auf einer Ebene und befinden sich auf Höhe des ventralen Nervenstranges (vn).

3.2 Befunde zur Zellproliferation in larvalen und postlarvalen Stadien sowie in Regeneraten nach caudaler Amputation

Es folgt zunächst eine Beschreibung der BrdU Pulse-Chase Experimente und anschließend werden die Ergebnisse der BrdU/PH3 Doppelmarkierungen gezeigt.

3.2.1 Zellproliferation in postlarvalen Stadien

3.2.1.1 Quantitative Beobachtungen an BrdU-markierten postlarvalen Wachstumsstadien

Da sich eine Inkubationszeit von 30 min für BrdU als praktikabel erwies, (bei kürzeren Inkubationszeiten waren zu wenige Kerne markiert, bei längeren stieg die Mortalität), wurde diese Inkubationszeit für alle Gruppen angewendet. Im Vergleich zur larvalen Wachstumsphase ist die postlarvale Wachstumsgeschwindigkeit stark individuell geprägt. Obwohl in einer Hälterungsschale nur Tiere einer Generation vertreten sind, lassen sich dort Würmer in verschiedenen Größen finden. Dies spiegelt sich auch im Proliferationsmuster der Tiere wider. Während der Embryonalentwicklung durchlebt das Tier sehr rasche Zellzyklen, die sich spätembryonal verlangsamen. Dreisegmentige Würmer schließlich haben (anfangs) eine sehr niedrige Zellproliferationsrate. Die Anzahl an BrdU markierten Kernen bei drei Tage alten drei-segmentigen Jungwürmern variierte zwischen 0 und 2%. Beginnt das Tier neue Segmente zu bilden, steigt auch die Zellproliferationsrate. Sechzig Prozent aller mit BrdU behandelten 4-10 segmentigen Tieren besitzen markierte Zellkerne. Diese Tiere wiesen BrdU Markierungen im jüngsten Segment bzw. der Wachstumszone auf. Eine Markierung in der PZ war bei 27% zu finden. Bei älteren Tieren (20-40 Segmenten) sank die Anzahl der positiv markierten Tiere auf ca. 40%. Bei > 40 Segmentigern ist eine deutliche Abnahme der BrdU Markierungen auf 20% aller inkubierten Tiere zu beobachten.

Im Allgemeinen waren ca. 80% der markierten Kerne in der Wachstumszone und der PZ zu finden. Diese 80% verteilen sich zum größten Teil auf die Wachstumszone der Tiere. Eine eindeutige räumliche Trennung zwischen Wachstumszone und PZ war jedoch nicht immer möglich, so dass eine genaue prozentuale Aufteilung zwischen PZ und Wachstumszone nicht möglich war. Da BrdU im Zuge der Mitose auf die Tochterkerne verteilt wird, sollte sich im Verlauf einer Chase Phase die Anzahl der BrdU markierten Kerne vermehren. Tatsächlich verdoppelt sich bei einer Dauer von einem Tag Chase-Zeit positiv markierte Kerne in der PZ und der Wachstumszone (bei

gleichzeitiger Abnahme der Intensität). Dabei waren bei geringer Chase Dauer noch (klonale) Gruppen von Kernen zu erkennen. Mit zunehmender Chase-Dauer konnte posterior nicht zwischen einzelnen Arealen unterschieden werden.

3.2.1.2 Proliferationsmuster der BrdU-markierten Zellen

Um die Teilungsrichtung der unmittelbar aus der PZ stammenden Zellen zu bestimmen, wurde ein Pool von ca. 20 Tieren mit beginnender Segmentbildung (also ca. 3 Wochen alt und sehr kleiner Wachstumszone) mit einer kurzen Inkubationszeit (30 min) mit BrdU markiert. Aus diesem Pool wurden sukzessive dann in einem Abstand von jeweils einem Tag Tiere zur weiteren Analyse herausgesucht.

Unmittelbar nach der Inkubation mit BrdU befinden sich ca. 20% aller markierten Kerne im Rumpfsegment, 80% in der Wachstumszone und der PZ. Projektionen von konfokalen Bildstapeln zeigen die Verteilung dieser markierten Kerne (Abb. 13 A1/A2/A3). Markierte Kerne der PZ und der Wachstumszone liegen in einer geschlossenen Linie von der linken zur rechten Körperseite. Die Wachstumszone befindet sich in einem frühen Entwicklungsstadium und ist demzufolge kaum breiter als die PZ. Die restlichen Areale in Rumpf und Pygidium zeigen nur einzelne positiv markierte Kerne. Im Rumpf sind diese vor allem in der Mitte des Segmentes und an den Parapodien zu finden. Im Pygidium sind vereinzelte Markierungen in den großen Drüsenzellen und auch in den Analcirren zu finden (Abb. 13 A1). Aus der dorso-lateralen Perspektive erweist sich die oben beschriebene Reihe von markierten Zellen in der PZ als quer zur Längsachse liegende Zellreihe, die links und rechts von der vertikalen Mittellinie liegt. Aus dieser Perspektive weist die PZ nur wenige markierte Kerne auf. Die Wachstumszone besitzt Reihen von markierten Zellkernen quer zur Längsachse. Beide Areale werden durch einzelne, longitudinal markierte Kernreihen verbunden. Solche Muster findet man nicht in den weiter anterior gelegenen Rumpfsegmenten, da dort nur vereinzelte Kerne markiert waren. Verändert man die Perspektive so, dass man aus posteriorer Sicht auf das Pygidium schaut wird deutlich, dass die markierten Kerne der PZ sich alle in der Peripherie, d.h. in einer äußeren Ebene befinden. Darüber hinaus befinden sich auch die Kerne der Wachstumszone und des Rumpfes in einer äußeren Ebene (Abb. 13 A2/3). Einen Tag nach BrdU Inkubation vergrößert sich die Anzahl der BrdU-markierten Kerne. In der KLSM Projektion ist die PZ unverändert durch eine zusammenhängende Reihe von markierten Kernen gekennzeichnet. Die anschließende Wachstumszone weist mehrere BrdU markierte Zellreihen

auf. In der dorsolateralen Perspektive sind große Areale der PZ und der Wachstumszone mit markierten Kernen ausgefüllt. Die benachbarte Wachstumszone besitzt nun mehrere markierte vertikale Zellkernreihen nebeneinander.

Zwischen den anterioren markierten Kernreihen und den unmittelbare der PZ benachbarten Kernreihen ist eine schmale Lücke erkennbar. Der restliche Rumpf weist einzelne markierte Kerngruppen quer über die dorso-ventralen Achse verteilt auf. Die posteriore Perspektive zeigt auch hier, dass die markierten Kerne der PZ und der Wachstumszone sich alle in der zirkulären äußeren Schicht befinden. Diese beiden Reihen ziehen von der äußersten dorsalen Zellreihe bis zur ventralen Basis der PZ. Ventral zieht jeweils links und rechts eine markierte Zellkernreihe in Richtung der ventralen Mittellinie, umschließen das Segment aber nicht vollständig (Abb. 13 B2 und B3). Zwei Tage nach BrdU Inkubation sind (in der KLSM Projektion) markierte Kerne quantitativ aus Wachstumszone und PZ nicht eindeutig voneinander zu trennen (Abb. 13 C1). In den Rumpfsegmenten sind markierte Kerne an der Parapodienbasis und verstärkt entlang der ventralen Mittellinie zu erkennen, d.h. dass die Proliferation der Zellen der neurogenen Region hier im Gange ist. Aus der dorsolateralen Ansicht erscheinen die markierten Kerne aus der PZ und der Wachstumszone als fast einheitliche schalenartige Struktur. PZ und Wachstumszone sind nun vollständig circular von dorsal bis ventral auf der äußeren Ebene mit markierten Kernen bestückt. Ferner befinden sich entlang der ventralen Mittellinie ebenfalls große Areale mit markierten Kernen. Die posteriore Perspektive zeigt, dass markierte Kerne in der PZ und auch in der Wachstumszone sich nicht nur in der äußeren Ebene wiederfinden, sondern auch innere Areale abgedeckt werden. Dabei sind die „inneren“ markierten Kerne nicht isoliert vorzufinden, sondern immer in unmittelbarer Nachbarschaft zu markierten Kernen aus der äußeren Ebene (Abb. 13 C2 und C3).

Drei Tage nach BrdU-Inkubation sind bei Tieren in denen die Ausdifferenzierung der 1. Segmentanlage, also der Entwicklung der Parapodialanlage begonnen hat, die lateralen Bereiche der Wachstumszone mit BrdU stark markiert. Die Kerne in zentralen Bereichen hingegen sind nur vereinzelt markiert. Das nachfolgende jüngere Segment zeigt eine starke Markierung nahe der ventralen Mittellinie, also weiteres Wachstum neuronaler Strukturen. Aus der dorsolateralen Perspektive sind große markierte Zellareale am linken und rechten Außenrand der Wachstumszone und PZ zu finden. Dorsale und zentrale innere Bereiche bleiben unmarkiert. Die ventralen Bereiche der Wachstumszone zeigen ebenfalls markierte Kerne. Ebenfalls markiert sind ventrale

Zellreihen an der Basis der Analcirren. Aus der posterioren Ansicht erkennt man, dass die PZ und die Wachstumszone Außenrand und innere Areale mit markierten Zellkernen besetzt sind. Fast der gesamte Innenraum (mit Ausnahme von vermutlich entodermalen Strukturen) vom jüngsten Segment ist ausgefüllt mit markierten Kernen. Auf der ventralen Linie, dem prospektiven Bauchmark, ist ebenfalls eine Anhäufung von markierten Kernen zu erkennen.

Die histologischen Analysen mit 1,5 Chase-Tagen zeigen, dass alle mesodermalen Strukturen wie Coelomepithel oder Muskulatur frei von markierten Zellkernen sind (Abb. 14 A-D). Markierte Kerne sind exklusiv in der Epidermis vertreten. 80% der BrdU-markierten Kerne konzentrieren sich auf die Wachstumszone (Abb. 14 C/D). In der Wachstumszone sind ca. 30% in den ventrolateralen Ausbuchtungen und ca. 60% nahe dem Bauchmark zu finden. Im dorsalen Bereich sind deutlich weniger markierte Kernen sichtbar (ca. 10%). Neues Zellmaterial wird schon während der Ausdifferenzierung der Segmentanlage in der Wachstumszone gebildet. Demzufolge lassen sich auch einige mit BrdU markierten Zellkerne in der PZ finden. Dabei zeigt sich dass die Schwerpunkte der Proliferation lateral und ventral liegen. Neben der PZ und der Wachstumszone sind einige Teilbereiche des Enddarms, der Analzirren und der Rumpfepidermis markiert. Generell anzumerken ist, dass die markierten Kerne in Gruppen von 2, 4 oder 8 Zellen angeordnet sind. Dabei gibt es Unterschiede in der Ausrichtung dieser Zellgruppen. So sind auf der dorsalen Seite zumeist longitudinale Anordnungen zu finden, während in den lateralen und ventralen Bereichen sowohl longitudinale als auch transversale markierte Zellanordnungen zu finden sind. Im ventralen Bereich treten massive Zellkernmarkierungen auch in tieferen Schichten auf. Wie die Schnittserien belegen, handelt es sich dabei um Zellen im Bauchmark (Abb.14 A und B)

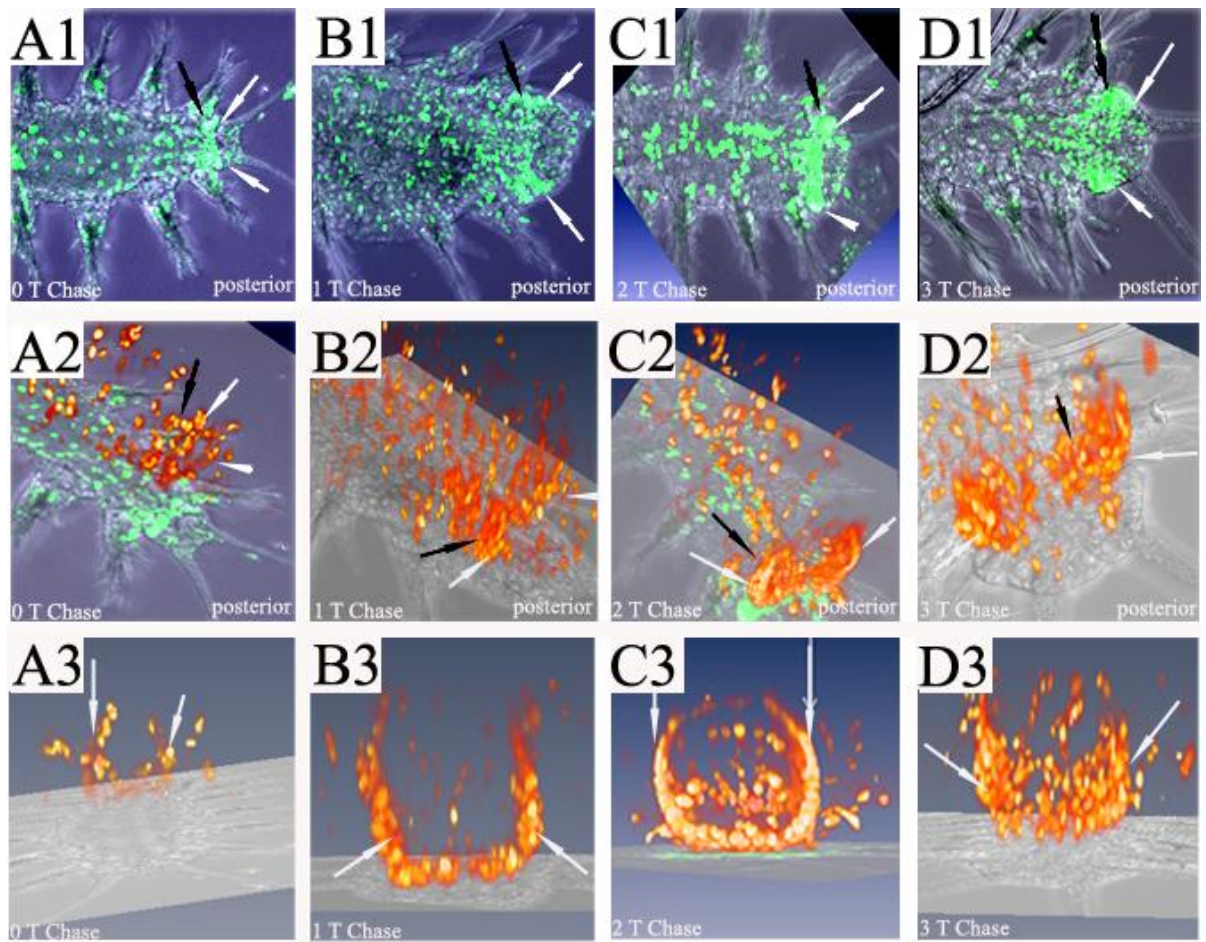


Abbildung 13

Konfokale Bilder und 3D Projektionen von BrdU-Markierungen in drei Wochen alten Jungwürmern.

Nach einer BrdU-Puls Phase folgte die Analyse unmittelbar danach, also ohne weitere Chase Phase (A), nach einem Tag Chase (B), nach 2 Tagen Chase (C) und nach 3 Tagen Chase (D).

Ansichtsperspektiven: (1) dorsale Projektion, (2) dorsolaterale 3D-Projektion, (3) posteriore 3D-Projektion. Die Mehrheit der BrdU-markierten Zellkerne befindet sich in der Wachstumszone (schwarzer Pfeil) und der PZ (weißer Pfeil). Ohne und mit nur einem Tag Chase sind BrdU markierte Kerne nur an der Oberfläche zu finden (A/B), während mit längeren Chase Phasen markierte Kerne auch in tieferen Körperschichten zu finden sind (C/D). Die Anzahl der markierten Kerne wird durch die Zellteilungen (während der Chasephase) höher. Diese Zellteilungen finden vermehrt in der ventralen und lateralen Region der PZ und der Wachstumszone statt (B3/C3/D3). In Höhe der späteren Coelombereiche sind zunächst wenige (C3) einen Tag Chase später (D3) viele markierte Zellkernreihen zu finden

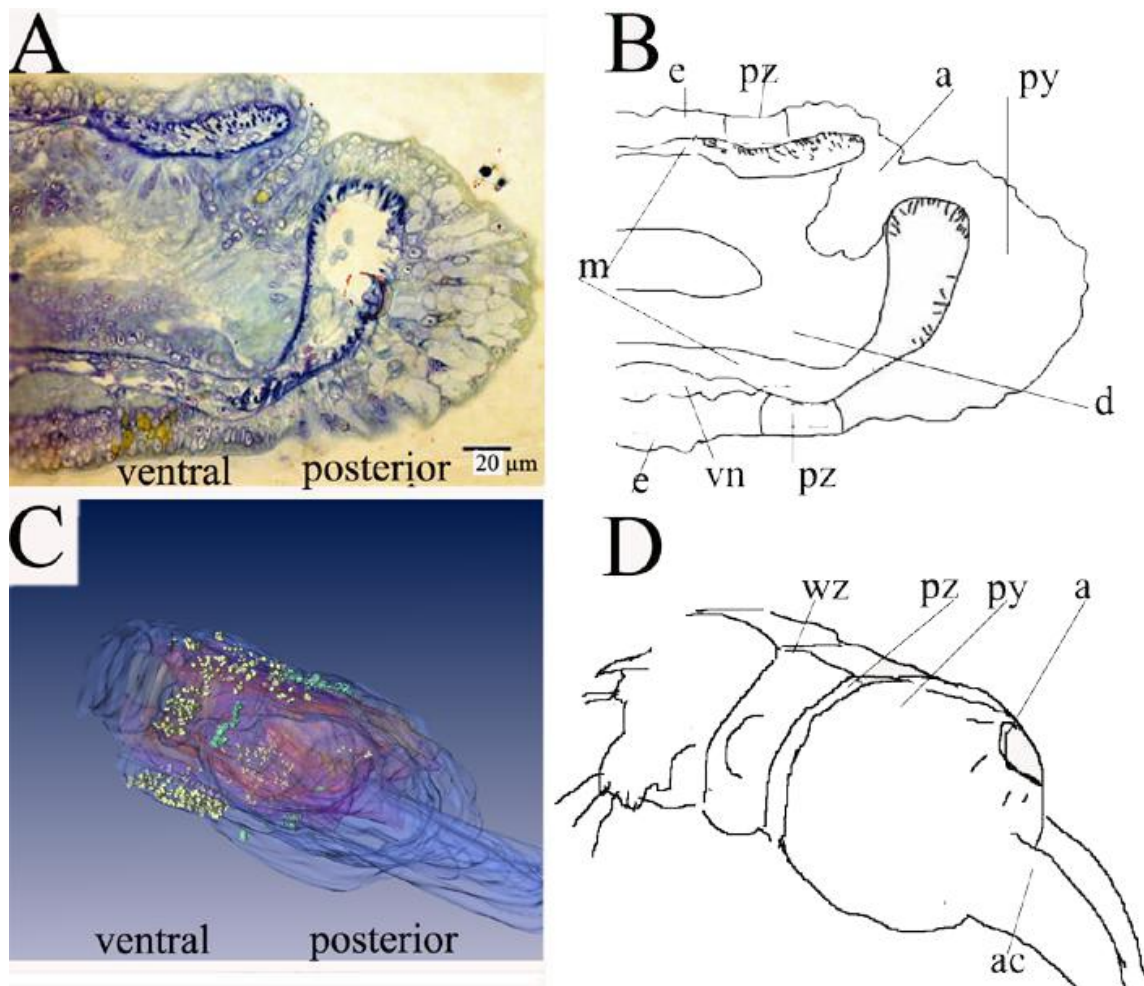


Abbildung 14

3D Rekonstruktion von 1 µm dicken Gewebeschnitten von BrdU markierten subadulten Tieren (1,5 Tage Chase-Phase).

A-B: Längsschnitt durch das posteriore Ende eines subadulten Wurmes. Die BrdU Markierung ist gelb. Das Schema der Gewebeverteilung zeigt die Position von Epidermis (e), Darm (d), Mesoderm (m), ventralem Nervstrang (vn), Proliferationszone (pz) und dem Pygidium (py). **C-D:** laterale Ansicht der 3D Rekonstruktion aus BrdU markierten Gewebeschnitten. Das Schema zeigt die Position der Wachstumszone (wz), Proliferationszone (pz), dem Pygidium (py), dem Anus (a) und der Analcirren (ac). Die BrdU Markierungen sind überwiegend in ektodermalen Gewebe der Wachstumszone und dort überwiegend lateral und ventral zu finden. In grün sind Kerne der Proliferationszone dargestellt.

3.2.1.3 Proliferationsanalyse mit Hilfe der Doppelmarkierung BrdU/ PH3

Werden postlarvale Stadien mit Anti-PH3 markiert, so werden Zellen in der M-Phase des Zellzyklus detektiert. Die Unterschiede zur BrdU-Markierung liegen vor allem in dem kurzen Zeitfenster, in dem proliferative Vorgänge beobachtet werden können.

In Kapitel 3.2.1.1 und 3.2.1.2 wurde gezeigt, dass nach drei Tagen Chase-Phase große Teile der PZ und der Wachstumszone BrdU-markierte Kerne aufweisen. Dabei ist unklar, ob die markierten Kerne auch zum Zeitpunkt der Fixierung proliferativ aktiv sind. Daher wurde neben der BrdU Behandlung mit anschließender Chase-Dauer (3 Tage) auch eine PH3- Antikörpermarkierung durchgeführt. Projektionen von KLSM Bildern zeigen in der PZ, dass BrdU-markierte Zellen nur wenige PH3-markierte Kerne gegenüberstehen (in einem Verhältnis von etwa 7:1). In der Wachstumszone ist das Verhältnis zwischen BrdU- Markierungen und PH3 etwa 4:1. Zu beachten ist, dass die Abstände zwischen den PH3- markierten Kernen ca. 5-6 Zelldiameter betragen. Im restlichen Rumpf konnten ebenfalls vereinzelte PH3-Markierungen gefunden werden. Größere Ansammlungen von PH3- Markierungen konnten in der postlarvalen Segmententwicklung nicht beobachtet werden (Abb. 18 A).

3.2.2 Zellproliferation während der Regeneration

3.2.2.1 Befunde zum Ursprung des Regenerates

Tiere, die unmittelbar nach der Amputation mit BrdU inkubiert worden sind, zeigten nach sieben Tagen eine auffällig große Anzahl BrdU-markierter Kerne in den Arealen rings um die Amputationsstelle (Abb. 15 A). Ferner sind auf der ventralen Mittellinie in dem ersten, zweiten und der dritten Segmentanlage eine fast durchgehendes Band von BrdU-markierten Kernen zu finden. Die Parapodialanlagen, die jüngsten Segmentanlagen, die PZ und das Pygidium weisen hingegen, mit Ausnahme von einigen einzelnen Zellen, keine markierten Kerne auf. Setzt man die BrdU Inkubation sieben Tage nach der Amputation an, ohne eine weitere Chase-Zeit, so lassen sich über das gesamte Regenerat zahlreiche BrdU-markierte Kerne erkennen. Der Stumpf und die unmittelbare Nähe der Amputationsstelle bleiben dagegen unmarkiert (Abb. 15 B). Setzt man die Inkubation mit BrdU 24 h nach der Amputation an, so sind nach sieben Tagen Chase-Phase schwache BrdU-Markierungen im Regenerat erkennbar. Nach kürzeren Chase-Phasen (1-3 Tage) waren starke BrdU-Markierungen im gesamten Regenerat zu erkennen.

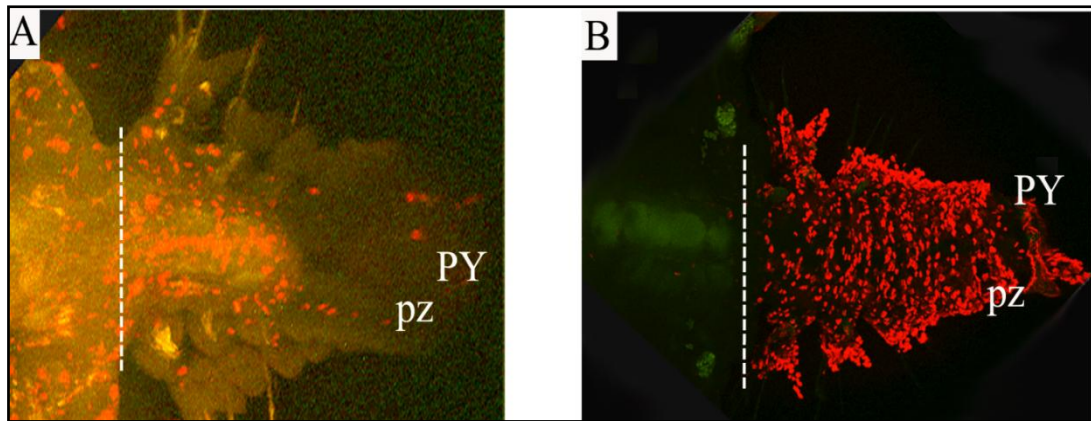


Abbildung 15

BrdU Puls Markierung zu unterschiedlichen Zeitpunkten während der Regeneration.

A: 30 min BrdU Inkubation unmittelbar nach Amputation, anschließend 7 Tage Chase: BrdU markierte Kerne sind im alten Segment, anterior der Schnittebene (gestrichelte Linie), und median in den ersten drei Segmentanlagen zu finden

B: 30 min BrdU Inkubation 7 Tage nach Amputation, keine Chase Phase: Anterior der Schnittebene (gestrichelte Linie) sind nur vereinzelte Kerne sichtbar, während das gesamte Regenerat, vorwiegend an den jeweiligen Segmenträndern und den Parapodialanlagen BrdU Markierungen aufweist.

Pygidium (PY), Proliferationszone (PZ)

3.2.2.2 Histologische Analysen der Regeneration mit Hilfe von BrdU-Markierungen

Im Unterschied zur Normalentwicklung werden in Regeneraten neue Segmentanlagen gebildet, bevor sich die vorherigen Segmentanlagen vollständig differenziert haben (siehe Kapitel 0.03.1.2). Da die Entwicklung dieser Segmentanlagen sukzessiv erfolgt, können so in einem Tier die Ausdifferenzierung eines Segmentes von Beginn bis zum Ende in einem Semidünnschnitt bzw. einer Schnittserie gezeigt werden. Die äußere Entwicklung des Regenerates und die Gewebeorganisation im frühen Regenerat (1-3 Tage nach Amputation) wurden in Kapitel 3.23.1.23.1.2.2 bereits gezeigt. Das frühe Regenerat ist durch dicht gepackte undifferenzierte Zellen gekennzeichnet, die teilweise noch keine abgeschlossene Wundheilung und vereinzelte Muskeldifferenzierungen aufweisen. Etwa sieben Tage nach Amputation ist posterior ein differenziertes Pygidium mit Analcirrenanlagen und unmittelbar anterior eine Reihe von dichtgepackten Zellen (PZ) zu finden. Danach folgen in anteriorer Richtung die wachsenden Segmentanlagen. Erste Differenzierungen finden sich in der vierten Segmentanlage anterior der PZ (Abb. 16A). Dort sind erste Strukturen der Aciculae in den Parapodialanlagen sichtbar. In den nachfolgenden Segmentanlagen werden dann Coelomräume und Parapodialmuskulatur sichtbar.

Nach einem Tag Chase-Phase konnten BrdU-Markierungen in den jüngsten Segmentanlagen lokalisiert werden. Die Mehrzahl der markierten Kerne befindet sich in der Epidermis, allerdings gibt es insbesondere in den jüngsten Segmentanlagen lateral (an den Parapodialanlagen) eine Reihe von BrdU-markierten Kernen unterhalb der Epidermis. Ausdifferenzierte Segmente waren nicht markiert. Mesodermale und entodermale Gewebsschichten in den heranreifenden Segmentanlagen wiesen keine BrdU-markierte Kerne auf, Analcirren und Anus hingegen zeigten markierte Kerne (Abb. 16A). Dreidimensionale Rekonstruktionen belegen, dass die Proliferation im Regenerat dorsal und ventral an den jeweiligen Segmentgrenzen, lateral an den Parapodialanlagen auftritt. (Abb. 16C). Der Schwerpunkt der Proliferation liegt in den frühen Segmentanlagen, dort zu 80% auf ventraler (Bauchmark) und lateraler (Parapodienanlagen) Ebene. Ventral sind die Epidermis und teilweise auch das Nervengewebe markiert.

Die 3D-Rekonstruktion eines 7 Tage alten Regenerates zeigt, dass nach einem Tag Chase-Phase die PZ und alle neuen Segmentanlagen mit BrdU-markierten Zellkernen

versehen sind (Abb. 17A und B). Auffällig sind die quer zur Längsachse markierten Zellreihen, die insbesondere an den anterioren Rändern der jeweiligen Segmentanlage zu finden sind. Die PZ und die unmittelbar anterior liegenden jüngsten Segmentanlagen sind komplett mit markierten Kernen in transversaler Richtung ausgestattet. Wechselt man in die posteriore Ansicht, so erkennt man, dass alle markierten Kerne in einer äußeren zirkulären Schicht liegen. Auf der ventralen Mittellinie finden sich darüber hinaus vereinzelte benachbarte Markierungen im Innenraum wieder (Abb. 17B). Nach zwei Tagen Chase-Phase sind die markierten Kerne nicht nur an den jeweiligen Segmenträndern zu finden, sondern auch in zentralen und lateralen Bereichen einer Segmentanlage. Die jüngsten Segmentanlagen und die PZ weisen übergangslos markierte Zellkerne auf. Aus der posterioren Ansicht ist deutlich, dass nun auch innere benachbarte Schichten BrdU markierte Kerne aufweisen (Abb. 17C und D). Nach drei Tagen Chase sind nahezu alle neuen Segmentanlagen mit markierten Kernen ausgestattet. Der Wechsel in die posteriore Ansicht zeigt, dass auch mehrere innere Schichten mit BrdU- markierten Kernen ausgefüllt sind (Abb. 17E und F).

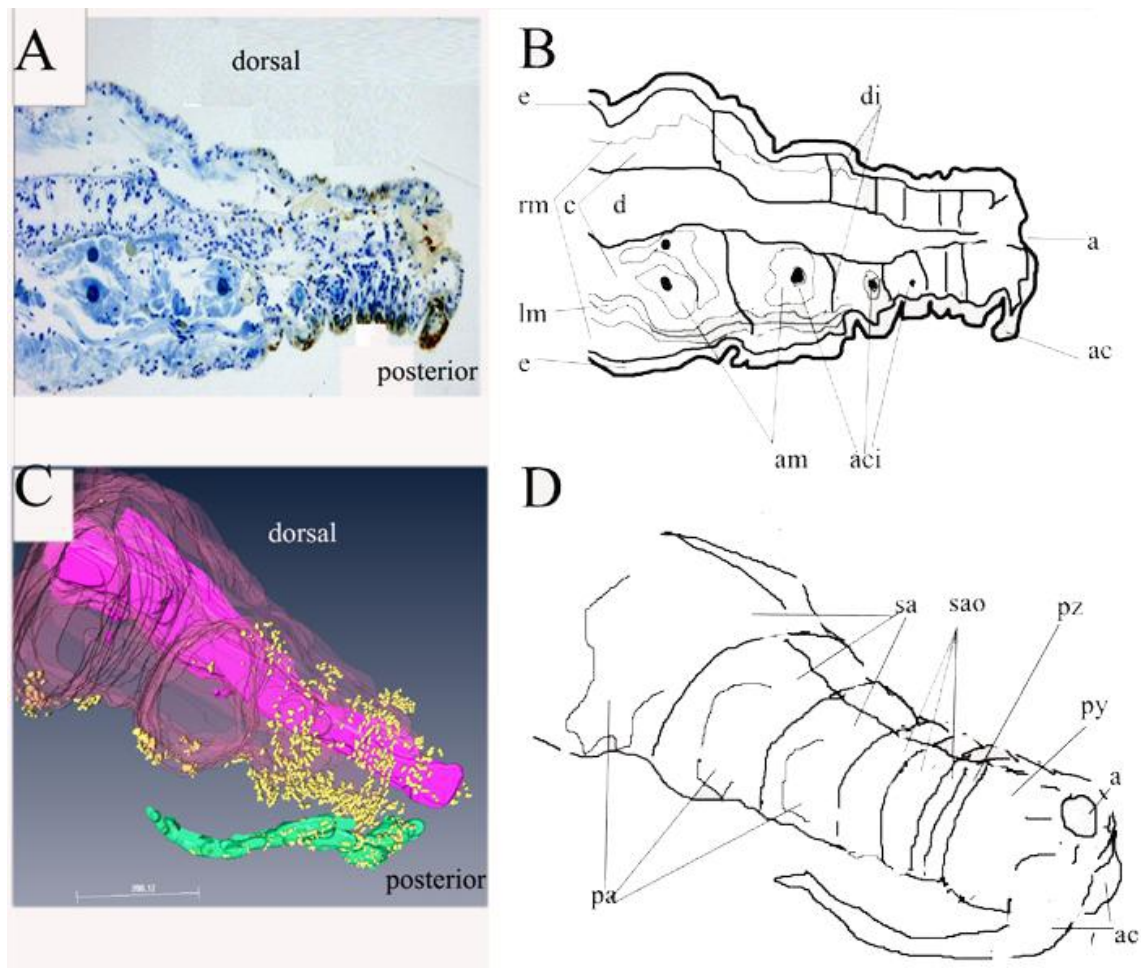


Abbildung 16

3D Rekonstruktion von Semidünnschnitten der posterioren Region von 7 Tagen alten Regeneraten mit BrdU markierten Kernen

A-B: Sagittalschnitt von der posterioren Region, Methylenblau gegengefärbt, Braun/schwarze BrdU positive Kerne. Das Schema verdeutlicht die innere Segmentorganisation während der späten Regenerationsphase. Angezeigt werden die Position von Aciculae (aci), Acicularmuskulatur (am), Analcirren (ac), Anus (a), Coelom (c), Darm (d), Dissepimenten (di), Epidermis (e), Längsmuskulatur (lm) und Ringmuskulatur (rm). Nach anderthalb Tagen Chase sind die BrdU markierte Kerne vorwiegend in der Epidermis zu finden. **C-D:** Die laterale Ansicht der 3D Rekonstruktionen zeigt den Proliferationsschwerpunkt in der PZ und den jüngsten Segmentanlagen. Dargestellte Strukturen: gelb: BrdU markierte Kerne, transparentes violett: Mesoderm, violett: Darm

Grün: Analcirren. Das Schema verdeutlicht die Position der Parapodialanlagen (pa), Segmentanlagen (sa), Segmentanlagen ohne äußerlich sichtbare Differenzierungen (sao) der Proliferationszone (pz), dem Pygidium (py), Anus (a) und Analcirren (ac).

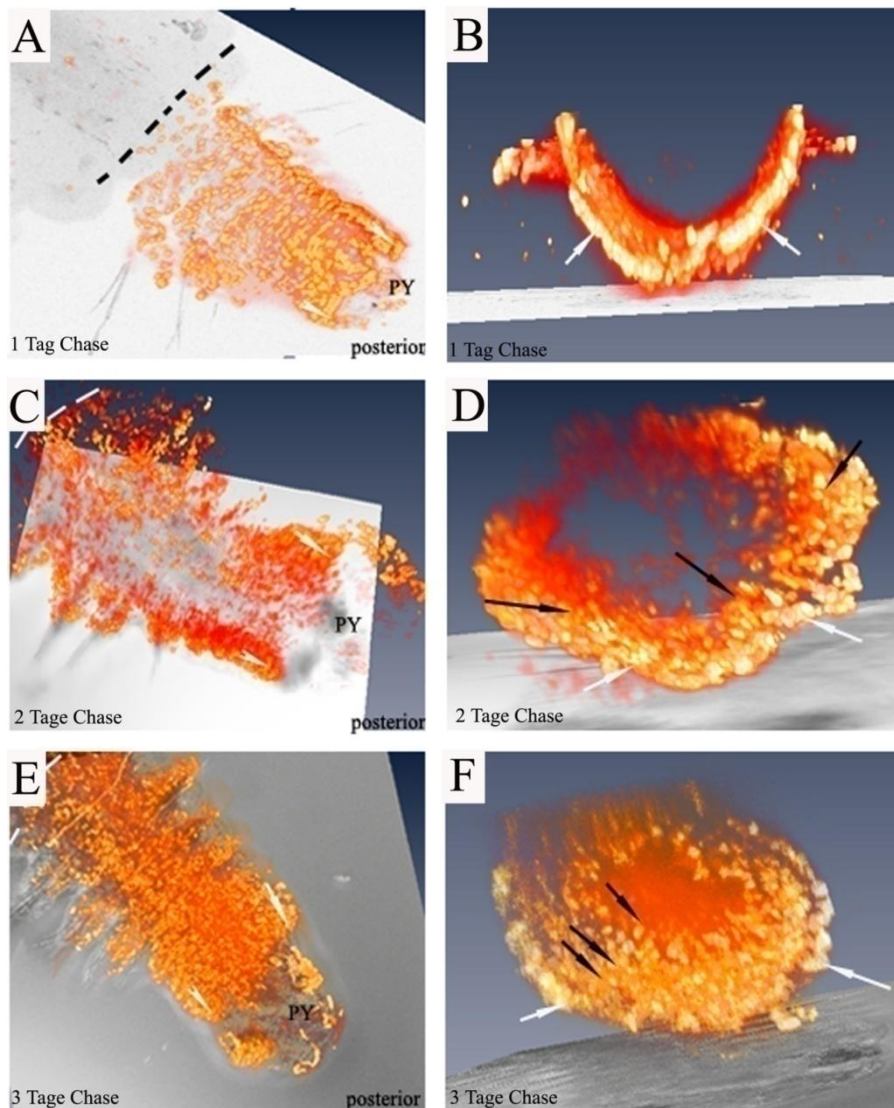


Abbildung 17

3D Rekonstruktion von KLSM Projektionen von BrdU markierten Zellkernen in 7-10 Tage alten Regeneraten. (30 min Puls, 1-3 Tage Chase)

Die Amputationsstelle ist durch gestrichelte Linien dargestellt, die Proliferationszone mit weißen Pfeilen. **A/C/E:** dorsolaterale Ansicht, **B/D/F:** posteriore Ansicht. **A-B:** 1 Tag Chase, alle markierten Kerne liegen vorwiegend an den Segmentgrenzen und in der äußeren Schicht, **B-C:** 2 Tage Chase: in den Segmentanlagen sind die Markierungen vorwiegend lateral und ventral, vereinzelte markierte Kernreihen befinden sich in inneren Schichten (schwarze Pfeile). **E-F:** 3 Tage Chase: Die PZ und die jüngsten Segmentanlagen im Regenerat sind (mit Ausnahme eines zentralen Lumens) komplett markiert (schwarze Pfeile).

3.2.2.3 Proliferationsanalysen mit Anti-PH3

Regenerate und subadulte Stadien sind also nach 3 Tagen Chase-Phase nahezu ausgefüllt mit BrdU-markierten Zellen. Mit PH3-Markierungen wurden in subadulten Stadien Zellkerne die sich zum Zeitpunkt der Fixierung in der M-Phase des Zellzyklus befanden detektiert (3.2.1.3). Um einen Vergleich der Zellzyklus Geschwindigkeit mit subadulten Stadien zu führen, wurden bei dreitägigen und siebentägigen Regeneraten ebenfalls PH3-Markierungen durchgeführt.

Bei drei Tage alten Regeneraten waren nahezu alle Tiere mit PH3-Markierungen versehen. Die gesamte PZ und Wachstumszone war mit M-Phase Kernen versehen. Das Verhältnis zwischen BrdU und PH3 war etwa 1:1.

Bei sieben Tage alten Regeneraten (Abb. 18B) waren 90-95% aller untersuchten Würmer PH3-markiert. Über 80% aller markierten PH3 Kerne waren in der PZ und der Wachstumszone verteilt. Doppelmarkierungen von PH3 und BrdU zeigten ein (im Gegensatz zu subadulten Stadien von etwa 1:7) ein Verhältnis von etwa 1:2 in der Wachstumszone und etwa 1:1 in der PZ. M-Phase Kerne sind in jungen Segmentanlagen ohne Parapodialanlagen gleichmäßig im Segment verteilt. In Segmentanlagen mit sichtbaren Parapodialanlagen sind M-Phase Kerne zu über 90% an den Parapodialanlagen zu finden. Darüber hinaus konnten auch PH3-Markierungen in inneren Schichten von PZ und Segmentanlage gefunden werden (Abb. 18 B1). Im Unterschied zu entsprechenden BrdU-Markierungen sind zwischen den markierten Zellen in den tieferen Schichten und der Epidermis unmarkierte Zellen.

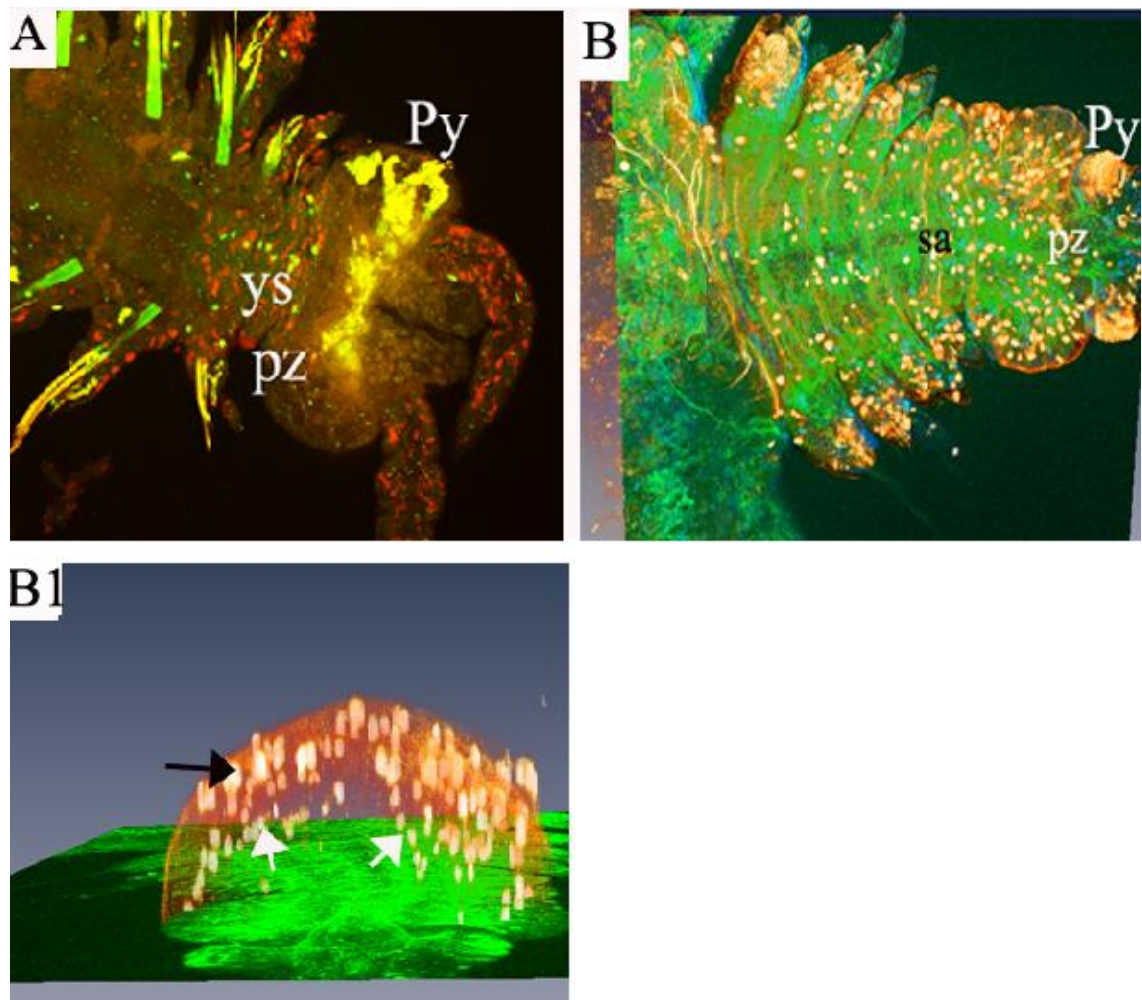


Abbildung 2

KLSM Aufnahmen von Antikörpermarkierungen mit PH3 in subadulten Würmern und Regeneraten.

A: posteriore Ansicht einer BrdU/PH3 Doppelmarkierung in subadulten Würmern. BrdU Markierungen (rot) sind nach drei Tagen Chase in der gesamten Proliferationszone und großen Teilen des jüngsten Segmentes zu finden. PH3 Markierungen (grün) sind vereinzelt in der Proliferationszone und dem jüngsten Segment zu finden. Markierungen von Aciculae und Drüsenstrukturen im Pygidium (Py) sind unspezifisch. **B:** PH3 Markierung im sieben Tage alten Regenerat. Markierte Kerne (orange) sind in den lateralen Lagen der Segmentanlage und großen Teilen der Proliferationszone zu finden. Die posteriore Ansicht (B1) zeigt, dass die PH3 Markierungen in der obersten Schicht des Regenerats (schwarzer Pfeil) aber auch in unteren Gewebeschichten (weiße Pfeile) zu finden ist.

Segmentanlage (sa), jüngstes Segment (ys), Proliferationszone (pz), Pygidium (Py)

3.3 Lokalisierung der *pduwnt-1* Genexpression

3.3.1 Expressionen in larvalen und juvenilen Stadien

In situ Hybridisierungen wurden mit Larven 24, 48, 55 und 60 h nach Befruchtung (hpf) durchgeführt. Bei Larven 24 hpf konnte kein *wnt* Signal detektiert werden. Bei 48 hpf konnten posterior in den drei Paar Parapodienanlagen erste Markierungen von *pduwnt-1* detektiert werden. Dabei nimmt die Breite dieser Streifen von posterior nach anterior ab. Spätere Stadien der Metatrochophora (55 hpf) zeigen segmentale *pduwnt-1* Markierungen lateral an den prospektiven Parapodialanlagen und ein starkes Signal am posterioren Ende (Abb. 19A).

Die Expressionen in 60 h alten Larven zeigen deutliche segmentale Expressionsmuster in den Parapodialanlagen und den posterioren Deutomergrenzen (Abb. 19B). Die posteriore Basis der drei Borstensäcke wies eine scharf begrenzte Markierung auf. Neben diesem segmentalen Expressionsmuster gab es auch Markierungen am Stomadaeum (Abb. 19B). In drei-segmentigen Jungwürmern konnte keine Markierung nachgewiesen werden. Erst bei der Bildung von Tritomeren war wieder eine Markierung in der PZ und den lateralen Bereichen der Wachstumszone zu erkennen (Abb. 20). Dabei zeigte sich, dass die Markierung am stärksten in der PZ und den Zellen in der jüngsten Segmentanlage zu finden war. Die Intensität der Markierung wurde von posterior nach anterior schwächer. Bei ausgewachsenen Segmenten erlosch das Signal. Im Gegensatz zu larvalen Stadien (ca. 95%) wiesen nur etwa 30-40% der untersuchten Tiere eine *pduwnt-1* Markierung auf. Bei Gruppen mit älteren Tieren bzw. mehr Segmenten (>40) sinkt dieser Wert auf 0-10%.

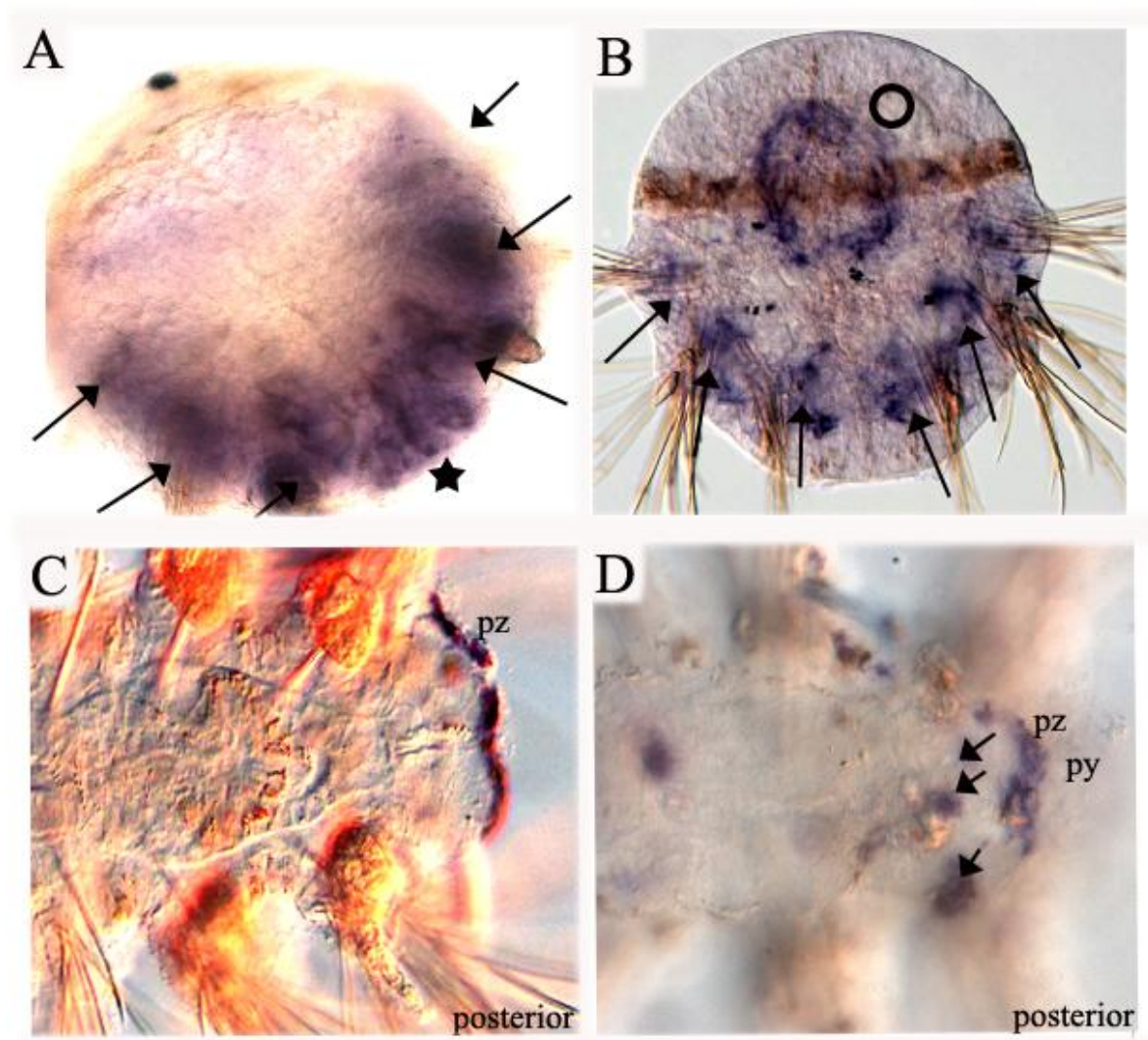


Abbildung 19

***In situ* Hybridisierung an larvalen und juvenilen Stadien mit pduwnt-1 Sonde**

A: ventrale Ansicht eines 55 h alten Tieres: *pduwnt-1* -Markierungen (blau) sind an den prospektiven Parapodialanlagen (Pfeile) und am posterioren Ende lokalisiert (Stern). **B:** ventrale Ansicht eines 60 h alten Tieres: Im Vergleich zu A sind die *pduwnt-1*-Markierungen schmäler. Diese Markierungen befinden sich an der posterioren Basis der jeweiligen Parapodialanlage. Deutliche Markierungen sind zirkulär vom Stomadaeum bis anterior vom Prototroch (schwarzer Kreis) lokalisiert. **C-D:** median/dorsale Ansicht des posterioren Endes von Juvenilstadien (4-5 Segmenter). Die Proliferationszone und posteriore Grenzen des anterior liegenden Segmentes (schwarze Pfeile) weisen deutliche *pduwnt-1* Markierungen auf. Proliferationszone (pz), Pygidium (py)

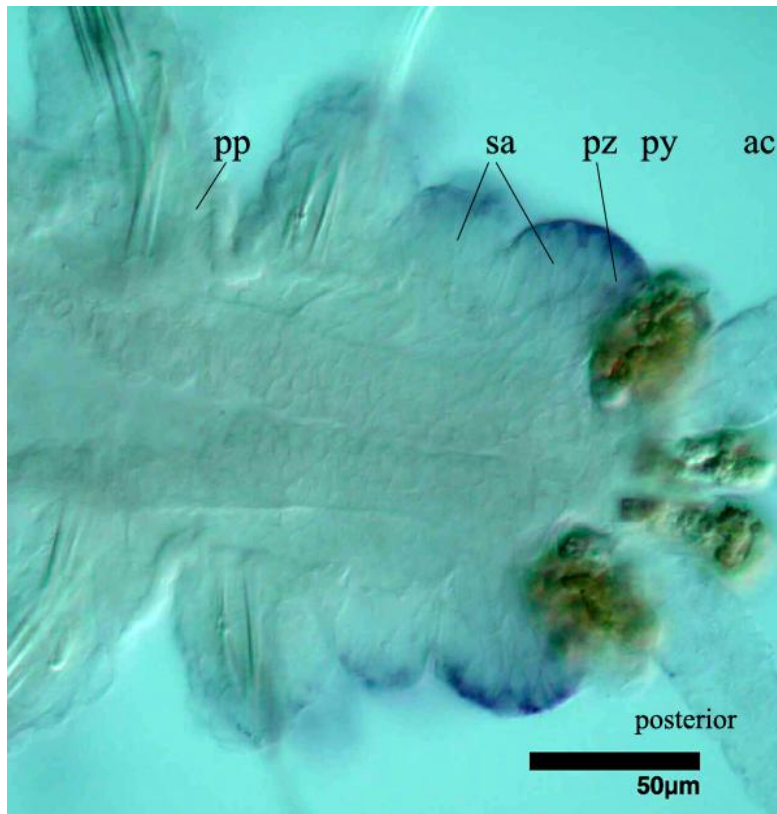


Abbildung 20

***In situ* Hybridisierung am 10 segmentigen Jungwurm mit *pduwnt-1* Sonde. DIK-Aufnahme.**

Am posterioren Ende dieses Jungwurms wurde die Proliferationszone (PZ) nach *in situ* Hybridisierung mit *pduwnt-1* anti-sense-RNA stark markiert. Die Markierung nimmt von der Proliferationszone von posterior nach anterior ab. Auch die jüngsten, d.h. zuletzt gebildeten Segmente zeigen eine *pduwnt*-Expression (sa). Die *pduwnt-1* -Expression ist bei ausdifferenzierten Segmenten mit Parapodien (pp) erloschen.

3.3.2 Expressionen von *pduwnt-1* in Regeneraten.

In Kapitel 0.03.1.2 wurden verschiedene Entwicklungsstadien der Regeneration beschrieben und definiert. Die *pduwnt-1* Expression sollte daher auch in allen dort beschriebenen Stadien getestet werden. Daher wurden Stadien vom Beginn der Wundheilung, über das Ausbilden erster Segmente bis zur Bildung von fast ausdifferenzierten Parapodialanlagen für die *in situ* Hybridisierungen mit *pduwnt-1* fixiert.

Während der Wundheilungsphase war nur der Wundbereich mit *pduwnt-1* markiert. Es gab keine Markierungen im Stumpf. Die *pduwnt-1* Expression wurde im Laufe der fortschreitenden Wundheilung schwächer und beschränkte sich, nach der Bildung eines Pygidiums und der entsprechenden PZ, auf den posterioren pygidialen Bereich (Abb. 21). Dieser Bereich reichte vom Anus bis zu 2-4 Zelldiameter in anteriorer Richtung. Dorsal wurde diese *pduwnt-1* Markierung im mediolateralen Bereich breiter (4 Zelldiameter), während auf der ventralen Seite nur ein schmaler Streifen von etwa 2 Zelldiametern am posterioren Pygidium zu finden war. Zusätzlich gibt es eine *pduwnt-1* Markierung in einem schmalen Zellstreifen zwischen Anus und Stumpf (Abb. 21 B).

Nach Abschluss der Wundheilung und der Bildung von ersten sichtbaren Segmentanlagen bei drei Tage alten Regeneraten sind die posterioren Grenzen dieser Segmentanlagen mit *pduwnt-1* markiert (Abb. 22). Dabei unterscheiden sich ventrale und dorsale, aber auch anteriore und posteriore *pduwnt-1* Expressionsmuster. Dorsal weisen Segmentanlagen einen über die gesamte Breite der posterioren Segmentgrenze markierten Zellstreifen auf (Abb. 22B). Zusätzlich können *pduwnt-1* Markierungen auf den posterioren Grenzen der ältesten Segmentanlage (im Regenerat anterior) lokalisiert werden. Während diese zwei ältesten Segmentanlagen über die gesamte Breite markiert waren, wiesen die jüngsten Segmentanlagen (im Regenerat posterior) nur an den posterioren lateralen Bereichen *pduwnt-1* Signale auf. Ventral beschränkt sich die *pduwnt-1* Expression in allen Segmentanlagen auf laterale Bereiche. Eine Ausnahme ist die PZ, die bis auf einen kleinen mediventralen Teil mit *pduwnt-1* markiert war (Abb. 22C). Zu der segmentalen Expression gibt es auch noch eine Expression am posterioren Pygidium. Im Unterschied zur Wundheilungsphase ist diese Expression jedoch um die Anusregion beschränkt (Abb. 22A-C). Der Stumpf war komplett unmarkiert.

Dieses Expressionsmuster von *pduwnt-1* setzt sich im weiteren Verlauf der Regeneration fort (Abb. 23A-C). Auch hier wird deutlich, dass alle Markierungen ausschließlich im Regenerat zu finden sind (Abb. 23A). Im Unterschied zum drei Tage alten Regenerat ist die posteriore Expression am Pygidium um den Anus herum fast verschwunden (Abb. 23A-C).

Bei Regeneraten, die sich in einem fortgeschrittenen Differenzierungsstadium befinden (ca. 8-9 Tage alt, mit mehreren Segmentanlagen die deutlich sichtbare Parapodialanlagen besitzen) verändert sich das Expressionsmuster leicht (Abb. 24). Der anteriore-posteriore Unterschied der Expression im Regenerat liegt hier in einer Verbreiterung der Expression in anteriorer Richtung. Die ältesten Segmentanlagen besitzen demnach eine breitere markierte Schicht, bestehend aus mehreren Zellen. Das trifft insbesondere auf die Parapodialanlagen zu. Zur Mitte eines Segmentes hin ist dagegen nur eine Linie von Zellen zu erkennen, die eine Markierung aufweist (Abb. 24A). Der dorso-ventrale Unterschied der Expression von *pduwnt-1* bleibt bei den 8-9 Tage alten Regeneraten unverändert (Abb. 24A-B).

Histologische Untersuchungen (Abb. 25) zeigen, dass *pduwnt-1* Expression vorwiegend in ektodermalen Zellen zu finden ist. Markierte Zellen befinden sich an den posterioren Segmentgrenzen und der Basis der Parapodialanlage (Abb. 25A). Darüberhinaus gibt es aber auch Markierungen an den entstehenden Coelomwänden (Abb. 25A).

Die Anzahl der Zellen mit *pduwnt-1* Markierungen nimmt im Verlauf der Segmententwicklung zu. Dabei nimmt die Stärke der Markierung von posterior nach anterior ab (Abb. 25A). Auch die ventrale und dorsale Seite im *pduwnt-1* Expressionsmuster sind unterschiedlich. Dorsal ziehen markierte Zellstreifen über die gesamte Breite der jeweiligen posterioren Grenze der Segmentanlagen im Regenerat. Ventral hingegen beschränken sich die Markierungen auf die Parapodialanlagen. Auffällig ist, dass dorsal gelegene Teile von Parapodialanlagen nur posteriore Markierungen aufweisen. Je ventraler die Parapodialanlagenstrukturen, desto weiter reicht die Markierung in anteriore Richtung (Abb. 25C).

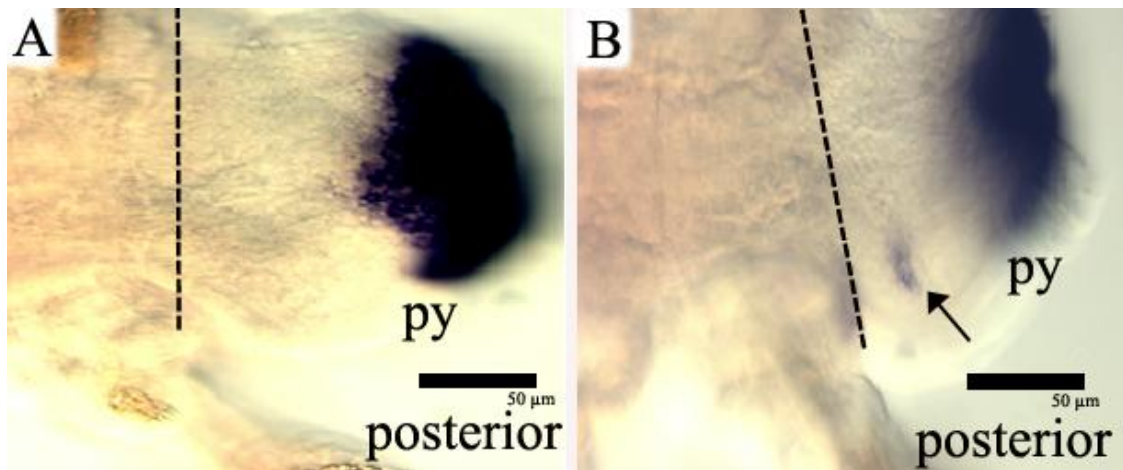


Abbildung 21

In situ Hybridisierung an einem 2,5 Tage alten Regenerat mit pduwnt-1 Sonde

A: dorsale Ansicht: Das Pygidium (py) ist noch nicht vollständig ausgewachsen, um die Anus Öffnung ist eine starke *pduwnt-1* Markierung lokalisiert. **B:** ventrale Ansicht: neben der Anusöffnung ist nahe der Schnittstelle (gestrichelte Linie) ein kleiner Streifen an Zellen markiert (schwarzer Pfeil).

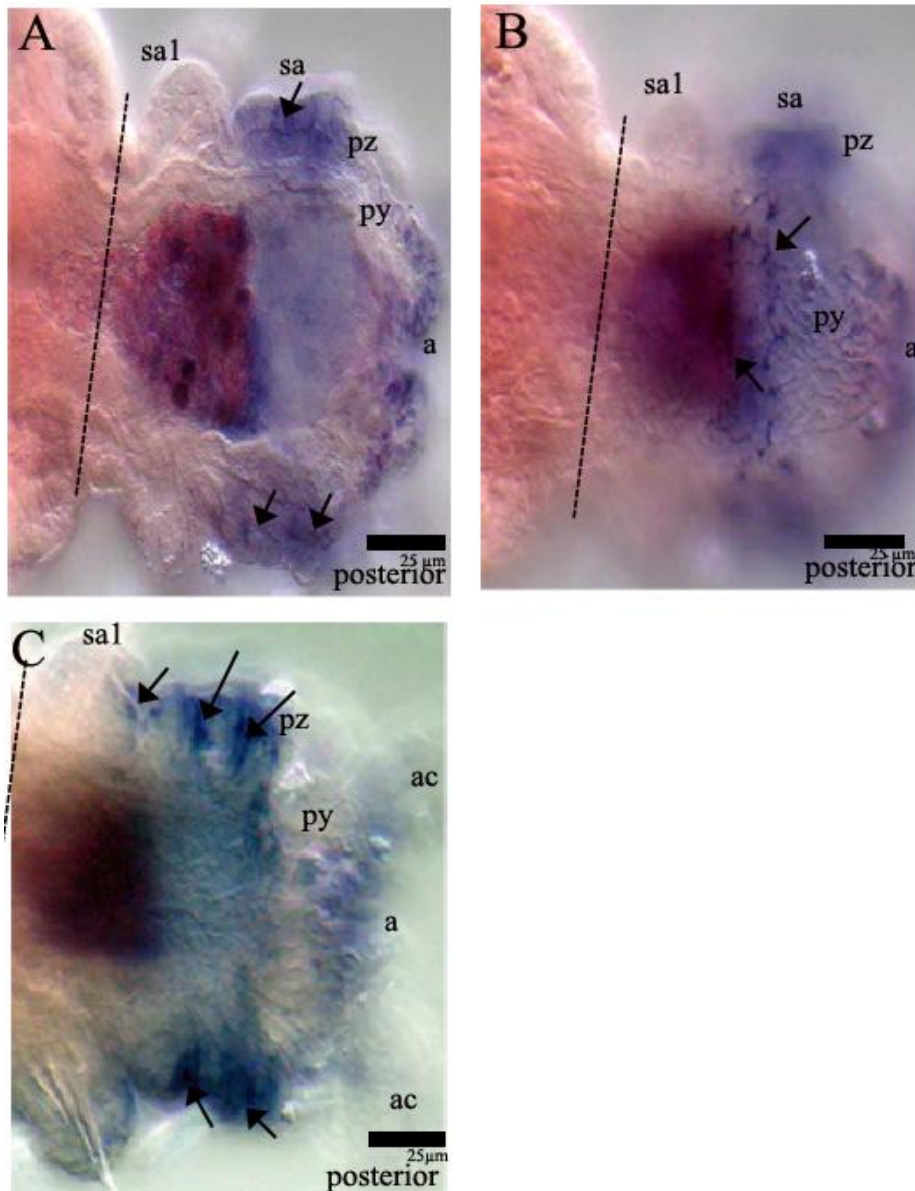


Abbildung 22

***In situ* Hybridisierung an einem drei Tage altem Regenerat mit *pduwnt-1* Sonde**

A: mediane Ansicht: *pduwnt-1* Markierungen sind an den posterioren Segmentgrenzen der jüngsten Segmentanlagen lokalisiert. Daneben sind Zellen am Anus und etwa 7 Zelldiameter von der Anusöffnung entfernt deutlich markiert. **B:** dorsale Ansicht: Markierungen treten an der gesamten posterioren Grenze der ältesten Segmentanlage, der unmittelbar posterior benachbarten jüngeren Segmentanlage (schwarze Pfeile) und an Zellen am Anus auf.

C: Ventrale Ansicht: Deutliche Markierungen sind an den lateralen posterioren Grenzen vom ältesten und den beiden darauffolgenden jüngeren Segmentanlagen lokalisiert (schwarze Pfeile). Die PZ zeigt eine *pduwnt-1* Markierung bis kurz vor der ventralen Mittellinie

Amputationsstelle (gestrichelte Linie), Anus (a), Analcirren (ac), Segmentanlagen (sa), ältesten Segmentanlage (sa1), Proliferationszone (pz), Pygidium (py)

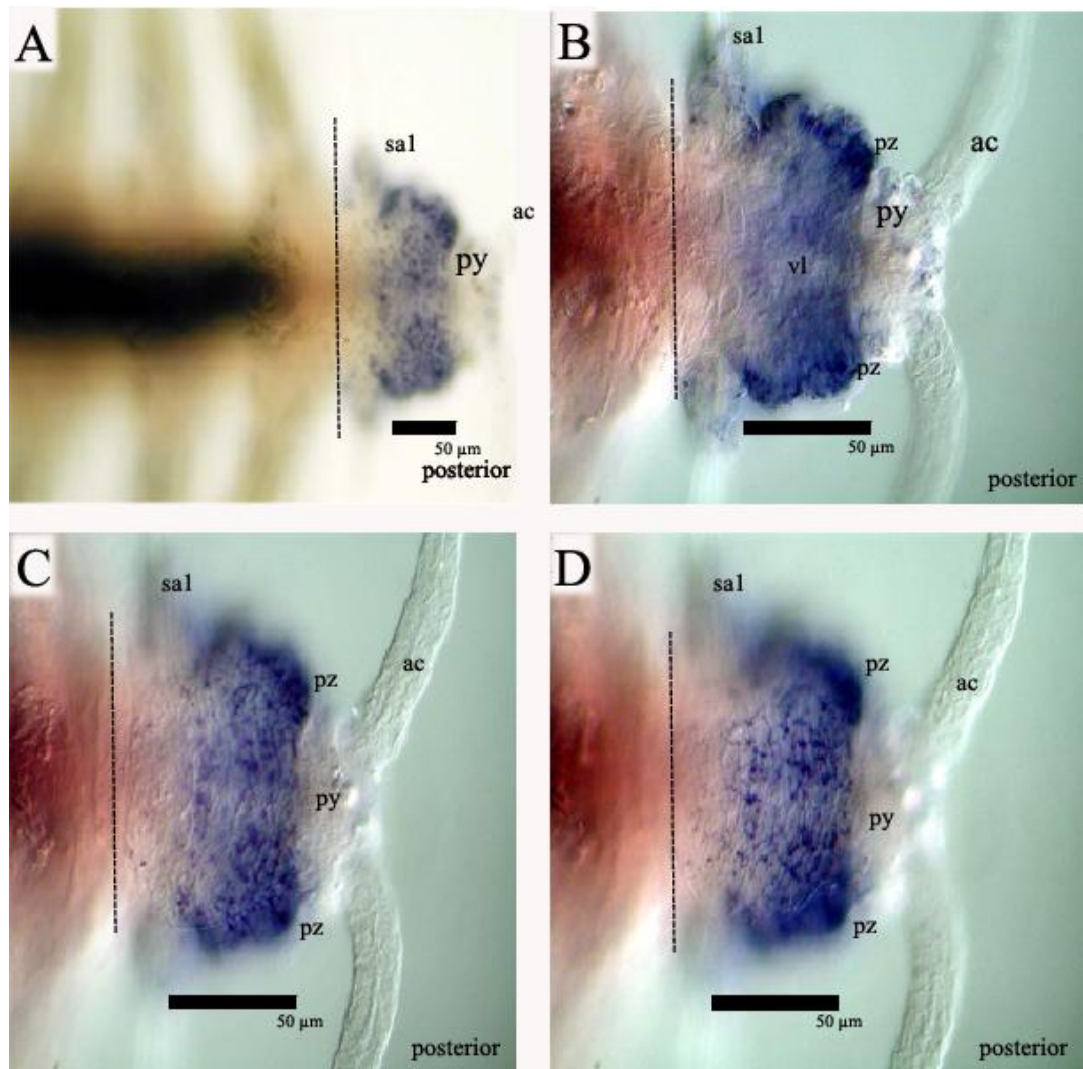


Abbildung 23

***In situ* Hybridisierung an einem 3,5 Tage alten Regenerat mit *pduwnt-1* Sonde**

A: Gesamtübersicht dorsal; *pduwnt-1* Markierungen sind ausschließlich im Regenerat (posterior der Amputationsstelle) zu finden. **B:** Detailaufnahme ventral; Markierungen sind lateral an den Segmentgrenzen (Pfeil) und der Proliferationszone lokalisiert. Keine Markierungen finden sich hingegen auf der ventralen Mittellinie, Pygidium und den Analcirren. **C/D:** Detailaufnahmen dorso-median: Starke Markierungen sind auf der Proliferationszone, den jeweiligen posterioren Segmentgrenzen der ältesten und der folgenden Segmentanlagen (schwarze Pfeile) lokalisiert.

Amputationsstelle (gestrichelte Linie), älteste Segmentanlage (sa1), Analcirren (ac), ventrale Mittellinie (vl), Proliferationszone (pz), Pygidium (py),

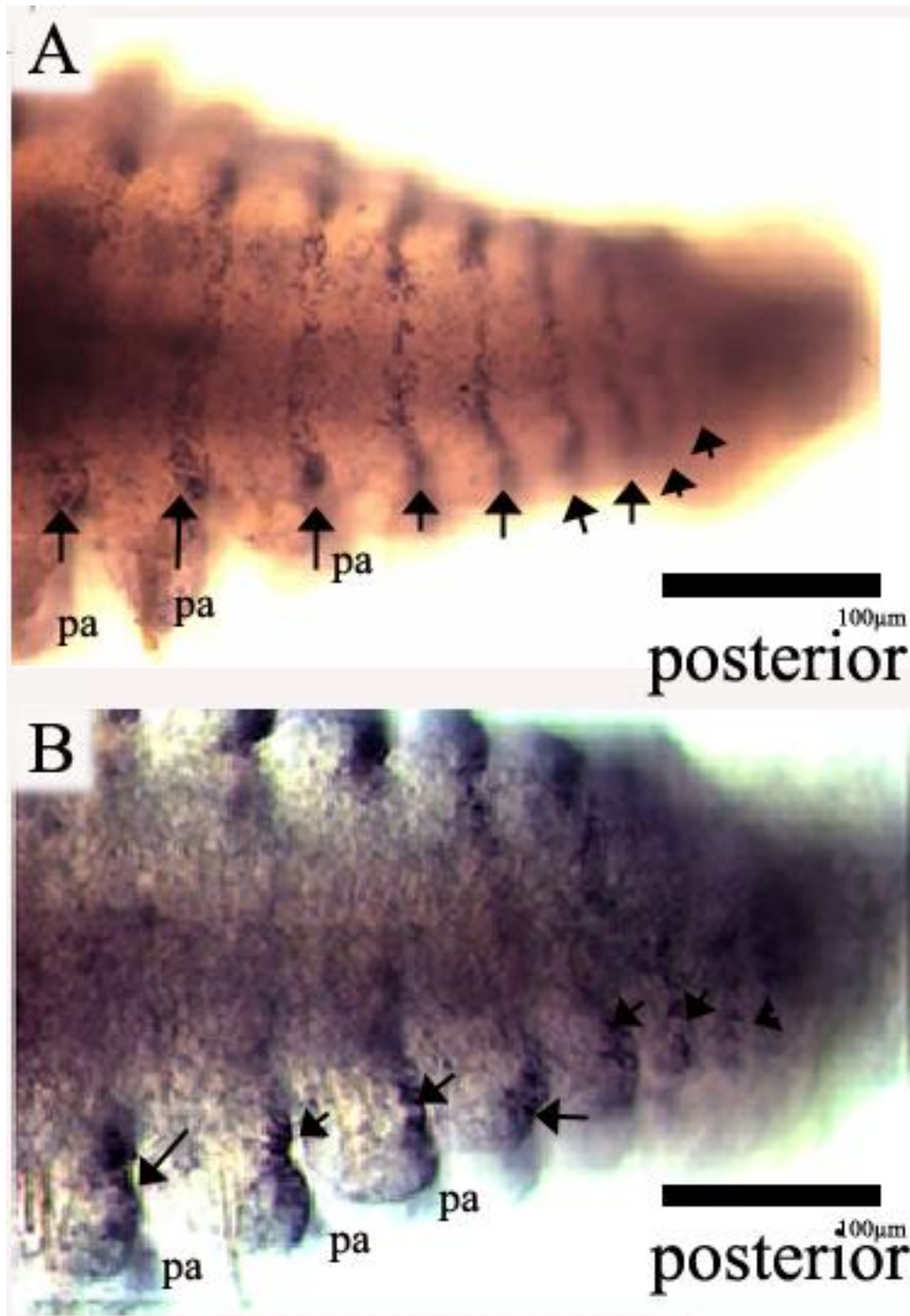


Abbildung 24

***In situ* Hybridisierung an einem 8,5 Tage alten Regenerat mit *pduwnt-1* Sonde**

A: dorsale Ansicht des Regenerats; Markierungen sind an der posterioren Grenze der einzelnen Segmentanlagen lokalisiert (schwarze Pfeile). Auffällig ist die Verbreiterung der einzelnen markierten Zellstreifen in anteriorer Richtung. **B:** ventrale Ansicht: Markierungen sind überwiegend an der posterioren Basis der Parapodialanlagen (pa) lokalisiert (schwarze Pfeile).

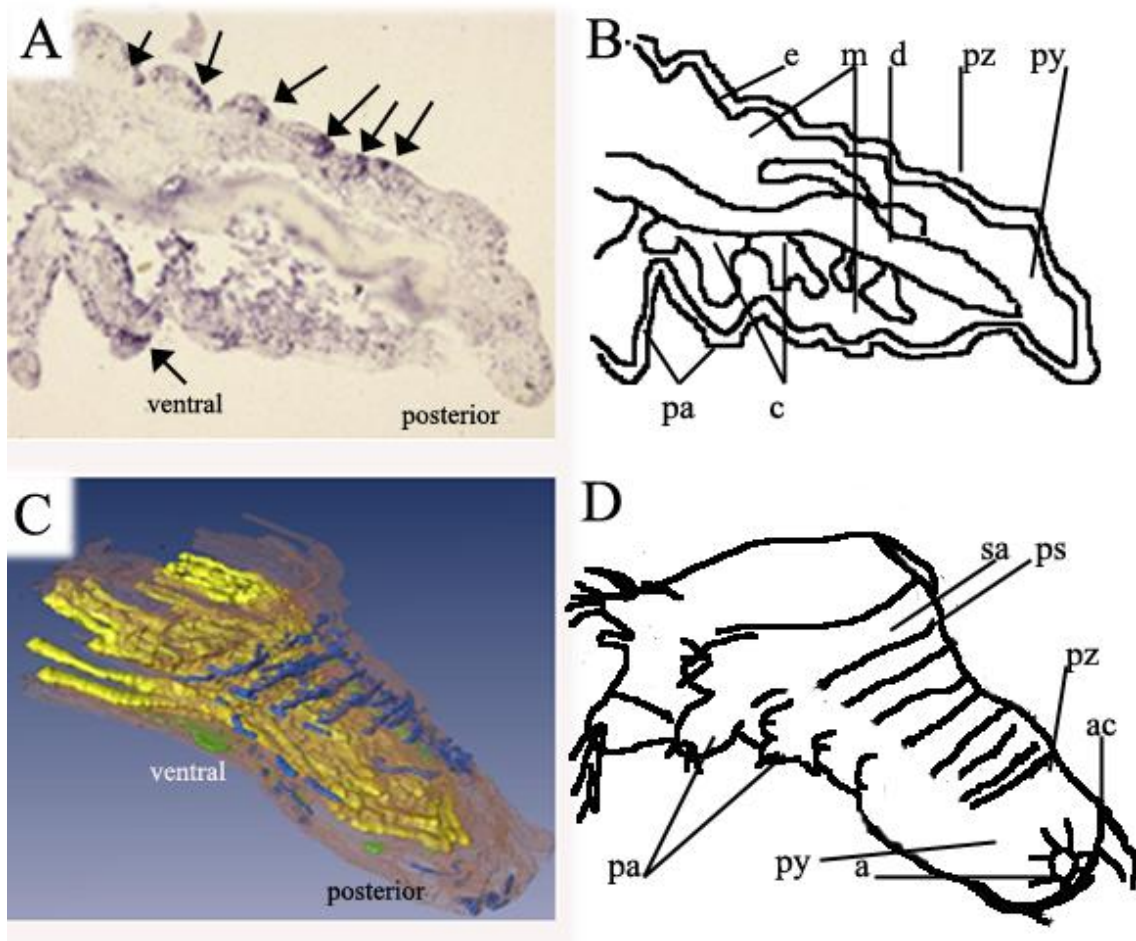


Abbildung 25

Markierung der segmentalen Grenzen nach *in situ* Hybridisierungen mit *pduwnt-1* Sonde in 3D Rekonstruktionen von 7-8 Tage alten Regeneraten.

A: Dorsale Längsschnitte mit epidermalen Zellen: Markierungen sind an den posterioren Grenzen der Segmente und Parapodialanlagen lokalisiert (Pfeile). Auf der Schematischen Darstellung auf **B** sind Coelom (c), Epidermis (es), Darm (d), Parapodialanlagen (pa), Proliferationszone (pz) und Pygidium (py) dargestellt **C/D:** 3D-Rekonstruktion der mit *pduwnt-1* markierten Regenerate: *pduwnt-1* Expressionen (blau) sind überwiegend an epidermalen (rötlich transparent) posterioren Parapodialanlagen, epidermal dorsalen posterioren Segmentgrenzen und dem Anus lokalisiert. Auf der schematischen Darstellung (D) sind Anus (a), Analcirren (ac), Parapodialanlagen (pa) posteriore Segmentgrenzen (ps), Segmentanlagen (sa), Proliferationszone (pz) und Pygidium (py) dargestellt.

4 Diskussion

Durch seinen recht ursprünglichen Körperaufbau und seiner einfachen Haltung ist *Platynereis dumerilii*, wie kaum ein anderes Tier, dazu geeignet, die Segmentneubildung exemplarisch für die Polychaeten zu studieren. Sorgfältige Analysen der Segmentierungsvorgänge bei den Lophotrochozoa sind selten, und bei Polychaeten existieren nur ältere Arbeiten (z.B. Hofmann, 1966). Ziel dieser Arbeit war es deswegen, die Segmententstehung in *Platynereis* mit morphologischen, zellbiologischen und molekularbiologischen Methoden näher zu untersuchen. Dazu wurden REM, TEM und KLSM Analysen von postlarvalen Wachstums- und Regenerationsstadien angefertigt. Die nachfolgende Diskussion betrachtet die eigen gewonnen Daten der Normalentwicklung und der Regeneration und setzt diese in Kontext zu Ergebnissen anderer Autoren. Mit dieser kritischen Betrachtung hoffe ich einen Beitrag zur phylogenetischen Diskussion der Segmentierung im Allgemeinen und der Anneliden im Speziellen, leisten zu können.

4.1 Postlarvales Wachstum

Platynereis dumerilii durchläuft im Lebenszyklus verschiedene Entwicklungsstadien. Aus einer frei schwimmenden Larve, der Trochophora entsteht nach drei Tagen ein dreisegmentiger Jungwurm. Dieser ist unterteilt in Kopf, dem Prostomium, Rumpf, den parapodientragenden Segmenten und den posterioren Bereich, dem Pygidium. Neue Segmente entstehen erst im Zuge des postlarvalen Wachstums. Tachezy (1999), Janaitis (2002) und diese Arbeit zeigen, dass die postlarvale Sprossung von neuen Segmenten sich nicht unmittelbar an die Larvalphase anschließen. Einzelne Tiere bilden erst nach etwa drei bis vier Wochen neue Segmente aus. Andere Tiere brauchen noch länger. Im Gegensatz zur Larvalphase gibt es also ein höchst variables Zeitfenster für die Bildung neuer Segmente. Die Gründe für eine solch lange Verweildauer im 3-segmentigen Stadium können vielfältig sein. Da die 3-segmentigen Jungwürmer ausreichend mit Dottersubstanzen ausgestattet sind (davon etwa bis zu 30 Tage zehren) und sich in ihrem natürlichen Habitat im Pelagial schwimmend fortbewegen, besteht kein zwingender Grund zur Körperumgestaltung. Fest steht, dass der Wurm erst dann anfängt neue Segmente auszubilden, wenn der Kopf vollständig ausgewachsen ist (Hauenschild und Fischer 1969) und das vorderste Segment im Prozess der Cephalisation beginnt die Borsten abzuwerfen und die Cirren zu verlängern (Fischer,

1985). In dieser Phase wechseln die Tiere im Habitat zur benthischen Lebensweise. Offensichtlich ist die Segmentbildung eng mit der neuronalen Entwicklung des Kopfes gekoppelt. Denkbar wäre hier ein Mechanismus der über eine Blockade der Zellzyklen in der Proliferationszone ein Auswachsen von neuen Segmenten verhindert und erst nach Einsetzen dieses Prozesses aufgehoben wird. Dies soll im Kapitel Proliferation näher diskutiert werden.

Die vorliegende Arbeit zeigt die äußerlichen Merkmale der Segmententstehung auf licht- und rasterelektronenmikroskopischer Ebene. Aus dem neu gebildeten Zellmaterial in der Proliferationszone entsteht das erste postlarvale Segment. Dieses ist zunächst eine schmale Segmentanlage zwischen Pygidium und dem bereits ausdifferenziertem Segment. Diese wird durch Neubildung von Zellmaterial aus der Proliferationszone (PZ) verlängert. Es folgt ein Wachstum in die Breite und das Ausbilden von Parapodialanlagen.

Ventral ist die Segmentanlage länger als auf der dorsalen Seite. Offensichtlich wird mehr Zellmaterial für die Bildung von ventralen Organen, wie z.B. dem ventralen Nervenstrang, benötigt, als für dorsale Strukturen. REM Analysen von Tieren mit zwei Segmentanlagen zeigen, dass die ältere Segmentanlage jedoch dorsal länger ist als ventral. Damit ist das Wachstum innerhalb eines Segmentes regional verschieden. Zunächst wird verstärkt Zellmaterial für ventrale Strukturen (Nerven- und Exkretionssystem sowie Parapodialanlagen) produziert. Erst wenn sich ventral diese Strukturen ausdifferenzieren, wird vermehrt dorsal neues Zellmaterial gebildet.

Denkbar wäre aber auch dass der Verbrauch von Zellen ventral zu einer relativen Verkürzung führt oder sich die Zellen dorsal flächig verbreiten.

Die Tatsache, dass äußerlich sichtbare Parapodialanlagen nur in der älteren Segmentanlage auftreten, sprechen dafür, dass die jüngste Segmentanlage in ihrem Wachstum solange verharret bis diese Parapodialanlagen des zweitjüngsten Segments vollständig ausdifferenziert sind. Gleichzeitig setzt wohl auch eine Blockade der Proliferationszone ein, denn in dieser Phase entstehen keine neuen Segmentanlagen. Offensichtlich ist der Differenzierungsgrad des vorangehenden Segmentes entscheidend für das Wachstum einer Segmentanlage und für die Produktion von neuem Material aus der Proliferationszone. Vollständig ausdifferenzierte Segmente führen damit zur Aufhebung der Blockade der Proliferationszone. Diese morphologischen Befunde werden von den proliferations- und molekularbiologischen Studien gestützt und sollen in den entsprechenden Kapiteln weiter diskutiert werden.

4.1.1 Bildung von Oberflächenstrukturen

REM Aufnahmen zeigen, dass die Oberfläche der Rumpfsegmente eine besondere Textur der Cuticula besitzt.

Die Cuticula wird bei *Platynereis* wie bei allen anderen Anneliden durch fortwährendes Wachstum erweitert (Hauenschild, 1969). Die Cuticula ist bei *Platynereis* weitgehend durchsichtig und etwa 3-5 µm dick. Längs- und Querfibrillen bilden übereinander liegende Schichten aus. Von der Epidermis aus durchziehen Mikrovilli die Cuticula bis zum apikalen Rand. Dadurch ist die Cuticula fest in der Epidermis verankert. Damit dient sie als elastisches Exoskelett (Hauenschild, 1969). Apikale Bereiche der Cuticula werden als Epicuticula bezeichnet. Sie unterscheiden sich vom basalen Teil durch ein Fehlen oder einer sehr schwachen Ausbildung der Cuticularfibrillen. Die Epicuticula schließt nach außen nicht plan ab, sondern weist kleine Erhebungen auf ihrer Oberfläche auf. Diese Oberfläche zeigt sich in den REM Aufnahmen als regelmäßig angeordnete Vorwölbungen. Diese Textur kommt auf der gesamten Oberfläche des Wurmes vor. Allerdings ist die Dicke und Ausprägung der Cuticula nicht überall identisch. An der Basis der Peristomialzirren wird die Cuticula z.B. bis zu 12 µm dick (Hauenschild, 1969). Wie REM Aufnahmen der vorliegenden Arbeit zeigen, verändert sich die Ausprägung der Rumpfsegmentoberfläche im Laufe der Entwicklung. In jungen Tieren (5-10 Segmente) ist ventrolateral die Längsmuskulatur als Leistenstruktur zu erkennen, während dorsal die Oberfläche eher eben erscheint. Im Laufe des Wachstums wird die Cuticula insgesamt dicker und das ventrale und dorsale Erscheinungsbild gleicht sich aneinander an. Die im REM Präparat sichtbaren Leistenstrukturen sind bei älteren Stadien (>40 Segmenter) nicht mehr vorhanden. Dafür gibt es nun deutlich abgesetzte intersegmentale Bereiche. Diese ausgeprägten intersegmentalen Bereiche deuten darauf hin, dass an den Segmentgrenzen die Cuticula nur schwach ausgeprägt ist. Dieser Aufbau erinnert an Gelenkhäute von Arthropoden. Damit wird die Beweglichkeit zwischen den einzelnen Segmenten trotz wachsender Cuticula sichergestellt. In jedem Rumpfsegment ist ein deutlicher Unterschied zwischen anterior und posterior zu erkennen. Anterior ist die Cuticula im REM Präparat um etwa 5-10 µm höher als posterior. Zusätzlich gibt es an der posterioren Grenze eines jeden Rumpfsegmentes eine halbkreisförmige Einbuchtung. Damit wird deutlich, dass die Epidermis eines Rumpfsegmentes regionale Identitäten besitzt. Diese Überlegung soll in den Kapiteln über die Zellproliferation und Expression von *pduwnt-1* weiter ausgeführt werden.

4.1.2 Organisation der inneren Organe

4.1.2.1 Muskulatur

Der innere Aufbau der Segmentierung ist gekennzeichnet durch mesodermale Strukturen wie Muskulatur, Coelomepithel, Blutgefäße, Coelomocyten und Metanephridien (Hauenschild, 1969). Ein wichtiger Bestandteil dieser segmentalen Organisation ist die muskuläre Auskleidung eines Segmentes. Die Muskelorganisation ist stark am inneren segmentalen Aufbau beteiligt, auch wenn die Längsmuskelstränge segmentübergreifend aufgebaut sind.

Im REM ist die Ringmuskulatur als dünne Schicht unter der Epidermis und transversale Muskeln als dicke seitliche Parapodialstränge erkennbar. Daneben lassen sich im REM Präparat solche Muskelstränge auf den Dissepimenten und der Darmwand wiederfinden. Während die Ringmuskulatur sich relativ leicht von der Epidermis lösen kann, sitzen die transversalen Muskelbänder fest verankert an der Parapodialwand oder dem Dissepiment. Somit ist dieser Typus entscheidend an der segmentalen Organisation des Tieres beteiligt, kleidet die jeweiligen Coelomräume aus und verstärkt die Abgrenzung zu Epidermis und Darm.

Die äußere sichtbare Segmentierung des Rumpfes setzt sich im Inneren fort. Diese innere Segmentierung ist im REM Präparat deutlich an der Aufteilung des Rumpfes in abgetrennte große Hohlräume, die sich zwischen Darmwand und Körperwand befinden, erkennbar. Diese Hohlräume entsprechen dem Coelom, der sekundären Leibeshöhle. Diese ist, nach Hauenschild und Fischer (1969) nicht vollständig mit einem Coelomepithel ausgekleidet, sondern wird auch durch direkt an die Basallamina der Epidermis bindende Muskulatur abgegrenzt. Im allgemeinen Aufbauschema von Anneliden werden die einzelnen Coelomkammern vollständig von Dissepimenten und Mesenterien voneinander getrennt (Westheide und Rieger, 2007). Die Blutgefäße überwinden dann diese angelegte Partitionierungen des Körpers und sorgen so für einen Stoffaustausch. Das Blutgefäßsystem entsteht durch Aneinanderlagern der extrazellulären Matrices zweier Epithelien, zwischen denen sich Blut als eine flüssige extrazelluläre Matrix einlagert (Hauenschild, 1969; Ruppert, 1991; Westheide, 1997). Bei *Platynereis* ist diese Partitionierung jedoch nur beim dreisegmentigen Jungwurm vollständig (Hauenschild, 1969). Postlarval werden Dissepimente angelegt, die Segmente nicht vollständig voneinander trennen. Median trennen anstelle von Mesenterien Dorsal- und Ventrallängsblutgefäße die Coelomräume voneinander

(Hauenschild, 1969). Im REM Präparat ist das Dorsalgefäß als fest an die Ringmuskelschicht angeheftete und auf dem Darmdach liegende Struktur sichtbar. Die Coelomräume werden also durch das Dorsalgefäß nicht vollständig voneinander getrennt. Es gibt keine vollständige mesodermale Trennung der Rumpfsegmente, trotzdem ist eine deutliche segmentale innere Organisation von mesodermalen Organen zu erkennen.

Muskeln von *Platynereis* werden nach Hauenschild und Fischer (1969) in drei verschiedene Typen eingeordnet. Der erste Typ ist mit der einen Längsseite der ganzen Länge nach mit der Basalmembran der Epidermis oder des Coelomepithels verbunden. Zu diesem Typ gehören die Ringmuskeln der Rumpfwand und auch einige der transversal verlaufenden Muskelbänder der Parapodien. Ringmuskeln umspannen den gesamten Innenraum und spielen eine wichtige Rolle in der Aufrechterhaltung des hydrostatischen Druckes der Coelomflüssigkeit.

Der zweite Muskeltyp sitzt an einer weit in das Coelom hineinragenden Basalmembran und entspricht den vier Längsmuskelsträngen. Im REM ist die segmentübergreifende Struktur dieser Stränge gut zu erkennen. Dabei durchsetzen sie das Dissepiment nicht passgenau, sondern lassen einen kleinen Freiraum zwischen Muskulatur und Septum. Damit wird auch deutlich, dass es keine vollständige Abtrennung zwischen den Segmenten gibt. Ventral sind die Stränge größer und dadurch auch in jungen Stadien mit einer dünnen Cuticula als Längsleisten im REM Präparat zu erkennen. Dorsal besitzen sie die Form von flachen, nach innen offenen Rinnen. Dadurch ist es schwieriger sie im Totalpräparat zu finden. Zumeist sind sie durch die Öffnung der Körperwand stark beschädigt. Dieser Muskeltypus ist damit nicht segmental organisiert, sondern durchzieht den gesamten Wurm.

Der dritte Muskeltyp ist nur an den beiden Enden mit einer Basalmembran verbunden und zieht damit frei durch den Coelomraum. Dieser Muskeltyp entspricht den transversalen Muskeln der Parapodien und der Acicularmuskulatur. Im REM Präparat ist diese Form der Verankerung der Aciculae gut erkennbar. Das proximale Ende des Aciculums befindet sich in einer Muskelschlinge, so dass sie zwar fest verankert aber trotzdem frei beweglich ist.

Somit entspricht die Muskelorganisation in *Platynereis* dem allgemeinen Aufbau von Anneliden (Dales, 1963; Gardiner, 1992; Lanzavecchia et al., 1988). Neuere Diskussionen stellen den Allgemeincharakter dieser Muskelanordnung jedoch in Frage (Filippova et al., 2004; Purschke und Müller, 2006; Tzetlin und Filippova, 2005; Tzetlin et al., 2002). In neueren Studien wird der muskuläre Aufbau von verschiedenen

Polychaeten-Spezies detailliert untersucht (Filippova et al., 2004; 2006; Muller und Worsaae, 2006). Bei *Nerilla antennata*, *Nerillidium* sp. und *Trochonerilla mobilis* (Nerelidae), *Magelona cf. mirabilis* (Magelonidae) und *Prionospio cirrifera* (Spionidae) *Dorvillea kastjani* (Dorvilleidae) wird insbesondere das Fehlen oder die starke Reduktion von Ringmuskeln festgestellt und nicht mehr als Ausnahme, sondern als weit verbreitet unter Polychaeten diskutiert. Fest steht, dass Ringmuskeln in Polychaeten nicht so stark ausgebildet sind wie in Clitellaten. Diese Tatsache lässt sich darauf zurückführen, dass unter den Clitellaten die grabende Lebensweise weit verbreitet ist und damit eine starke Ringmuskulatur benötigt wird. Längsmuskulatur wird hingegen in Polychaeten oft in diskreten Muskelsträngen ausgebildet, zumeist zwei dorsale und zwei mächtigere ventrale Stränge (Tzetlin und Filippova, 2005.) Clitellaten hingegen sollen in ihrer Mehrheit eine Längsmuskelschicht besitzen (Purschke, 2002; Purschke und Müller, 2006). Diskrete Längsmuskelstränge sollen in Articulaten eine Synapormorphie darstellen (Rouse und Fauchald, 1997) und demzufolge die Längsmuskelschicht in Clitellaten ein abgeleitetes Merkmal darstellen. Ob Clitellaten ein Monophylum darstellen oder aber zusammen mit den Polychaeten ein Paraphylum bilden, wird diskutiert (Martin, 2001; Purschke, 1997; 2002; Struck et al., 2002; Westheide, 1997). Diese phylogenetische Diskussion, welche auch wichtig für die Einordnung der Segmentierung innerhalb der Anneliden ist, soll in folgenden Kapiteln fortgesetzt werden.

4.1.2.2. Metanephridien

Neben der Muskulatur ist auch das Exkretionssystem, in Form der Metanephridien, segmental aufgebaut.

Diese Arbeit zeigt, dass zu Beginn der postlarvalen Entwicklung der Wurm ein Paar Nephridien im dritten Deutomersegment besitzt. Die Nephrostome sind sehr klein und unterscheiden sich kaum von dem anschließenden Nephridialtubus. Dieser besteht aus nur einem langgestreckten Kanal, welcher in ventraler Richtung zieht und auf der Höhe des ventralen Nervenstranges um 90° in posteriore Richtung wechselt und in unmittelbarer Nachbarschaft des Parapodialgefäßsystems in den Nephridialporus mündet. Eine spezielle Öffnung durch die Cuticula hindurch konnte weder in dem REM Präparaten, noch mit KLSM gefunden werden. Histologische Untersuchungen an anderen Polychaeten, z.B. bei *Hesionides arenaria* (Westheide, 1986) und *Sphaerodorum flavum* (Kuper und Purschke, 2001) zeigen, dass die Ausmündungen der Segmental-

organe die Cuticula nicht durchbrechen. Somit ist es auch bei *Platynereis* denkbar, dass der Harn eine intakte Cuticula passieren muss, und es damit keine spezielle Öffnung für den Nephridiporus gibt.

Der dreisegmentige Jungwurm weist also nur ein Paar Metanephridien auf. Zusammen mit den Kopfnieren besitzt der Wurm damit eine ausreichende Exkretionsorganisation. Mit dem postlarvalen Wachstum muss dieses System jedoch erweitert werden. Tatsächlich wachsen aber erst mit dem 2. Tritomerensegment auch ein Paar neue Metanephridien aus. Die Nephridialanlage wird in Nereiden, aber auch in anderen Polychaeten- und Oligochaetengruppen, direkt an der entstehenden mesodermalen Segmentgrenze angelegt (Bartolomaeus, 1999). Im Zuge des segmentalen Längen- und Breitenwachstums wächst diese Anlage in posteriorer Richtung aus und bildet so den Nephridialtubus. Die Anlage selbst verbreitert sich und bildet so das Nephrostom. Wenn larval nur eine Metanephridialanlage im mittleren Segment angelegt wird, so kann die nächste Nephridialanlage erst mit dem Auswachsen der posterioren Grenze des ersten Tritomersegmentes gebildet werden. Dementsprechend finden sich keine Nephridialtuben im 1. Tritomersegment. Das Tritomernephrostom selbst unterscheidet sich deutlich von dem Deutomernephrostom. Es ist deutlich trichterförmig aufgebaut und größer als der sich anschließende Nephridialtubus. Zudem befindet sich das Nephrostom auf der gleichen Ebene mit dem ventralen Nervenstrang. Alle nachfolgenden Tritomere behalten diese Nephridialorganisation bei. Das Nephrostom wird im Laufe des weiteren Segmentwachstums deutlich breiter, behält aber die ventrale Lage bei.

Nephridialkanäle sind im Vergleich zu den Metanephridien in Deutomeren nicht nur länger, sondern bilden Windungen aus. Innerhalb der Polychaeta wurde bei Nereidae (Smith und Ruppert 1988, Smith 1992) dieser gewundene Aufbau der Kanäle bereits beschrieben. Andere Polychaeten weisen Variationen auf, so haben Syllidae und Spionidae einfache unverzweigte Gänge (Smith und Ruppert 1988, Smith 1992).

Es gibt also (neben der Kopfniere) einen deutlichen Unterschied zwischen larval angelegten und postlarvalen Metanephridien in *Platynereis dumerilii*. Damit wird die Beschreibung von Hauenschild (1969) der Nephrostome und Nephridialtuben bei subadulten und epitoken Stadien, entscheidend ergänzt.

Exkretionsorgane der Polychaeten wurden bereits Ende des 19. Jahrhunderts und zu Beginn des letzten Jahrhunderts sehr ausführlich von Goodrich (1898a; 1898b; 1900; 1945) untersucht. Er definierte Metanephridien als Exkretionsorgane, die mit einem

Trichter (Nephrostom) in der Körperhöhle beginnen und dann durch sich anschließende Nephridialtuben in einem Porus nach außen münden. Weiterhin gibt es bei Polychaeten aber auch Protonephridien, die blind in der Körperhöhle beginnen und über einen mehr oder weniger langen Kanal durch einen Porus nach außen münden (Goodrich, 1945). Unterschiede in der Exkretionsorganisation zwischen larvalen und postlarvalen Stadien sind auch bei anderen Polychaeten zu beobachten. Der Umstand, dass Protonephridien und Metanephridien nacheinander in der Entwicklung einiger Arten auftauchen, ließ bereits in der Vergangenheit Raum für Spekulationen. Goodrich (1945) betrachtete das Protonephridium als das plesiomorphe Exkretionsorgan innerhalb der Polychaeta, während das Metanephridium das apomorphe Organsystem darstellt, welches aus dem Protonephridium entstanden ist. Diese postulierte Homologisierung der Meta- und Protonephridien von Goodrich (1945) basiert auf Untersuchungen an Polychaeten, deren Juvenilstadien Protonephridien und deren adulte Stadien Metanephridien besitzen. Heute werden (im allgemeinen) Metanephridien als die primären Exkretionsorgane der adulten Polychaeten und Protonephridien der Larven angesehen (Bartolomaeus, 1995; 1999; Ruppert und Smith, 1988).

In Polychaetenlarven sind Protonephridien die einzigen Exkretionsorgane (Bartolomaeus, 1995; 1999; Wessing und Polenz, 1974). Protonephridien sind zum Beispiel innerhalb der Phyllodocida, zu denen auch die Nerediae gehören, weit verbreitet (Kuper und Purschke, 2001). Von 23 Familien der Phyllodocida besitzen die adulten Individuen von neun Taxa Protonephridien, ebenfalls neun Taxa Metanephridien, zwei Taxa beide Organtypen, und die restlichen Typen sind unbekannt (Kuper und Purschke, 2001).

Protonephridien in Larvalstadien kommen also in einer Vielzahl von Polychaeten vor. Metanephridien sowie Protonephridien sind in adulten Arten zu finden. Weiterhin gibt es noch einen dritten Typus, die intermediären Metanephridien, wie sie bei Sylliiden vorkommen (Kuper und Westheide, 1997). Dabei handelt es sich um Übergangsformen zwischen Protonephridien und Metanephridien. Bei Polychaeten mit kleinen Coelomräumen wächst das Metanephridium nicht vollständig aus und funktioniert demnach genauso wie Protonephridien (Bartolomaeus, 1999). Die Tatsache, dass bei den vorliegenden Befunden in *Platynereis* die deutomeren Nephridien kein eindeutigen Wimperntrichter besitzen und auch dessen Form sich vom Tritomernephridium unterscheidet lässt vermuten, dass es sich vielleicht um die von Bartolomeus (1999) beschriebenen nicht vollständig ausdifferenzierten Metanephridien oder aber vielleicht

sogar um intermediäre Metanephridien handeln könnte. Damit hätte *Platynereis* mit der Kopfniere, den deutomerer Nephridien und den Metanephridien des Tritomer drei entwicklungsgeschichtlich aufeinanderfolgende Exkretionsorgane in passender anterior-posterior Richtung aufzuweisen. Klarheit können aber nur ultrastrukturelle Untersuchungen und weitere 3D-Rekonstruktionen in jungen postlarvalen Stadien geben.

4.2 Regeneration

Die vorliegende Arbeit zeigt den Vorgang des Wundverschlusses mit Hilfe von rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen. Dabei wird deutlich, dass innere Bereiche des Darmes in direktem Kontakt zur Epidermis gelangen. Außerdem zeigen die Befunde, dass bei größeren Verletzungen der Darm teilweise ausgestülpt und um den Wundbereich gebogen wird. Mit Ausnahme der Egel sind Anneliden zur Segmentregeneration fähig. *Platynereis dumerilii* kann verlorene caudale Körperteile ersetzen. Dieser Prozess ist erstmals von Nussbaum (1908) beschrieben worden. Hoffman (1966) beschrieb die Regeneration von *Platynereis dumerilii* als Epimorphose. Das Prostomium muss vorhanden sein, damit die Regeneration stattfindet. Eine andere Bedingung für die Regeneration ist der Entwicklungsgrad des Tieres. Ist die Geschlechtsreife zu weit vorangeschritten, bildet der Wurm nur ein neues Pygidium aus, ohne das erneute Wachstum von Rumpfsegmenten anzuschließen. Die Wundheilung wurde ebenfalls von Hoffmann (1966) beschrieben: Durch Kontraktion der Ringmuskulatur im Wundbereich wird der Darmrand nach außen gebogen und verschließt so die Wunde.

Ähnliche Beobachtungen machte auch Clark (1968; 1962) bei *Nephtys*. Dort wurde der Darm, abhängig von der Größe der Wunde, teilweise stärker (bei großen Wunden) oder schwächer ausgestülpt. Das hat die Wundheilungszeiten entscheidend beeinflusst. Je größer der Auswurf des Darmes war, desto länger dauerte auch insgesamt die Regeneration. Das wäre auch eine Erklärung für die großen Unterschiede in den Regenerationszeiten der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Tiere. Denn nach der Ausbildung des Pygidiums waren die Segmentbildungsgeschwindigkeiten zwar nicht synchron, aber doch sehr ähnlich, zumindest für Tiere des gleichen Entwicklungsstandes. Untersuchungen an *Dorvillea bermudensis* (Paulus und Müller, 2006) zeigen, dass auch hier posterior die Wunde durch das Umbiegen des Darmrandes provisorisch verschlossen wird. Diese Spezies kann auch anteriore Strukturen regenerieren. Diese

wird, analog zur posterioren Wunde, ebenfalls mit dem Umbiegen des Darmrandes verschlossen. Ähnliche provisorische Wundverschlüsse treten auch bei Oligochaeten auf (Myohara et al., 1999). *Enchytreus japonensis* verschließt die posteriore Wunde durch Interaktionen zwischen Darm und Epidermis. Anteriore Wunden werden jedoch durch Epidermiszellen abgedeckt.

Bei *Platynereis* sammeln sich nach dem provisorischen Wundverschluss freie Coelomocyten am Wundrand (Hofman, 1966). Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Aufnahmen am REM haben gezeigt, dass in der Lücke zwischen Darm und Epidermis am Wundrand Coelomocyten ein Geflecht aus Zellfortsätzen gebildet haben. Die Zellkörper entsprachen aufgrund ihrer Größe von 10-12 μm am ehesten den Eleocyten, während die Form nicht eindeutig zu bestimmen war. Die gebildeten Fortsätze überragten die Zellkörper und verknüpften so die einzelnen Eleocyten untereinander, aber auch Darm und Epidermis. Ähnliche gerüstartige Konstruktionen wurden bei anderen Polychaeten noch nicht beschrieben, wohl aber die Ansammlung von Coelomocyten an Wundrändern. Das hat Hofman (1966) bei *Platynereis*, Stephan-Dubios (1958) bei *Nereis diversicolor* und Clark und Clark (1962) bei *Nephtys* beobachten können. Laut Stephan-Dubois (1958) handelt es sich dabei um neoblastartige Stammzellen, die das Regenerationsblastem aufbauen und die damit der Ursprung des neuen Materials wären. Clark (1962) und auch Hofmann (1966) hingegen, sahen bei *Nephtys* und *Platynereis* keinen Hinweis auf eine Beteiligung der Coelomocyten bei der Bildung eines Regenerationsblastems die über einen Wundverschluss hinausgeht. Meine Beobachtungen am REM bestätigen dies. Dieses Gerüst wird zwar im Zuge des Wundverschlusses größer, wird aber, nach meinen Beobachtungen, nach Abschluss der Wunde abgeworfen. Während das Gerüst noch aufgebaut wird, entstehen in der Zwischenzeit um den Wundbereich herum wulstartige Verdickungen. In höheren Auflösungen lassen sich mehrere übereinander gestapelte Zellreihen erkennen. Clark (1962) und Hofman (1966) beschrieben in ihren jeweiligen Arbeiten einen De-differenzierungsprozess von dem Wundbereich benachbartem epidermalem Gewebe. Diese „reembryonalisierten“ Epidermiszellen bilden somit die Grundlage des neu zu bildenden Blastems.

Der Regenerationsprozess setzt sich mit der Ausbildung eines Regenerationsblastems fort. Wie oben schon beschrieben, zeigen die vorliegenden Aufnahmen bereits während des Wundheilungsprozesses Ansammlungen von kleinen Zellballen um den Wundbereich herum. Aus diesen Zellballen wachsen rund um den Anus in anteriorer Richtung

Zellreihen aus, aus denen sich das neue Pygidium mit zwei Analcirrenanlagen entwickelt. In diesem frühen Stadium der Regeneration zeigen die vorliegenden Aufnahmen von Semidünnschnitten an drei Tage alten Regeneraten die Gewebeorganisation. Dabei ist die angrenzende Region zum Stumpf deutlich hervorgehoben. Anterior und posterior befinden sich zwei Ringmuskelschichten, die eine zentrale „Einschmelzregion“ umschließen. Große Areale mit Abbauprodukten der Muskulatur sind dort zu finden. Hofmann (1966) und auch Clark (1962) beschrieben in ihren jeweiligen Arbeiten, dass zur Bildung des neuen Blastems vor allem epidermale Zellen dedifferenziert werden, Muskeln hingegen nur in geringem Maße. Diese wurden vorwiegend phagocytiert. Meine Beobachtungen bestätigen dies. Die elektronenmikroskopischen Befunde weisen darauf hin, dass alle muskulären Gewebsschichten, die während des Amputationsvorganges beschädigt worden sind, eingeschmolzen werden. Das eigentliche Blastem besteht aus undifferenzierten Zellen ohne erkennbare Einteilungen in mögliche zukünftige Segmentanlagen. Sich in Mitose befindende Zellen sind vor allem an der Epidermis und in unmittelbar darunter liegenden Zellschichten zu finden, woraus man schließen kann, dass auch hier das Zellmaterial von der epidermalen Schicht abstammt. Erste Differenzierungen in der frühen Regenerationsphase (1-3 Tage nach der Amputation) können in den Semidünnschnitten, aber vor allem in den TEM Aufnahmen beobachtet werden. Einzelne Muskelvorläuferzellen bilden einzelne Faserstrukturen aus. Daneben zeigen auch viele Zellen Phagocytoseprozesse. Das bedeutet, dass im Wurm Wundheilungsprozesse und die Bildung eines Regenerationsblastems parallel ablaufen. Dabei werden nicht erst geordnet die alten Strukturen sukzessive wiederhergestellt, sondern es wird so schnell wie möglich neues Gewebe gebildet und ausdifferenziert.

Oligochaeten bauen vor allem mit Kollagenfasern, welche aus Epidermiszellen gebildet werden, ein Gerüst auf, in das dann langsam Epidermiszellen einwachsen (Burke, 1974a; 1974b; 1974c). Dabei werden epidermale Zellen von der Cuticula getrennt und wandern in die Wunde ein. Egel sind nicht zur Regeneration ganzer Segmente fähig, können aber einzelne kleine verletzte Areale wieder reparieren. Dabei kommt es ebenfalls zu Dedifferenzierungserscheinungen der benachbarten Epidermis (Huguet und Molinas, 1992; LeGore und Sparks, 1971; 1973). Neuere Studien zeigen ein dem Vertebraten ähnlichem Wundheilungsmechanismus, indem ein komplexes Kollagengerüst aufgebaut wird (Tettamanti et al., 2005). Damit gibt es eine große Bandbreite an Wundheilungsmechanismen innerhalb der Anneliden.

Die Bildung von Pygidium und neuer Proliferationszone erfolgt sehr rasch. Die sich anschließende Bildung neuer Segmente erfolgt sukzessiv. Es werden nicht mehrere Segmente gleichzeitig angelegt, sondern nacheinander in rascher Abfolge neue gebildet. Damit entspricht der Regenerationsvorgang nicht dem larvalen Wachstumsprozess, sondern eher einem beschleunigten postlarvalen Wachstum. Auch innere Organe, wie z.B. die Metanephridien entwickeln sich gemäß den Beschreibungen des postlarvalen Wachstums (Kapitel 4.1.1.1). Nephrostome werden in ventraler Lage in der Nähe des ventralen Nervenstranges gebildet und differenzieren dort auch aus.

Trotzdem gibt es außer der Geschwindigkeit einige Unterschiede zum normalen postlarvalen Wachstum. Im postlarvalen Wachstum entstehen die Segmente aus der Proliferationszone und differenzieren in der Wachstumszone aus. Die Cuticula ist in diesem Bereich nicht von den nachfolgenden Segmenten zu unterscheiden. Sie besteht ebenfalls aus den zahlreichen vorgewölbten Strukturen. Diese im TEM Bild als wellenartige distale Abgrenzungen der Epicuticula erkennbaren Strukturen, kommen in frühen Regeneraten nicht vor. Die Cuticula ist hier sehr dünn und im TEM Bild ist deutlich, dass große Lücken zwischen der Cuticula und der angrenzenden Epidermis zu finden sind. Damit wird deutlich, dass während der Regeneration eine deutliche Reihenfolge von Wachstumsprozessen stattfindet. In diesem Fall wird zunächst viel Zellmaterial aus epidermalen Zellen produziert, die cuticuläre Oberfläche bleibt in den ersten sieben Tagen der Regeneration weitgehend unmodelliert. Grundsätzlich sind Wachstumspriorisierungen auch im Normalwachstum zu finden, wie die unterschiedliche Wachstumsgeschwindigkeit von Dorsal- und Ventralseite zeigt. Bei Regeneraten ist das in einem größeren Umfang zu beobachten. So gibt es außer dem langsameren Cuticula-wachstum auch beim Aufbau der inneren Organisation Unterschiede zum Normalwachstum. Parapodialanlagen werden erst nach etwa fünf Tagen (und fünf neugebildeten Segmenten) äußerlich sichtbar, Metanephridien etwa nach sieben Tagen (bei der ältesten Segmentanlage). In den ersten Tagen der Regeneration erfolgt, mit Ausnahme des Nervensystems, die Dedifferenzierung (und Neubildung) des Zellmaterials. Dieses Zellmaterial wird nach zwei bis drei Tagen zu Segmentanlagen kompartimentiert. Anschließend erfolgt eine rasche aber geordnete Bildung von neuen Segmentanlagen.

Die dünne Cuticula ermöglicht in REM Präparateneinzelne Zellen oder Zellpakete auf der Segmentoberfläche zu analysieren. Dabei wird deutlich, dass es eine unter-

schiedliche Zellverteilung innerhalb eines Segmentes gibt. Der posteriore Rand einer Segmentanlage besteht aus einer einheitlichen Reihe von kleinen Zellen, während in der Mitte und am anterioren Rand verschieden große Zellpakete auftreten. Auf REM Aufnahmen im normalen Wachstum kann man ebenfalls Unterschiede zwischen posterioren Rand und dem restlichen Segment feststellen. Offensichtlich werden schon früh in der Segmentbildung, während der Regeneration Grenzen und Struktur eines Segmentes festgelegt, was auch die Proliferations- und molekularen Studien dieser Arbeit (siehe folgende Kapitel) zeigen.

Die Segmente differenzieren rasch aus, so dass zwei Wochen nach Amputation etwa 14 neue Segmente gebildet worden sind, die zwar noch nicht die Größe der normal entwickelten Segmente besitzen, jedoch alle Parapodialstrukturen ausdifferenziert sind. Einen deutlichen Sprung gibt es dann nur zur unmittelbar jüngsten Segmentanlage, welche damit den Status einer normalen postlarvalen Wachstumszone erhält. Die Arbeiten von Hofmann (1966) und Clark (1962,1969) zeigten ähnliche Ergebnisse.

Da die Geschwindigkeit der Zellproliferation (siehe Kapitel 4.1.2 und 4.2.1), aber auch der Morphogenese von Segmenten, zwischen normal wachsenden Würmer und caudalen Regeneraten so unterschiedlich zu sein scheint, könnte man den Einfluss von morphogenetischen Faktoren postulieren, die diese Prozesse steuern. Pfannenstiel (1984) hat im Zusammenhang mit dem segmental organisierten Nervensystem beim Polychaeten *Ophryotrocha* einen Morphogen(längs)gradienten postuliert, der, ausgehend vom Pygidium, über das gesamte Tier verlaufen soll. Posterior soll die höchste Konzentration vorhanden sein. Ausgehend von diesem Morphogengradienten können den Zellen bestimmte Positionsinformationen vermittelt werden. Wattez-Combaz (1995) konnte die morphogenetische Einflüsse des Bauchmarks (oder Faktoren aus dem Bauchmark) zeigen. Die Ergebnisse von Hofmann (1966), Tachezy (1999) und der vorliegenden Arbeit zeigten bei Regeneraten in *Platynereis* eine Korrelation zwischen der Geschwindigkeit der Regeneration und der Anzahl von entfernten Segmenten. Das Tier bildete umso schneller neue Segmente, je mehr zuvor davon entfernt wurden. Möglich wäre, dass im Bauchmark eine Positionsinformation in Form von noch unbekannten Faktoren gespeichert liegt, die von posterior nach anterior abnehmen. Bei der caudalen Regeneration bestimmt die Differenz des Positionswertes des Cerebralganglions und des Blastems (Positionswert "0") die Rate der Segmentneubildung. Derselbe Gradient der Positionsinformation sorgt auch dafür, dass die Wachstumsrate, bzw. die Neubildung von Segmenten, im Alter der Tiere immer langsamer wird. Für

eine Beteiligung eines solchen vom Nervensystem stammenden Morphogens sprechen auch die Beobachtungen dieser Arbeit. Zum einem wird stets das Nervensystem in Wachstum und Differenzierung priorisiert. Erst dann erfolgt der Aufbau des restlichen Segmentes.

Zum anderen zeigten viele Regenerate, in Abhängigkeit der Größe und Richtung einer Schnittwunde, ein asynchrones Wachstumsverhalten zwischen linker und rechter Körperseite. Der ventrale Nervenstrang ist paarig aufgebaut. Ist bei einer Schnittwunde ein Großteil der Ganglienzellen einer Seite beschädigt worden, so werden diese schnell ersetzt und wirken damit auch auf die Differenzierungsgeschwindigkeit der jeweiligen Segmentseite. Die Differenz zwischen der Seite mit dem noch vollständig erhaltenen Parapodium weist eine kleinere Differenz zum Pygidium auf als die Seite ohne Parapodium. Da die Wachstumsgeschwindigkeit von der Differenz zwischen Kopf und Pygidium abhängt, entwickelt sich die Seite mit weniger Parapodien schneller als die Seite mit mehr Parapodien. Dabei orientieren sich beide Seiten an anterioren Signalen und differenzieren relativ unabhängig von der links/rechts Achse aus. Das zeigen Beispiele von asynchronen Regeneraten, denen auf einer Seite Parapodialstrukturen fehlten, sonst aber normal entwickelt waren. Zurzeit bestehen aber noch keine stofflichen Nachweise solcher Gradienten.

4.3 Proliferation in Postlarvalen- und Regenerationsstadien

4.3.1 Proliferation in postlarvalen Wachstum

Die Methode der BrdU-Markierung (modifiziert nach Gratzner, 1982) erlaubt es die DNA während der S-Phase mitotisch aktiver Zellen so zu markieren, dass die markierten Kerne oder auch deren Tochter- oder Enkelkerne mit einem Antikörper markiert und identifiziert werden können. Wird das Zeitfenster der Markierung ("Pulse-Phase") kurz gehalten und das Tier noch einige Tage am Leben ("Chase-Phase") erhalten, so sind (nach Fixierung und Immuncytochemie bzw. Immunofluoreszenz) wenige, aber klar erkennbare Klone von geteilten Zellen sichtbar. Die Zahl dieser Klone erlaubt Aussagen über die Rate der Proliferation in den einzelnen Körperabschnitten. Die dreidimensionale Verteilung der Klone zeigt die Ausrichtung der Teilungen nach der Markierung der Vorläuferkerne.

Mit dieser Methode werden hier Proliferationsmuster von verschiedenen postlarvalen

Stadien während der *Platynereis* Entwicklung untersucht.

Die Mehrzahl der BrdU-markierten Kerne sind bei einem Tag Chase-Phase in der Proliferationszone zu finden. Außerdem gibt es eine große Anzahl von BrdU-markierten Kernen in der jüngsten Segmentanlage. Dort sind diese markierten Zellkerne überwiegend auf der ventralen Seite zu finden. Rumpf, Kopf und Pygidium zeigen hingegen nur wenige BrdU-markierte Zellkerne auf. Die vorliegende Arbeit bestätigt diese Beobachtungen. Eine Besonderheit ist die unterschiedliche Anzahl der positiv BrdU-markierten Tiere in einem Versuchsansatz. Trotz gleichen Alters und Größe können Würmer alle Varianten zwischen einer schwachen und einer sehr starken Markierung aufweisen. Verlängert man den Pulse, so erhöht sich die Anzahl der markierten Kerne in einem Tier sowie auch die Anzahl BrdU-markierter Tiere. Verlängert man die Chase-Phase, vergrößert sich die Anzahl der BrdU markierten Kerne. Nach drei Tagen Chase-Phase ist ein großer Teil der Wachstumszone markiert. Die gesamte Segmentanlage stammt also von den wenigen markierten Kernen ab, die nach einer halben Stunde Pulse markiert waren.

Phosphohiston/BrdU-Doppelmarkierungen in der PZ und der Wachstumszone zeigen, dass nach drei Tagen Chase die gesamte Wachstumszone und die PZ mit BrdU besetzt ist, jedoch nur eine kleine Anzahl von Kernen auch PH3 Markierungen aufweist. Zum Fixierungszeitpunkt sind also nur wenige Zellen auch in Mitose, was auf einen verlängerten Zellzyklus hindeutet. Vergleicht man nun die im Kapitel 4.1 beschriebene Segmentbildung während des postlarvalen Wachstums mit den oben beschriebenen unterschiedlichen BrdU-Markierungsmustern von Tieren der gleichen Entwicklungsstufe, so kann folgendes Modell postuliert werden:

Die Teilungsaktivität der Proliferationszone verläuft diskontinuierlich. Nach einer initialen Blockade der Mitoseaktivität im Anschluss an der Larvalphase, ist auch die spätere Mitoseaktivität diskontinuierlich. Mein Postulat ist, dass die Zellzyklen nur wenige Stunden aktiviert werden. Die in dieser Zeit mitotisch aktiven Zellen bauen unter den hier gewählten experimentellen Bedingungen während der S-Phase des Zellzyklus BrdU in ihre DNA ein und geben diese dann an ihren Klon weiter. Die so markierten Zellen werden durch umfangreiche Zellbewegungen in anteriore Richtung in das jüngste Segment geschoben. Die Zellteilungen in der Proliferationszone kommen zum Erliegen, bis die neu produzierten Zellen ihr Ziel erreichen und das jüngste Segment eine bestimmte Größe erreicht hat. Um diese Größe zu erreichen, sind auch weitere Zellteilungen notwendig, was die große Menge der BrdU-positiven Zellklone in

den jüngsten Segmenten erklärt. Dieser Umstand würde erklären, warum viele Tiere während des postlarvalen Wachstums keinerlei BrdU-Markierungen aufwiesen. Die von mir gewählten BrdU-Inkubationszeiten könnten bei vielen Tieren in die Proliferationspause gefallen sein, so dass kein BrdU eingebaut worden ist. Wählt man das Zeitfenster der Pulse-Phase zu eng, ist die Wahrscheinlichkeit groß eine solche Proliferationspause zu treffen, wählt man hingegen ein zu großes Zeitfenster, droht die Gefahr, dass zu viele Kerne markiert sind und keine eindeutige Proliferationsanalyse möglich ist.

Proliferation findet also vorwiegend in der PZ und den jüngsten Segmentanlagen statt. Die Analyse der Proliferationsmuster nach einem Tag Chase-Phase anhand von Semidünnschnitten zeigt BrdU-markierte Kerne exklusiv in der ektodermalen Schicht. Dabei befindet sich ein kleiner Teil an markierten Kernen, insbesondere an den posterioren Grenzen der Wachstumszone in der Epidermis und der unmittelbar angrenzenden (noch nicht differenzierten) inneren Gewebeschicht. Im ventralen Bereich wird so Material für das wachsende Nervensystem bereitgestellt. Dorsal und insbesondere lateral sind aber auch nach innen gerichtete markierte Zellkerngruppen zu erkennen. Es gibt jedoch keine markierten Zellgruppen, die isoliert von der Epidermis in tieferen Gewebsschichten zu finden sind. KLSM Analysen zeigen, dass ohne bzw. mit nur einem Tag Chase-Phase ausschließlich obere Zellschichten mit BrdU markiert sind. Zieht man die Ergebnisse aus den immunhistochemischen Untersuchungen hinzu, so kann es sich hierbei nur um die Epidermis handeln. Ventral auftretende Markierungen in tieferen Schichten sind dementsprechend dem Nervensystem zuzuordnen.

Um die weitere Zellteilungsrichtung der markierten Kerne zu verfolgen, muss die Chase-Phase erweitert werden. Dabei zeigt sich, dass mit zunehmender Chase-Phase mehr BrdU Kerne in tieferen Schichten zu finden sind. Nach drei Tagen Chase-Phase sind große innere Bereiche der jüngsten Segmentanlage mit BrdU-markierten Kernen versehen.

Die hohe Anzahl BrdU-markierter Zellkerne nach drei Tagen Chase in tieferen Schichten deuten darauf hin, dass mesodermales Gewebe aus den in der Epidermis markierten Zellen entsteht. Zwar sind auch ektodermale Strukturen, wie z.B. dorsal und lateral im Coelom auftretende Nervenzellen (siehe Ergebnisteil Innere Organe und Diskussion Kapitel 4.1.1) unterhalb der Epidermis zu finden, doch können diese nicht die große Anzahl und die Position (gesamter Raum zwischen Epidermis und Darm) der BrdU-markierten Kerne erklären. Die morphologischen Beschreibungen dieser Arbeit

machen deutlich, dass ein Großteil der inneren Segmentorganisation aus Muskelgewebe besteht und daher der Großteil der inneren noch nicht differenzierten Zellen zum Aufbau dieser Muskelgruppen herangezogen werden.

Zusammenfassend lässt sich die Zellproliferation bei der Segmentbildung von *Platynereis* folgendermaßen beschreiben: Die Proliferationszone bei *Platynereis dumerilii* ist ein epidermaler Ring von wenigen Zelldiametern, die periodisch mitotisch aktiv werden. Es handelt sich dabei um Ektomesoblasten. Die hieraus hervorgehenden Tochterzellen werden laminar nach anterior verlagert, d.h. sie behalten ihre primäre epidermale Lage bei. In diesem ektodermalen Bereich des jüngsten Segments erfolgen weitere longitudinale Teilungen für die Vermehrung der epidermalen Zellen. Darüber hinaus finden hier transversale Zellteilungen für die Bildung von Neuroblasten (nur ventral) und Mesoderm statt. Die gesamte Segmentanlage wird von diesen Ektomesoblasten gebildet. Die REM Aufnahmen zeigen, dass sich nicht nur eine Segmentanlage in der Wachstumszone befindet. Die Ektomesoblastzellen in der Proliferationszone stoppen ihre Aktivität bis die 1. Segmentanlage die Parapodien vollständig ausgebildet hat. Danach beginnt wieder die Produktion von neuen Zellreihen in anteriorer Richtung. Dieser Modus der Segmententstehung zeigt überhaupt keine Ähnlichkeit mit der Segmentierung von Hirudineen. Die Proliferationszone von *Platynereis* zeigt weder Teloblasten noch eine kontinuierliche Proliferation. Auch neuere Untersuchungen der Zellgenealogie nach iontophoretischer Markierung geben keine Hinweise für ein Egelkonformes Segmentierungsmuster (Ackermann et al., 2005). Die Anlagen für alle Segmente werden bei Hirudineen schon embryonal gebildet. Deren mesodermale Ausstattung hat ihren Ursprung in den M-Teloblasten. Das primäre Mesoderm entsteht bei Spiraliern jedoch aus der 4d Zelle (Wilson, 1892). Die zwei M-Teloblasten in Egel sind homolog zu 4d¹ und 4d² Zellen von anderen Anneliden (Scholtz und Dohle, 1996), demzufolge müssen die Egelsegmente als Deutomeren bezeichnet werden. Bei *Platynereis* werden hingegen nur die Anlagen der ersten drei Segmente embryonal gebildet, es entstehen also maximal drei Deutomere. Die mesodermale Auskleidung dieser Deutomeren liegt, wie bei anderen Polychaeten auch, in der 4d Zelle. Die Proliferationszone und die restlichen Segmente entstehen larval bzw. postlarval. Das Zellteilungsmuster in der Proliferationszone ist stets posterior-anterior ausgerichtet, zeigt aber sonst keine Hinweise auf eventuelle Zellverbände, welche den Keimbändern der Egel ähneln könnten. So gibt es in der Proliferationszone keine eindeutige Trennung zwischen ekto- und mesodermalen Vorläuferzellen. Vielmehr scheint es so, als ob eine

deutliche Differenzierung der Keimblätter erst im neu entstehenden Segment stattfindet. Dort findet eine massive Vermehrung und Neuordnung von Zellen statt. Die Teilungsrichtung der einzelnen Zellen ist sowohl longitudinal als auch transversal. Nach einer Chase-Phase von mindestens zwei Tagen sind deutlich transversale Zellteilungen (ausgehend von der epidermalen Zellschicht) feststellbar. An dieser Stelle findet man auch das Mesoderm, aus dem die Coelothelien durch weitere Zellteilungen hervorgehen.

Zudem zeigen cell-lineage Studien (Ackermann et al., 2005; Dorresteyn, 1990), dass mesodermales Gewebe aus Tritomeren ihren Ursprung im Somatoblasten 2d, also dem Ursprung des Rumpfektoderms, haben. Dieser Abstammungsmodus ist weit verbreitet unter den Spiraliern (Wilson, 1925) und bei den recht ursprünglichen Polycladiden entsteht das gesamte Mesoderm aus der 2d Zelle. Neuere Untersuchungen an Segmentierungsgenen in *Capitella spec. I* (Seaver und Kaneshige, 2006), zeigen, dass beispielsweise ein *engrailed* Ortholog zunächst im Ektoderm exprimiert wird, in späteren Entwicklungsstadien jedoch auch im Mesoderm gefunden werden kann. Die Autoren gehen davon aus, dass mesodermale *engrailed* exprimierende Zellen ursprünglich aus dem Ektoderm stammen. Diese Fakten und meine Beobachtungen sprechen für die Existenz von so genannten Ektomesoblasten.

Ein Vergleich mit den Segmentierungsmechanismen mit den Arthropoden ist zweifelsohne schwierig, da dieser Tierstamm höchst unterschiedliche Gruppierungen enthält. Das Standardmodell *Drosophila* kann aufgrund seiner sehr stark abgeleiteten Form nicht zum Vergleich herangezogen werden. Ein Vergleich ist nur mit ursprünglichen Vertretern dieses Stammes sinnvoll. Crustaceen gelten als ursprüngliche Arthropoden und weisen viele Ähnlichkeiten mit Polychaeten in Bezug zur Segmententstehung auf (Minelli, 2001). Neben einer dreisegmentigen Larve, hier Nauplius, gibt es ebenfalls eine Wachstumszone, aus der neue Segmente entstehen. Diesen Modus kann man auch bei einigen ursprünglichen Insekten beobachten. Die Unterteilung des Körpers in einen Kopf, Rumpf, und Schwanzbereich, findet im Prinzip sowohl bei Anneliden als auch bei Arthropoden statt. Was bei Anneliden der Kopf als Prostomium und das posteriore Ende das Pygidium ist, wird bei Arthropoden als Acron und Telson bezeichnet. Die Gemeinsamkeit besteht darin, dass diese Bereiche keine Segmente darstellen. Die Hauptfrage ist, ob diese Unterteilung homolog ist. Neuere Ergebnisse (Maxmen et al., 2005) stellen diese Homologie in Frage, da ihre Ergebnisse

das Acron als umgewandeltes 1. Segment sehen, was dann in direktem Widerspruch zum Prostomium der Anneliden steht. Dieses Ergebnis stünde damit im Einklang zur neuen Einteilung der Protostomier in Ecdysocoa und Lophotrochozoa (Aguinaldo et al., 1997). Auf dieser Basis sind Arthropoden und Anneliden phylogenetisch relativ weit voneinander getrennt. Diese Neueinteilung berücksichtigt Segmentbildungsmechanismen aber nur in einem kleinen Maße. Vergleicht man diese Mechanismen untereinander, so kann man durchaus einige Gemeinsamkeiten erkennen. So zeigen eine Reihe von Malacostracen Gruppen (Scholtz und Dohle, 1996) eine Proliferationszone, die eine begrenzte Anzahl an Zellen produziert, aus denen dann ein neues Segment entsteht. Diese Zellen lassen sich nicht bestimmten Geweben zuordnen, sind also nicht mit den Teloblasten in Egel zu vergleichen, sondern eher mit der Segmententstehung in *Platynereis*.

Sicher ist, dass für eine abschließende Beurteilung mehrere ursprüngliche Modelle der Arthropoden als auch der Anneliden untersucht werden müssen.

4.3.2 Proliferation in Regeneraten

Ergebnisse von BrdU-Markierungsversuchen bei caudalen Regeneraten von *Platynereis* belegen die deutlich erhöhte Rate der Zellproliferation und auch eine erhöhte Geschwindigkeit des Zellzyklusses in dem sich regenerierendem Gewebe.

In den Regeneraten gibt es nach der Bildung eines neuen Pygidiums auch eine Proliferationszone, die nur wenige Zelldiameter breit ist. Die Proliferationsrate in dieser neu entstandenen PZ ist aber viel höher als in der PZ der Normalentwicklung. Ausgehend von dieser Proliferationszone werden neue Segmente gebildet. Die Zahl der gleichzeitig heranwachsenden Segmente ist im Regenerat aber viel höher (4-7 Segmente simultan).

Die Proliferationsstudien der vorliegenden Arbeit zeigen, dass es keine Wachstumpausen in der Proliferationszone gibt. Diese ist demnach während der Regeneration fortwährend aktiv und produziert so neue Segmentanlagen, ohne dass eine zwischenzeitliche Inhibition stattfindet. Das spricht dafür, dass fast das gesamte Material aus dem Regenerationsblastem, welches aus dedifferenzierten epidermalen Zellen stammt, gebildet worden ist. Erst wenn man das Tier mindestens einen Tag nach der Amputation mit BrdU inkubiert, kann man markierte Kerne im Regenerat detektieren. Diese sind dann nach max. 12 h Chase in der Oberfläche des Blastems zu lokalisieren. In der frühen Phase (3 Tage) der Regeneration sind nach 0 Tagen Chase-Phase BrdU-

markierte Kerne nur in oberen Zellschichten zu lokalisieren. Nach nur einem Tag Chase-Phase ist der gesamte Innenraum, bis auf einen zentralen Bereich, der vermutlich Darmlumen und Epithel darstellt, mit BrdU-markierten Kernen ausgefüllt. In späteren Regeneraten (ca. 7 Tage alt) ist das Wachstum leicht gebremst, so dass nach einem Tag Chase-Phase ausschließlich Oberflächenzellen markiert sind, und erst nach zwei Tagen Chase-Phase auch Markierungen im inneren Bereich zu finden sind. Nach drei Tagen Chase-Phase werden komplette Innenbereiche, mit Ausnahme eines zentralen Kanals, von BrdU-markierten Kernen ausgefüllt. PH3 Markierungen zeigen, im Unterschied zur Normalentwicklung, dass viele Kerne in der PZ und den neuen Segmentanlagen markiert sind. Das bestätigt die oben beschriebene Vermutung, dass während der Regeneration keine Proliferationspausen auftreten und damit ein im Vergleich zum postalarvalen Wachstum beschleunigtes Wachstum erreicht wird.

Gewebeschnitte zeigen, dass anderthalb Tagen nach Ende der BrdU-Inkubation epidermale Zellen, aber auch schon angrenzendes mesodermales Gewebe BrdU-markierte Kerne aufweisen. Damit entspricht dieses Proliferationsmuster dem im postlarvalen Wachstum beschriebenen Muster und dementsprechend gilt auch für die Regeneration dieses beschriebene Segmentbildungsmodell. Damit entstehen ektodermale und auch mesodermale Strukturen aus Ektomesoblasten. Diese bilden vermutlich auch Mesodermvorläuferzellen aus. Dafür sprechen auch die PH3-Markierungen im Innenbereich, was bedeutet dass sich die Zellen in mesodermalen Schichten in Mitose befinden. Proliferation findet also nicht ausschließlich in der Epidermis statt, sondern auch in prospektivem Mesoderm.

Gewebe des Mitteldarms wird nicht von der Proliferationszone oder dem Regenerationsblastem gebildet. Unabhängig von der Chase-Phase sind keine BrdU-markierten Kerne im Darmepithel zu finden. Phosphohiston-Markierungen hingegen können im gesamten Darmepithelbereich auftreten, sind aber tatsächlich, verglichen mit Markierungen im Mesoderm und Epidermis geringer vertreten. Insbesondere in frühen Regeneraten, in denen rasch neue Segmente gebildet werden, finden im Darm offensichtlich nur wenige Mitosen statt. Clark und Clark (1968) beschrieben bei *Nephtys* ein sehr dehnbares Darmepithel. Zu Beginn der Regeneration wächst nur epidermales und mesodermales Gewebe, der Darm wird im Zuge dieser Segmentverlängerung nur passiv mitgedehnt. Diese Beschreibung könnte auch die o.a. geringen Mitosen während der Regeneration in *Platynereis* erklären.

Mit BrdU-Pulse/Chase Versuchen wurde auch bei *Dorvillae bermudensis* die

Proliferation während der Regeneration studiert (Paulus und Müller, 2006). Dort konnten erste Proliferationsvorgänge erst 16 Stunden nach Amputation detektiert werden. Ähnliche Ergebnisse sind auch in dieser Arbeit gezeigt worden. *Platynereis* zeigt erst 18 Stunden nach der Amputation Proliferation zirkulär um die Amputationsstelle. Diese Proliferationspause nach der Amputation tritt bei vielen Polychaeten auf (Goss, 1974). Offensichtlich werden zunächst Wundheilungs- und Dedifferenzierungsprozesse vorangetrieben, bevor neues Material gebildet wird. Alternativ wäre es möglich, dass in dieser Zeit Stammzellen von anterioren Körperbereichen zur Wunde transportiert werden. Anzeichen dafür konnten allerdings weder hier noch in morphologischen Untersuchungen (Nussbaum, 1908; Hofmann 1966; Clark und Clark, 1962, Friedrichs, 2005; sowie die vorliegende Arbeit), noch in Proliferationsstudien (Paulus und Müller, 2006; Tachezy, 1999), gefunden werden. In diesen untersuchten Polychaeten stammt das Regenerationsmaterial aus dedifferenzierten Zellen. Im Unterschied zu den Beobachtungen der vorliegenden Arbeit postulieren Paulus und Müller (2006), dass Mesoderm und Ektoderm jeweils separat voneinander Stammzellen herausbilden, diese in das Blastem einwandern und dort gemäß ihrem Ursprung mesodermale oder ektodermale Strukturen aufbauen. Damit würden sie einige Studien über die Herkunft des Regenerationsblastems bestätigen (Boilly, 1969; Okada, 1929; Potswald, 1981). In diesen Arbeiten wurden Regenerationsvorgänge in *Syllis amica*, *Spirorbis moerchi*, und einigen Sylliden untersucht. Im Gegensatz dazu stehen die Beschreibungen von Nussbaum (1908), Clark und Clark (1962), Hofmann (1966) sowie diese Arbeit, die Ektomesoblasten als Ursprung für Ektoderm und Mesoderm postulieren. Da die zuerst genannte Autorengruppe andere Polychaeten untersuchte als die zweite Autorengruppe, müssen diese Aussagen nicht im Widerspruch zueinander stehen. Vielmehr kann nicht ausgeschlossen werden, dass verschiedene Zweige der Polychaeten auch verschiedene Regenerations- und Segmentformierungsmechanismen entwickelt haben.

4.4 Untersuchungen zur *pduwnt-1* Expression

4.4.1 Segmentale Expression von *pduwnt-1* und *engrailed* in *Platynereis dumerilii*

Die Resultate der *in-situ*-Hybridisierung des *wingless* ortholog *pduwnt-1* bei *Platynereis dumerilii* verdeutlichen, dass dieses Gen sowohl an der Segmentneubildung in der larvalen und postlarvalen Entwicklung als auch bei Segmentbildung während der Regeneration beteiligt ist. Dabei wird *Pduwnt-1* in ektodermalen Streifen an der posterioren Grenze jeder Segmentanlage exprimiert. *In situ* Analysen mit einem *Platynereis engrailed* Ortholog (*Pduen*) zeigten bereits eine Expression an der jeweiligen anterioren Segmentanlagengrenze (Prud'homme et al., 2003). Vergleiche mit den in dieser Arbeit gemachten Expressionsstudien zeigen, dass *Pduwnt-1* und *Pduen* in benachbarten Zellstreifen exprimiert werden. Im Unterschied zu *Pduen* wird *Pduwnt-1* in dem Regenerationsgewebe in breiteren Zellarealen exprimiert. Die anfänglich nur eine Zellreihe umfassende Färbung vergrößert sich mit der Größe des Segmentes. Außerdem sind ebenfalls deutliche Expressionen an der posterioren Parapodialanlage zu erkennen. Dabei zeigt sich, dass frühe Parapodialanlagen nicht nur posterior, sondern über die gesamte Anlage eine Expression aufweisen. Semidünnschnitte zeigen, dass in diesen Anlagen nur das Ektoderm markiert ist. *Pduen* Expressionsmuster in Regeneraten zeigen parallel zur Expression an den anterioren Segmentgrenzen auch ventrale halbkreisförmige Markierungen. Diese Markierungen korrespondieren mit den dort auftretenden Ganglien.

4.4.2 Larvale Expressionsmuster von *Pduwnt-1* und *Pduen*

Pduen Markierungen (durchgeführt von unserem Kooperationspartner Guillaume Balavoine) treten bereits 18 hpf auf. Dort werden zunächst zwei posteriore Streifen exprimiert. Dieses Muster wird nach 19 hpf auf drei und nach 48 hpf auf vier Streifen erweitert. *Pduwnt-1* Markierungen können erst 48 hpf detektiert werden. Diese Markierungen sind im Vergleich zu *Pduen* breiter und werden im Tier von posterior nach anterior schwächer. Segmentale Grenzen werden markiert, bevor es entsprechende äußere morphologisch erkennbare Grenzen, wie z.B. Einfaltungen der Epidermis gibt. Diese Expressionsmuster entsprechen den posterioren Grenzen der Deutomeranlagen. Bei der Metatrochophora werden die segmentalen Expressionsmuster schwächer und konzentrieren sich an der posterioren Basis der Borstensäcke. Daneben tritt ein großes

zirkuläres Expressionsmuster um das Stomodaeum herum auf. Mit Erreichen des dreisegmentigen Jungwurmstadiums ist die *pduwnt-1* Expression nicht mehr nachweisbar. Erst *in situ* Hybridisierungen mit Tieren die erste Tritomer Segmente bilden, zeigen erneut eine *pduwnt-1* Expression. Dann wird sowohl in der PZ, als auch in den posterioren Grenzen der jüngsten Segmentanlage *pduwnt-1* exprimiert. Die Expressionsmuster in PZ, Stomodaeum und den Parapodialanlagen werden im Kapitel 4.3.4 weiter diskutiert.

4.4.3 *Pduwnt-1/Pduen* Expressionsanalyse im Vergleich zu Arthropoden

Pduwnt-1 wird posterior der Segmentanlagegrenzen und benachbart zu *pduen* exprimiert. Diese benachbarte Expression spricht für eine wichtige Rolle im Aufbau und Etablierung von Segmentgrenzen, ähnlich wie beim Aufbau von Parasegmenten in Arthropoden. Dieser Prozess wurde detailliert an *Drosophila* untersucht und soll kurz erläutert werden. Die ersten segmentalen Einheiten werden im Syncytium von einer komplexen Genkaskade, angefangen von Maternal-Faktoren, über Lückengene (gap genes) bis zu den Paarregelgenen spezifiziert. Unterschiedliche Konzentrationen von Paarregelgenen führen zur Aktivierung von *engrailed* an der anterioren- und *wingless* an der posterioren Parasegmentgrenze. Das Engrailed-Protein reguliert die Expression von *sonic hedgehog*, einem Liganden, der aus den Zellen diffundiert und an benachbarten *wingless*-kompetenten Zellen an den Patch-Rezeptoren binden kann. Durch dieses Signal wird das Wingless-Protein als Ligand in den extrazellulären Raum abgegeben und bindet an Oberflächenrezeptoren (Frizzled) des umgebenden Gewebes (Bhanot et al., 1996; Siegfried et al., 1994). Dabei besitzen nur *engrailed*-kompetente Zellen den Frizzled-Rezeptor. Dementsprechend katalysiert Wingless die weitere Produktion von Engrailed und damit von Sonic Hedgehog in den bereits Engrailed-positiven Zellen. Auf diese Weise werden die Parasegmentgrenzen von *Wingless*-Expressionen durch eine gegenseitige Rückkopplung von *wingless*-kompetenten Zellen mit einem Zellstreifen von *engrailed*-exprimierenden Zellen auf der posterioren Segmentgrenze aufrechterhalten (Heemskerk et al., 1991; Mohler und Vani, 1992). Neben der Etablierung der Segmentgrenzen werden durch Hedgehog- und Winglessprotein Gradienten über das Parasegment aufgebaut, und so Zellidentitäten (der Epidermis) innerhalb eines Parasegmentes vermittelt (Bokor und DiNardo, 1996; Heemskerk und DiNardo, 1994). Ob solche Proteingradienten auch bei *Platynereis* eine

Rolle spielen, müssen zukünftige Proteinstudien zeigen.

Hedgehog-Orthologe wurden auch in *Platynereis* gefunden (Tessmar-Raible, 2004) und zeigen ein segmentales, mit *pduwnt-1* und *pduen* korrespondierendes Muster. Zusammen mit dem benachbarten *pduwnt-1* und *pduen* exprimierende Zellstreifen deuten diese Expressionsmuster auf eine Homologie zwischen dem Aufbau und der Entwicklung der segmentalen Grenzen in *Platynereis* und der Parasegmente in *Drosophila*.

Dieser Aufbau von Parasegmenten wurde ebenfalls in so genannten Kurzkeimstreifen Insekten beschrieben (Nagy, 1994; Nagy und Carroll, 1994; Schroder et al., 2000; Dearden und Akam, 2001). *Engrailed* Studien bei Insekten bzw. Crustaceen (Patel et al., 1989) und *wingless/engrailed* Studien in Cheliceraten bzw. Myriapoden (Damen, 2002; Hughes und Kaufman, 2002) lassen darauf schließen, dass die parasegmentale Organisation in *Drosophila* ein für Arthropoden ursprüngliches Merkmal darstellen. Zum einen wird in den dort untersuchten Arthropoden beschrieben, dass zunächst Parasegmente aufgebaut werden, die sich im Laufe der Entwicklung zu „echten Segmenten“ bildet. Dabei spielte die benachbarte Expression von *wingless* und *engrailed* eine wichtige Rolle und wurde von den Autoren o.g. Arbeiten als ein konservierter Mechanismus der Segmentbildung in Arthropoden dargestellt. Da diese benachbarte Expression von *wingless/engrailed* nicht bei anderen segmentierten Taxa gefunden worden ist, wurde ein gemeinsamer Ursprung aller segmentierter Tiere ausgeschlossen. Die Ergebnisse dieser Arbeit mit *pduwnt-1* und die *engrailed* Studien in *Platynereis* zeigt jedoch genau dieses benachbarte Expressionsmuster, was eher gegen eine konvergente Entstehung von Segmenten im Tierreich spricht. Für eine solche Schlussfolgerung müssen allerdings auch Segmentbildungsmechanismen von anderen Anneliden hinzugezogen werden.

4.4.4 *Engrailed* und *wnt-1* Expressionen in Anneliden

In Anneliden wurden Studien an *engrailed* und *wingless* bisher nur bei wenigen Spezies durchgeführt. *Engrailed* Untersuchungen an Hirudineen von Lans et al., (1993), Wedeen (1995), Shain et al. (1998) und Seaver und Shankland (2001) zeigen ein segmentales Muster, das aber eher auf eine Rolle in der Neurogenese, als im Aufbau von Segmentgrenzen, deutet. Expressionsmuster von *engrailed* im Oligochaet *Pristina leidy* (Bely und Wray, 2001) sind ebenfalls auf das Nervensystem beschränkt.

In Polchaeten gab es *engrailed* Studien in *Chaetopterus* (Seaver et al., 2001), *wingless*

und *hedgehog* Studien in *Capitella sp. I* und *Hydroides elegans* (Seaver und Kaneshige, 2006). In *Chaetopterus* wird *engrailed* zwar segmental exprimiert, jedoch erst nachdem Segmente morphologisch voneinander zu unterscheiden sind. Damit ist *chen* (ein *Chaetopterus engrailed* Ortholog) wahrscheinlich nicht am Aufbau von Segmentgrenzen involviert. In *Capitella* wird *capIen* segmental während der Larvalphase exprimiert, jedoch spielt es laut den jeweiligen Autoren keine Rolle im Aufbau von Segmenten. Das gleiche gilt für *CapIwnt* (*wingless* Ortholog)- und *CapIhh* (*hedgehog* Ortholog). Beide Gene werden erst nach dem Aufbau von Segmenten exprimiert. Während *CapIwnt* mit *CapIhh* Expressionen zueinander korrespondieren, sind *CapIen* Expressionen nicht in benachbarten Zellen (die diese Gene exprimieren) zu finden. In *Hydroides elegans* wurde ein entsprechendes *engrailed* Ortholog untersucht und ein zu *Chen* ähnliches Expressionsmuster beschrieben. Damit entspricht nur das *Pduwnt1/Pduen* Expressionsmuster in *Platynereis* dem Segmentierungsmuster in Arthropoden. Ob diese unterschiedlichen *wnt-1* Ergebnisse in Polychaeten für oder gegen eine konvergente Segmententstehung sprechen, soll in der abschließenden phylogenetischen Diskussion erläutert werden.

4.4.5 Nicht segmentale *pduwnt-1* Expression

Neben der Expression der *pduwnt-1* Expression an den Segmentgrenzen gibt es eine Reihe von nicht segmentalen Expressionen. Dazu zählen die Expression am Anus, die zirkuläre Expression am larvalen Stomadaeum und der anteriore Expression auf der Parapodialanlage.

In der Larvalentwicklung von *Platynereis* zeigt sich 48 hpf eine starke Expression am posterioren Ende. Diese Expression wird aber im Zuge der Entwicklung (vom 24 hpf bis zum subadulten Stadium) immer schwächer. In der Regeneration wiederholt sich dieses Expressionsmuster, allerdings mit einem weitaus stärkeren Anfangssignal verglichen mit dem der larvalen Expression von *pduwnt-1*. In Regeneraten tritt ein starkes *pduwnt-1* Signal bereits während des Wundverschlusses auf. Der gesamte Wundbereich zeigt eine starke Markierung der Epidermis, die auch große Teile des Stumpfs erfasst. Nach dem Aufbau von Pygidium und einer neuen PZ können einzelne Expressionsareale unterschieden werden. Dabei sind die Anusregion und ein schmaler Zellstreifen am ehemaligen Wundrand markiert. Die Markierung am Anus lässt mit fortschreitender Regeneration nach und ist etwa vier Tage nach Amputation auf eine

kleine Zellreihe am Anus beschränkt.

Posteriore *wnt1*- Expressionen wird auch in anderen Polychaeten beschrieben. In *Capitella sp. I* (Seaver und Kaneshige, 2006) tritt eine Expression am posterioren Ende der Larve ein. Diese Expression wird während der larvalen Entwicklung in *Capitella* schwächer, und dient vermutlich der Spezifizierung der Enddarmzellen und der Entwicklung der Analanlage. *Wnt-1* Expressionen am posterioren Ende können auch bei Insekten (*Tribolium castaneum* (Nagy und Carroll, 1994) und *Gryllus bimaculatus* (Niwa et al., 2000)), Crustaceen (*Triops longicaudatus* (Nulsen und Nagy, 1999)) und Spinnen (*Cupiennus salei* (Damen, 2002)) gezeigt werden. Bei *Drosophila* wurde ebenfalls gezeigt, dass eine posteriore Expression von *wnt-1* vorkommt, jedoch keine Rolle bei der Segmentierung spielt, sondern vielmehr mit der Spezifizierung der Enddarmöffnung in Verbindung gebracht wird (Baker, 1988).

Die im Kapitel 4.1 und 4.1.2 diskutierte Diskontinuität der Proliferation der PZ korrespondiert mit dem periodischen Auftreten des Expressionsmuster von *pduwnt-1* in der PZ. Viele postlarvale Stadien zeigen keine Expressionsmuster in der PZ, jedoch in den Segmentanlagengrenzen. *Pduwnt-1* Expressionen in der PZ von Regeneraten (wo es keine Proliferationspausen gibt) hingegen konnten bei jedem untersuchten Tier gezeigt werden. In den Segmentanlagen liegt der Schwerpunkt der proliferativen Zellen an den posterioren segmentalen Rändern, dort wo auch Expressionen von *pduwnt-1* lokalisiert sind. Das lässt auf einen Zusammenhang zwischen *wnt-1* Aktivität und Zellproliferation schließen. Tatsächlich wurde in verschiedenen Vertebraten die mitogene Wirkung von *wnt-1* gezeigt. Ektopische Expressionen von *wnt-1* im Mausmodell (Dickinson et al., 1994; Megason und McMahon, 2002) sowie im Huhnmodell (Adams et al., 2000) führten zu verstärkten Proliferationen von neuronalen Stammzellen.

Wnt-1 ist auch bei Insekten an Wachstumsprozessen involviert. Funktionelle Studien an Orthopteren zeigen die Rolle von *wingless* Orthologen in der Verlängerung und Segmentierung des aus der Proliferationszone stammenden Gewebes (Miyawaki et al., 2004). Eine Reihe von Arbeiten zeigen, dass *wnt* Gene eine wichtige Rolle in der Musterbildung bei phylogenetisch weit entfernten Tieren spielen. So ist ein *wnt-1* Ortholog maßgeblich bei der Axenformation bei *Hydra* beteiligt (Hobmayer et al., 2000). Ein anderes Beispiel ist die Somitenbildung bei Vertebraten, in denen ebenfalls *wnt*-Orthologe eine wichtige Organisatorrolle übernehmen (Aulehla et al., 2003; Pourquie, 2003). Dieser als „Segmentation-clock“ bekannte Mechanismus der Somito-

genese wird ebenfalls als mögliches Modell für die Segmentierung in einigen Insekten diskutiert (Salazar-Ciudad et al., 2001). Speziell das Beispiel der Segmententstehung bei Orthopteren, in denen jedes neue Segment in einem zeitlich festgelegten Rhythmus von zwei Stunden gebildet wird, wird als mögliches Indiz für eine solche Übereinstimmung gesehen (Peel und Akam, 2003). Ob das auch bei anderen Arthropoden der Fall ist, müssen weitere Untersuchungen zeigen. Damit wäre der *wnt* Signaltransduktionsweg neben dem *notch/delta* Signalweg eine weitere mögliche Verbindung zwischen der Vertebraten und Arthropoden Segmentierung (Tautz, 2004). Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen jedoch, dass *Platynereis* auf keinen Fall eine synchrone Bildung von postlarvalen Segmenten aufweist. Trotzdem wird *pduwnt-1* wahrscheinlich periodisch aktiv. Ob dieser Mechanismus jedoch irgendeine Homologie zur Somitogenese aufzeigt, müssen weitere Genstudien zeigen.

Neben der posterioren Expression treten zirkuläre Expressionen von *pduwnt-1* am Stomadaeum auf. Zirkuläre Expressionen am Stomadaeum wurden auch mit einem *Platynereis hedgehog* Ortholog in der Arbeit von Tessmar-Raible (2004) gezeigt. Die in dieser Arbeit beschriebenen *pduwnt-1* Expressionen liegen im Vergleich dazu außen auf dem *pduhh* Expressionsring an. Gemäß den funktionellen Studien von Tessmar-Raible (2004) spielt *pduhh* eine Rolle in der Hirn- und Vorderdarmentwicklung. Da *wnt-1* unmittelbar benachbart exprimiert wird, wird es höchstwahrscheinlich von *hedgehog* aktiviert und ist in diesen Prozess involviert. *Wnt* Signale spielen auch bei der Hirnentwicklung von Vertebraten, speziell bei der Trennung einzelner Hirnareale eine große Rolle (Wurst und Bally-Cuif, 2001). Aber auch hier können nur funktionelle Studien genaue Aussagen über die Funktion des Gens in *Platynereis* treffen. Fest steht aber, dass *wnt-1* in *Platynereis* sowohl in der Enddarm- (Anus) als auch in der Vorderdarmregion aktiv ist.

Die Parapodialanlagen in *Platynereis* weisen eine *pduwnt-1* Expression auf. Die stärkste Konzentration an *Pduwnt-1* Signalen war dabei an der ventralen Basis zu finden, während in dorsale Richtung die Signalstärke nachließ.

Wingless erfüllt bei *Drosophila* neben der Segmentierung wichtige Funktionen bei der Ausbildung der Dorsoventralpolarität in den Extremitäten. Diesen Mechanismus kann man auch bei phylogenetisch weit entfernten Tieren beobachten. So sind *wnt*-Gene bei Vertebraten ebenso an der Ausbildung der dorsoventralen Polarität der Extremitäten beteiligt (Panganiban et al. 1997).

Die nicht segmentalen Expressionen von *pduwnt-1* zeigen, dass dieses Gen eine wichtige Rolle in der Morphogenese aber auch in der Aufrechterhaltung bestimmter Strukturen spielt. Die multiplen Aufgaben dieses Gens wurden bereits in mehreren phylogentisch weit entfernten Modellen (wie. z.B. *Drosophila*) gezeigt, und damit der hochkonservierte Charakter und die wichtige Bedeutung des *wnt* Signalweges in der Ontogenese von Bilateriern bewiesen.

4.5 Phylogenetische Diskussion der Segmententstehung

1) Argumente für eine konvergente Entstehung der Segmententstehung:

Nach der Aufteilung der Protostomier in Lophotrochozoa und Ecdysozoa sind Arthropoden und Anneliden näher mit nicht-segmentierten Arten verwandt als untereinander. Vor allem die enge Verwandtschaft zwischen Arthropoden und Nematoden spricht für eine konvergente Entstehung von Segmentbildungsmechanismen bei Arthropoden, Anneliden und Chordaten. Die für die Segmentbildung wichtigen Segmentpolaritätsgene *engrailed* und *wingless* spielen bei vielen Tieren eine Rolle in der Abgrenzung einzelner Gewebe, wie z.B. bei der Napfschnecke *Patella vulgata*. Dort ist *engrailed* an der Abgrenzung zwischen Fuß und Mantel involviert (Nederbragt et al., 2002). Bei Vertebraten grenzen *wnt* und *engrailed* Expressionen z.B. einzelne Hirnabschnitte und das zentrale Nervensystems gegeneinander ab (Wurst und Bally-Cuif, 2001), speziell bei Säugern werden ektodermale Grenzen bei der Zahnentwicklung von *wnt*-orthologen aufgebaut und gesteuert (Sarkar 2000). Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass *engrailed* und *wingless* ursprünglich eine Rolle in der Abgrenzung einzelner wichtiger Körperabschnitte spielten. Diese Funktion wurde dann mehrmals in der Evolution unabhängig voneinander zum Zwecke der Segmentierung modifiziert. Damit wären auch die unterschiedlichen *engrailed* und *wnt-1* Expressionsmuster in Anneliden erklärt.

2) Argumente gegen eine konvergente Entstehung von Metamerie:

Die beschriebenen *engrailed/wnt1* Expressionsstudien in Anneliden stammen vorwiegend von hochabgeleiteten Modellen (Egel, Chetoptoriden). *Capitella sp. I* wird von den entsprechenden Autoren (Seaver und Kaneshige, 2006) aufgrund der homonomen Segmentierung als ursprünglich bezeichnet, doch einige Merkmale unterscheiden dieses Tier von den ebenfalls als ursprünglich geltenden Nereiden. So ist neben deutlichen Unterschieden im Parapodialaufbau vor allem das Fehlen eines dreisegmentigen

Zwischenstadiums evident. Der indirekte Entwicklungsmodus (über eine dreisegmentige Larve) gilt bei Polychaeten als ursprünglich (Westheide und Rieger, 2007). Nimmt man also an, dass dreisegmentige Stadien ein plesiomorphes Merkmal von Polychaeten sind, dann gehört auch *Capitella sp. I* zu den abgeleiteten Formen. *Platynereis dumerilii* dagegen gehört unzweifelhaft zu einer ursprünglichen Polychaetengruppe (Fischer und Dorresteyn, 2004). Daher ist das *engrailed* und *wingless* Expressionsmuster in *Platynereis* (als Vertreter einer ursprünglichen Polychaetengruppe) plesiomorph und in abgeleiteten Formen (wie Chaetoriden und Egel) sekundär abhanden gekommen. Ähnliches konnte am Segmentierungsgen *even skipped*, welches auch in abgeleiteten Formen sekundär abhanden gekommen ist, bei Insekten gezeigt werden (Davis und Patel, 1999). *Engrailed*, aber auch *wingless* ist bei vielen Tieren durch Genduplikationen modifiziert worden (Gibert, 2002) und hat dementsprechend unterschiedliche Funktionen übernommen. Bei Cheliceraten wurde am Beispiel *wingless* gezeigt, dass frühe Segmentierungsvorgänge nicht von *wnt-1*, sondern von anderen *wnt*-Orthologen (*Cs-Wnt5-1*) gesteuert werden (Damen, 2002). Demnach könnten bisher unerkannte *wnt* Gene in den abgeleiteten Anneliden die Segmentgrenzen spezifizieren. Das bedeutet, dass die beschriebenen *wnt-1* und *engrailed* Expressionsmuster in Clitelatten und abgeleiteten Polychaeten nicht als Argument für eine konvergente Segmententstehung aufgeführt werden dürfen.

Wie o.a. sind *engrailed* und *wingless* in vielen segmentierten und nicht-segmentierten Taxa in der Gewebeabgrenzung involviert. Auch bei *Platynereis* spielt *wnt-1* wahrscheinlich ebenso eine Rolle in der Hirn- und Vorderdarmentwicklung, der Spezifizierung des Anus und der Dorsoventralpolarität in den Extremitäten. Allerdings gibt es bisher keine Beschreibung für eine Gewebeabgrenzung (außerhalb der Metamerie) mit benachbarten Expressionen von *engrailed/wingless* an den entsprechenden Gewebegrenzen. Diese für den Aufbau von Parasegmenten wichtige Konstruktion findet sich exklusiv in Arthropoden und in (bisher nur) einer Annelidenspezies.

Damit hat diese Arbeit gezeigt, dass die Merkmale der Segmententstehung in Arthropoden und in *Platynereis*, als ein Vertreter von ursprünglichen Polychaeten, sehr ähnlich ist, was eine konvergente Entstehung der Metamerie in Arthropoden und diesem Polychaeten unwahrscheinlich erscheinen lässt. Inwiefern dieses Ergebnis auch für die Anneliden insgesamt gilt, müssen weitere Studien zeigen. Insbesondere muss die Phylogenie innerhalb der Polychaeten und Anneliden geklärt werden.

Ein Monophylum der Polychaeten ist eher unwahrscheinlich, so dass sich einzelne Polychatengruppen wahrscheinlich völlig unabhängig aus einer Anneliden Stammform entwickelt haben (Bartolomaeus et al., 2005). Demnach sind einzelne Polychaten Familien phylogenetisch weiter voneinander entfernt als bisher angenommen und daher große Unterschiede in Segmentbildungsmechanismen nicht überraschend. Einzelne Polychaetengruppen könnten sogar phylogenetisch näher den Arthropoden stehen als den Clitelatten, was eine Reihe von gemeinsamen Merkmalen zwischen einzelnen Polychaeten und Arthropoden erklären würde (wie z.B. *wnt-1/engrailed* Expression, Segmententstehung und drei segmentiges Zwischenstadium) aber nicht konform wäre mit der Aufteilung der Protostomier in Lophotrochozoa und Ecdysozoa (Westheide und Rieger, 2007).

Ob Ecdysozoa und Lophotrochozoa endgültig das alte Articulatenkonzept ablösen werden, müssen weitere Studien zeigen. Bleibt dieses System bestehen, so wäre der Urahn aller Bilateria segmentiert, und alle nicht-segmentierten Arten, wie z.B. Nematoden, haben die Metamerie sekundär verloren, innerhalb der segmentierten Arten wurde der ursprüngliche Segmentierungsmechanismus dann in abgeleiteten Spezies stark modifiziert.

Bleibt dieses System jedoch nicht bestehen oder wird weitgehend modifiziert, so wären aus einer segmentierten Urform nur die segmentierten Tiere hervorgegangen. Dabei wären einige Polychaetengruppen (unter anderen auch die Nereiden) gemeinsam mit den Arthropoden sehr früh von den anderen Anneliden getrennt worden.

Völlig unabhängig von der phylogenetischen Diskussion in Protostomiern ist aber eine Verbindung zwischen Anneliden- und Arthropodensegmentierung mit der *wnt-1/engrailed* Expression in *Platynereis* gelungen. Daneben gibt es auch eine Verbindung zwischen der Somitogenese von Arthropoden und Chordaten, einmal über den Delta/Notch Signalweg und der zyklischen *wnt-1* Expression in einigen Kurzkeiminsekten (Tautz, 2004). Ob die periodisch auftretende *wnt-1* Expression in postlarvalen *Platynereis* Stadien homolog zu Mechanismen der Somitogenese ist, müssen allerdings zukünftige funktionelle Studien zeigen. Jedenfalls spricht das alles gegen eine konvergente Entstehung der Segmentierung.

5 Zusammenfassung

Diese Arbeit hat morphologische, zellbiologische und molekularbiologische Daten verknüpft um jahrzehntealte Daten in Bezug zur Segmentierung zu ergänzen und zu aktualisieren, neue Aspekte hinzuzufügen und der phylogenetischen Diskussion zur Segmententstehung damit einen wichtigen Baustein hinzuzufügen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die Segmentierung in *Platynereis* einem wohl geordneten komplexen Wachstumsprozess zugrundeliegt. Segmente wachsen nicht einfach in einer bestimmten Zeitfolge aus der PZ aus, sondern werden nach bislang unbekannten Faktoren individuell mit sehr variablen Zeiten aus neuem Zellmaterial gebildet. Da neu gebildete Segmentanlagen in einem bestimmten Differenzierungszustand verharren, solange die vorhergebildete Segmentanlage nicht vollständig ausdifferenziert ist, müssen Signale aus anteriorer Richtung die PZ in der Proliferation und die Segmentanlage im Wachstum inhibieren. In der Regeneration fehlt diese Inhibition, und es findet eine ungebremsste Proliferationsphase statt, solange bis wieder Segmente beginnen auszdifferenzieren.

Die innere Organisation ist durch paarig angelegte Coelomräume, dem ventralen paarigen Nervenstrang und dem Exkretionssystem segmental gegliedert. Dabei spielt die Muskulatur eine besondere Rolle, indem sie die Coelomräume auskleidet und stützt, große Teile des Parapodieninnenraumes ausfüllt und durch Längsmuskelstränge segmentierte Bereiche überwindet. Das Exkretionssystem, bestehend aus paarigen Metanephridien, die bereits embryonal im mittleren Tritomer angelegt werden, unterscheiden sich jedoch von den Deutomer Nephridien. Deutomer Nephrostome befinden sich ventral und zeigen eine deutlich bewimperten Trichter, während Tritomernephrostome median und eine im KLSM-Präparat eher kapselförmigen Aufbau zeigen.

Die Regeneration beginnt mit dem Wundverschluss, dem Kontakt zwischen Darm und Epidermis. Die Kontaktstelle wird durch eingewanderte Eleocyten ausgefüllt und ein Zellgerüst aufgebaut, welches nach dem Wundverschluss und der Bildung eines Regenerationsblastems abgeworfen wird. Ursprung des neuen Blastems sind dedifferenzierte epidermale und mesodermale Zellen. Segmente werden rasch nach der Bildung des Pygidiums und der Analcirren

gebildet. Zusätzlich gibt es unterschiedliche Wachstumsgeschwindigkeiten. Während Nervensystem und Ringmuskulatur von Beginn der Regeneration an schnell wachsen

und ausdifferenzieren, folgen Cuticula, Metanephridien und Parapodialstrukturen erst nach 5 Tagen und etwa 5 gebildeten Segmentanlagen. Dabei werden linke und rechte Seite des Segmentes unabhängig voneinander ausdifferenziert, was auf eine direkte Steuerung der Segmententwicklung durch das paarig aufgebaute Nervensystem zurückzuführen ist.

Diese morphologischen Befunde werden durch Proliferationsstudien erweitert. Segmente werden sowohl in Normalentwicklung als auch in der Regeneration aus Zellen der epidermalen Proliferationszone gebildet. Diese proliferieren in anteriorer Richtung. Die Tochterzellen proliferieren weiter in anteriorer Richtung. Nach ca. 1 Tag ändert sich die Proliferationsrichtung nach ventral, sodass auch mesodermale Strukturen ihren Ursprung in der Epidermis haben, was auf ektomesodermale Stammzellen schließen lässt. Rein mesodermale Stammzellen konnten nicht bestätigt werden. Außerdem konnte durch BrdU/PH3 Doppelmarkierungen gezeigt werden, dass die Zellzyklusgeschwindigkeit im postlarvalen Wachstum deutlich langsamer ist als in der Regeneration.

Pduwnt-1 spielt für den Aufbau von larvalen- postlarvalen- und Regenerations-Segmentgrenzen eine zentrale Rolle. Daneben erfüllt dieses Gen auch andere Funktionen, wie die Expression am Anus und dem Stomadeum zeigen. Die hohe Übereinstimmung von Proliferations- und Expressionsschwerpunkten der PZ und den posterioren Segmentanlagenrändern (in der Regeneration) sprechen auch für eine mitogene Funktion von *pduwnt-1*.

Diese Ergebnisse zeigen damit dass die Segmentierungsmechanismen in *Platynereis* viele Ähnlichkeiten mit (insbesondere als ursprünglich geltende) Arthropoden, aber auch große Unterschiede zu Clitellaten und auch vielen Polychaten besitzen, was der phylogenetischen Diskussion um den Ursprung der Segmentierung aber auch der Einteilung der Anneliden einen neuen interessanten Baustein hinzufügt.

6 Literatur

- Ackermann C, Dorresteijs A, Fischer A. 2005. Clonal domains in postlarval *Platynereis dumerilii* (Annelida: Polychaeta). *J Morphol* 266(3):258-280.
- Adams KA, Maida JM, Golden JA, Riddle RD. 2000. The transcription factor Lmx1b maintains Wnt1 expression within the isthmus organizer. *Development* 127:1857-1867.
- Adoutte A, Balavoine G, Lartillot N, de Rosa R. 1999. Animal evolution. The end of the intermediate taxa ? *Trends Genet* 15:104-108.
- Aguinaldo AM, Turbeville JM, Linford LS, Rivera MC, Garey JR, Raff RA, Lake JA. 1997. Evidence for a clade of nematodes, arthropods and other moulting animals. *Nature* 387(6632):489-493.
- Akam M. 1987 The molecular basis for metamerism in the *Drosophila* embryo. *Development* 101(1):1-22.
- Anderson DT. 1973. Embryology and Phylogeny in Annelids and Arthropods. Pergamon Press New York pp 495
- Arendt D, Technau U, Wittbrodt J. 2001. Evolution of the bilaterian larval foregut. *Nature* 409(6816):81-5.
- Arendt D, Tessmar K, de Campos-Baptista MI, Dorresteijs A, Wittbrodt J. 2002. Development of pigment-cup eyes in the polychaete *Platynereis dumerilii* and evolutionary conservation of larval eyes in Bilateria. *Development* 129(5):1143-54.
- Aulehla A, Wehrle C, Brand-Saberi B, Kemler R, Gossler A, Kanzler B, Herrmann BG. 2003. Wnt3a plays a major role in the segmentation clock controlling somitogenesis. *Dev Cell* 4(3):395-406.
- Baker NE. 1988. Localization of transcripts from the *wingless* gene in whole *Drosophila* embryos. *Development* 103:289-298.
- Bartolomaeus T. 1995. Ultrastructure of the protonephridia in larval *Magelona mirabilis* (Spionida) and *Pectinaria auricoma* (Terebellida): Head kidneys in the ground pattern of the Annelida. *Microfauna Mar* 10:117- 141.
- Bartolomaeus T. 1999. Structure, function and development of segmental organs in Annelida. *Hydrobiologia* 402:21-37.
- Bartolomaeus T, Purschke G, Hausen H. 2005. Polychaete phylogeny based on morphological data – a comparison of current attempts. *Hydrobiologia* (535/536):341–356.

- Bely AE, Wray GA. 2001. Evolution of regeneration and fission in annelids: insights from engrailed- and orthodenticle-class gene expression. *Development* 128(14):2781-2791.
- Bhanot P, Brink M, Samos CH, Hsieh JC, Wang Y, Macke JP, Andrew D, Nathans J, Nusse R. 1996. A new member of the frizzled family from *Drosophila* functions as a Wingless receptor. *Nature* 382:225-230.
- Boilly B. 1968. Origin of regeneration cells in *Aricia foetida* Clap. (Polychaete annelid). *Arch Anat Microsc Morphol Exp* 57(3):297-308.
- Boilly B. 1969. Experimental study of the localization, by relation to the amputation plan, of the source of mesodermal regeneration cells in an annelid polychaete (*Syllis amica* Quatrefages). *J Embryol Exp Morphol* 21(1):193-206.
- Bokor P, DiNardo S. 1996. The roles of *hedgehog*, *wingless* and lines in patterning the dorsal epidermis in *Drosophila*. *Development* 122(4):1083-1092.
- Bucher G, Klingler M. 2004. Divergent segmentation mechanism in the short germ insect *Tribolium* revealed by giant expression and function. *Development* 131(8):1729-1740.
- Burke JM. 1974a. Wound healing in *Eisenia foetida* (Oligochaeta). I. Histology and 3H-thymidine radioautography of the epidermis. *J Exp Zool* 188(1):49-63.
- Burke JM. 1974b. Wound healing in *Eisenia foetida* (Oligochaeta). II. A fine structural study of the role of the epidermis. *Cell Tissue Res* 154(1):61-82.
- Burke JM. 1974c. Wound healing of *Eisenia foetida* (Oligochaeta). III. A fine structural study of the role of non-epidermal tissues. *Cell Tissue Res* 154(1):83-112.
- Chapron C. 1970. Study in the oligochaetous *Eisenia foetida* of morphallaxis phenomena which are demonstrated in the previous digestive duct during cephalic regeneration. *C R Acad Sci Hebd Seances Acad Sci D* 270(10):1362-1364.
- Clark ME. 1968. Later stages of regeneration in the Polychaete, *Nephtys*. *J Morphol* 124(4):483-510.
- Clark ME, Clark RB. 1962. Growth and regeneration in *Nephtys*. *Zool Jb Physiol* 70:29-90.
- Dales R. 1963. *Annelids*. London: Hutchinson und Co.
- Damen WG. 2002. Parasegmental organization of the spider embryo implies that the parasegment is an evolutionary conserved entity in arthropod embryogenesis. *Development* 129(5):1239-1250.

- Davis GK, Patel NH. 1999. The origin and evolution of segmentation. *Trends Cell Biol* 9(12):M68-72.
- Dearden PK, Akam M. 2001. Early embryo patterning in the grasshopper, *Schistocerca gregaria*: *wingless*, *decapentaplegic* and *caudal* expression. *Development* 128(18):3435-3444.
- Devries J. 1973. The formation and fate of the embryonic layers in the earthworm *Eisania foetida* (annelida, oligocheta) *Arch Anat Microsc Morphol Exp.* 62(1):15-38.
- Dickinson ME, Krumlauf R, McMahon AP. 1994. Evidence for a mitogenic effect of Wnt-1 in the developing mammalian central nervous system. *Development* 120:1453-1471.
- Dorresteyn A. 1990. Quantitative analysis of cellular differentiation during early embryogenesis in *Platynereis dumerilii*. *Roux's Arch Dev Biol* 199:14-30.
- Eernisse DJ, Albert JS, Anderson FE. 1992. Annelida and Arthropoda are not sister taxa: a phylogenetic analysis of spiralian metacoan morphology. *Syst Biol* 41:305-330.
- Fernandez J, Stent GS. 1980. Embryonic development of the glossiphoniid leech *Theromyzon rude*: structure and development of the germinal bands. *Dev Biol* 78(2):407-434.
- Filippova A, Purschke G, Tzetlin A, Müller M.C.M. 2004. Reconstruction of the musculature of *Magelona cf. mirabilis* (Magelonidae) and *Prionospio cirrifera* (Spionidae) (Polychaeta, Annelida) by phalloidin labeling and cLSM. *Zoomorphology Volume* 124:1-8.
- Filippova A, Purschke G, Tzetlin A, Müller. M.C.M. 2006. Three-dimensional reconstruction of the F-actin musculature of *Dorvillea kastjani* (Dorvilleidae: Polychaeta) by means of phalloidin-labelling and cLSM. *SCIENTIA MARINA Barcelona (Spain)* 70S:293-300.
- Fischer A. 1985. Fortpflanzung und postembryonale Entwicklung des Anneliden *Platynereis dumerilii*. IWF, Göttingen.
- Fischer A, Dorresteyn 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(3):314-325.
- Friedrichs C. 2005. morphologische Untersuchungen potentieller Stammzellen in der Sprossungszone des Polychaeten *Platynereis dumerilii*. Examensarbeit.

- Gardiner S. 1992. Polychaeta: general organization. Microscopic anatomy of invertebrates 7. Annelida New York: Wiley-Liss. p 19-52.
- Gates GE. 1950. Regeneration in an earthworm, *Eisenia foetida* (Savigny) 1826. III. Regeneration from simultaneous anterior and posterior transections. Biol Bull 99(3):425-438.
- Gibert JM. 2002. The evolution of engrailed genes after duplication and speciation events. Dev Genes Evol 212(7):307-318.
- Giribet G. 2003. Molecules, development and fossils in the study of metazoan evolution; Articulata versus Ecdysozoa revisited. Zoology (Jena) 106(4):303-326.
- Giribet G, Ribera C. 1998. The position of arthropods in the animal kingdom: a search for a reliable outgroup for internal arthropod phylogeny. Mol Phylogenet Evol 9:481-488.
- Goodrich ES. 1898a. On the nephridia of the Polychaeta. Part I. On *Hesione*, *Tyrrhena* and *Nephtys*. Q Jl microsc Sci, Oxford 40:233-245.
- Goodrich ES. 1898b. On the nephridia of the Polychaeta. Part II. *Glycera* and *Goniada*. Q Jl microsc Sci, Oxford 41:439-457.
- Goodrich ES. 1900. On the nephridia of the Polychaeta. Part III - The Phyllodocidae, Syllidae, Amphinomidae, etc., with summary and conclusions. Q Jl microsc Sci, Oxford 43:699-748.
- Goodrich ES. 1945. The study of nephridia and genital ducts since 1895. Q Jl microsc Sci, Oxford, 86:113-392.
- Goss, R.J, 1974. Regeneration. Probleme – Experimente – Ergebnisse. Gustav Fischer verlag, Stuttgart
- Goto A, Kitamura K, Shimizu T. 1999. Cell lineage analysis of pattern formation in the *Tubifex* embryo. I. Segmentation in the mesoderm. Int J Dev Biol 43(4):317-327.
- Gras H. 1984. The tail flattening reflex in *Lumbricus*: reconstitution after tail amputation and modifications in segmental nerve roots. J Neurobiol 15(4):249-261.
- Gratzner HG. 1982. Monoclonal antibody to 5-bromo- and 5-iododeoxyuridine: A new reagent for detection of DNA replication. Science. 29;218(4571):474-5.
- Hauenschild C. FA. 1969. *Platynereis dumerilii* Mikroskopische Anatomie, Fortpflanzung, Entwicklung. Großes Zoologisches Praktikum 10b. Stuttgart: Gustav Fischer Verlag.

- Heemskerk J, DiNardo S. 1994. *Drosophila* hedgehog acts as a morphogen in cellular patterning. *Cell* 76(3):449-460.
- Heemskerk J, DiNardo S, Kostriken R, O'Farrell PH. 1991. Multiple modes of *engrailed* regulation in the progression towards cell fate determination. *Nature* 352(6334):404-410.
- Herlant-Meewis H. 1964. Regeneration in annelids. *Adv Morphog* 4:155-215.
- Hill SD. 1970. Origin of the regeneration blastema in polychaete annelids. *Am Zool* 10(2):101-112.
- Hobmayer B, Rentzsch F, Kuhn K, Happel CM, von Laue CC, Snyder P, Rothbacher U, Holstein TW. 2000. WNT signalling molecules act in axis formation in the diploblastic metazoan *Hydra*. *Nature* 407(6801):186-189.
- Hofmann DK. 1966. Untersuchungen zur Regeneration des Hinterendes bei *Platynereis dumerilii* (AUDOIN et Milne-Edwards) *Zool Jb Physiol* 72:374-430.
- Hughes CL, Kaufman TC. 2002. Exploring myriapod segmentation: the expression patterns of *even-skipped*, *engrailed*, and *wingless* in a centipede. *Dev Biol* 247(1):47-61.
- Huguet G, Molinas M. 1992. Changes in epithelial cells in *Hirudo medicinalis* during wound healing. *J Invertebr Pathol* 59(1):11-17.
- Irvine SQ, Martindale MQ. 1996. Cellular and molecular mechanisms of segmentation in annelids. *Seminars in Cell and Developmental Biol* 7:593-604.
- Jackle H, Hoch M, Pankratz MJ, Gerwin N, Sauer F, Bronner G. 1992. Transcriptional control by *Drosophila* gap genes. *J Cell Sci Suppl* 16:39-51.
- Janaitis C. 2002. Strukturelle Organisation und Dynamik der Segment-Sprossungszone bei *Platynereis dumerilii* (Polychaeta). Diplomarbeit.
- Kerner P, Zelada Gonzalez F, Le Gouar M, Ledent V, Arendt D, 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(12):821-828.
- Kulakova M, Bakalenko N, Novikova E, Cook CE, Eliseeva E, Steinmetz PR, Kostyuchenko RP, Dondua A, Arendt D, Akam M, Andreeva T. 2007. Hox gene expression in larval development of the polychaetes *Nereis virens* and *Platynereis dumerilii* (Annelida, Lophotrochozoa). *Dev Genes Evol* 217(1):39-54.

- Kuper M, Purschke G. 2001. The excretory organs in *Sphaerodorum flavum* (Phyllodocida, Sphaerodoridae): a rare case of co-occurrence of protonephridia, coelom and blood vascular system in Annelida. *Zoomorphology* 120, Number 4:191-203.
- Kuper M, Westheide W. 1997. Ultrastructure of the male reproductive organs in the interstitial annelid *Sphaerosyllis hermaphrodita* ("Polychaeta", Syllidae). *Zoomorphology* 117:13-22.
- Langhammer, H. 1928. Teilungs – und Regenerationsvorgänge bei *Procerastea halleziana* und ihre Beziehungen zur Stolonisation von *Autolytus prolifer*. *Wiss. Meeresunt. Helgoland* 7, 1-44
- Lans D, Wedeen CJ, Weisblat DA. 1993. Cell lineage analysis of the expression of an *engrailed* homolog in leech embryo. *Development* 117:857-871.
- Lanzavecchia G, de Eguileor M, Valvassori R. 1988. The ultrastructure of Polychaeta. *Microfauna Mar* 4:71-88.
- LeGore RS, Sparks AK. 1971. Repair of body wall incision in the rhynchobdellid leech *Piscicola salmositica*. *J Invertebr Pathol* 18(1):40-45.
- LeGore RS, Sparks AK. 1973. Repair of body wall burns in the rhynchobdellid leech *Piscicola salmositica*. *J Invertebr Pathol* 22(2):298-299.
- Martin P. 2001. On the origin of the Hirudinea and the demise of the Oligochaeta. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 268:1089-1098.
- Martinez-Arias A, Lawrence PA. 1985. Parasegments and compartments in the *Drosophila* embryo. *Nature* 313(6004):639-642.
- Martinez Arias A, Baker NE, Ingham PW. 1988. Role of segment polarity genes in the definition and maintenance of cell states in the *Drosophila* embryo. *Development* 103:157-170.
- Maxmen A, Browne WE, Martindale MQ, Giribet G. 2005. Neuroanatomy of sea spiders implies an appendicular origin of the protocerebral segment. *Nature* 437(7062):1144-1148.
- Megason SG, McMahon AP. 2002. A mitogen gradient of dorsal midline Wnts organizes growth in the CNS. *Development* 129:2087-2098.
- Mikels A, Nusse R. 2006. Wnts as ligands: processing, secretion and reception *Oncogene* 25:7461-7468.
- Miller JR. 2002. The Wnts. *Genome Biol* 3(1): Reviews3001.

- Minelli A. 2001. A three-phase model of arthropod segmentation. *Dev Genes Evol* 211(10):509-521.
- Miyawaki K, Mito T, Sarashina I, Zhang H, Shinmyo Y, Ohuchi H, Noji S. 2004. Involvement of Wingless/Armadillo signaling in the posterior sequential segmentation in the cricket, *Gryllus bimaculatus* (Orthoptera), as revealed by RNAi analysis. *Mech Dev* 121(2):119-130.
- Mohler J, Vani K. 1992. Molecular organization and embryonic expression of the *hedgehog* gene involved in cell-cell communication in segmental patterning of *Drosophila*. *Development* 115(4):957-971.
- Moore J, Willmer P. 1997. Convergent evolution in invertebrates. *Biol Rev* 72:1-60.
- Muller MC, Worsaae K. 2006. CLSM analysis of the phalloidin-stained muscle system in *Nerilla antennata*, *Nerillidium sp.* and *Trochonerilla mobilis* (Polychaeta; Nerillidae). *J Morphol* 267(8):885-896.
- Myohara M, Yoshida-Noro C, Kobari F, Tochinali S. 1999. Fragmenting oligochaete *Enchytraeus japonensis*: a new material for regeneration study. *Dev Growth Differ* 41(5):549-555.
- Nagy LM. 1994. Insect segmentation. A glance posterior. *Curr Biol* 4(9):811-814.
- Nagy LM, Carroll S. 1994. Conservation of wingless patterning functions in the short-germ embryos of *Tribolium castaneum*. *Nature* 367(6462):460-463.
- Nakamoto A, Arai A, Shimizu T. 2000. Cell lineage analysis of pattern formation in the *Tubifex* embryo. II. Segmentation in the ectoderm. *Int J Dev Biol* 44(7):797-805.
- Nederbragt AJ, van Loon AE, Dictus WJ. 2002. Expression of *Patella vulgata* orthologs of engrailed and dpp-BMP2/4 in adjacent domains during molluscan shell development suggests a conserved compartment boundary mechanism. *Dev Biol* 246(2):341-355.
- Nielsen C. 2001. *Animal Evolution. Interrelationships of the Living Phyla*. Oxford University Press, Oxford: 563 pp.
- Niwa N, Inoue Y, Nozawa A, Saito M, Misumi Y, Ohuchi H, Yoshioka H, Noji S. 2000. Correlation of diversity of leg morphology in *Gryllus bimaculatus* (cricket) with divergence in dpp expression pattern during leg development. *Development* 127(20):4373-4381.
- Nulsen C, Nagy LM. 1999. The role of wingless in the development of multibranching crustacean limbs. *Dev Genes Evol* 209(6):340-348.

- Nussbaum J. 1908. Beiträge zur Frage über die Abhängigkeit der Regeneration vom Nervensystem bei *Nereis diversicolor*, O.F. Müller. Wilhelm Roux Arch Entwicklungsmech Organism 25:632-642.
- Okada Y. 1929. Regeneration and fragmentation in the Syllidean Polychaets. Roux' Archiv 115:542-600.
- Pajaziti R. 2001. Morphologische und molekularbiologische Untersuchungen zur Segmentierung bei *Platynereis dumerilii* (Annelida, Polychaeta). Diplomarbeit.
- Panganiban G, Irvine SM, Lowe C, Roehl H, Corley LS, Sherbon B, Grenier JK, Fallon JF, Kimble J, Walker M, Wray GA, Swalla BJ, Martindale MQ, Carroll SB. 1997. The origin and evolution of animal appendages. Proc Natl Acad Sci USA. 13;94(10):5162-6.
- Pankratz MJ, Jäckle H. 1993. Blastoderm segmentation. The Development of *Drosophila melanogaster* Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York 1:467-516.
- Patel NH, Martin-Blanco E, Coleman KG, Poole SJ, Ellis MC, Kornberg TB, Goodman CS. 1989. Expression of Engrailed proteins in arthropods, annelids, and chordates. Cell 58(5):955-968.
- Paulus T, Muller MC. 2006. Cell proliferation dynamics and morphological differentiation during regeneration in *Dorvillea bermudensis* (Polychaeta, Dorvilleidae). J Morphol 267(4):393-403.
- Peel A, Akam M. 2003. Evolution of segmentation: rolling back the clock. Curr Biol 13(18):R708-710.
- Penners A. 1924. Experimentelle Untersuchungen zum Determinationsproblem am Keim von *Tubifex rivulorum* Lam. I. Die *Duplicitas cruciata* und organbildende Keimbezirke. Roux's Arch 102:51-100.
- Pfannenstiel H.D, 1984. The ventral nerve cord signals positional information during segment formation in an annelid (*Ophryotrocha puerilis*, Polychaeta) Roux's Arch Dev Biol. 194: 32-36
- Potswald HE. 1981. Abdominal segment formation in *Spirorbis moerchi* (Polychaeta). . Zoomorphology 97:225-245.
- Pourquie O. 2003. The segmentation clock: converting embryonic time into spatial pattern. Science 301(5631):328-330.
- Prud'homme B, de Rosa R, Arendt D, Julien JF, Pajaziti R, Dorresteyn AW, Adoutte A, Wittbrodt J, Balavoine G. 2003. Arthropod-like expression patterns of engrailed

- and wingless in the annelid *Platynereis dumerilii* suggest a role in segment formation. *Curr Biol* 13(21):1876-1881.
- Purschke G. 1997. Ultrastructure of nuchal organs in polychaetes (Annelida): new results and review. *Acta Zool (Stockh)* 78:123-143.
- Purschke G. 2002. On the ground pattern of Annelida. *Org Divers Evol* 2:181-196.
- Purschke G, Müller MCM. 2006 Evolution of body wall musculature. *Integrative and Comparative Biology*.
- Raible F, Tessmar-Raible K, Osoegawa K, Wincker P, Jubin C, Balavoine G, Ferrier D, Benes V, de Jong P, Weissenbach J, Bork P, Arendt D. 2005. Vertebrate-type intron-rich genes in the marine annelid *Platynereis dumerilii*. *Science* 310(5752):1325-1326.
- Rouse G, Fauchald K. 1995. The articulation of annelids. *Zool Scr* 24:269-301.
- Rouse G, Fauchald K. 1997. Cladistics and polychaetes. *Zool Scr* 26:139-204.
- Ruppert EE. 1991. Introduction to the aschelminth phyla: A consideration of mesoderm, body cavities and cuticle. *Microscopic Anatomy of Invertebrates*, Wiley-Liss Inc, New York, pp 4 : Aschelminthes:1-17.
- Ruppert EE, Fox RS, Barnes RD. 2003. *Invertebrate Zoology. A functional evolutionary approach*. Brooks/Cole- Thomson learning, Belmont, CA.
- Ruppert EE, Smith PR. 1988. The functional organization of filtration nephridia. *Biol Rev* 63:231-258.
- Salazar-Ciudad I, Sole RV, Newman SA. 2001. Phenotypic and dynamical transitions in model genetic networks. II. Application to the evolution of segmentation mechanisms. *Evol Dev* 3(2):95-103.
- Sambrook J; Fritsch E.F, und Maniatis T. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Hrsg.)* 2. Auflage Cold Spring Harbor, NY Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)
- Sarkar L., Cobourne M., Naylor S., Smalley M., Dale T., Sharpe P.T, 2000: Wnt/Shh interactions regulate ectodermal boundary formation during mammalian tooth development *Proc Natl Acad Sci U S A* 25; 97 (9): 4520-4
- Scholtz G. 2003. Is the taxon Articulata obsolete? Arguments in favour of a close relationship between annelids and arthropods. *The New Panorama of Animal Evolution, Proceedings of the 18th International Congress of Zoology* (ed A

- Legakis, S Sfenthourakis, R Polymeni and M Thessalou-Legaki) Pensoft, Sofia:489- 501.
- Scholtz G, Dohle W. 1996. Cell lineage and cell fate in crustacean embryos--a comparative approach. *Int J Dev Biol* 40(1):211-220.
- Schroder R, Eckert C, Wolff C, Tautz D. 2000. Conserved and divergent aspects of terminal patterning in the beetle *Tribolium castaneum*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(12):6591-6596.
- Seaver EC, Kaneshige LM. 2006. Expression of 'segmentation' genes during larval and juvenile development in the polychaetes *Capitella* sp. I and *H. elegans*. *Dev Biol* 289(1):179-194.
- Seaver EC, Paulson DA, Irvine SQ, Martindale MQ. 2001. The spatial and temporal expression of *Ch-en*, the engrailed gene in the polychaete *Chaetopterus*, does not support a role in body axis segmentation. *Dev Biol* 236(1):195-209.
- Seaver EC, Shankland M. 2001. Establishment of segment polarity in the ectoderm of the leech *Helobdella*. *Development* 128(9):1629-1641.
- Shankland M, Seaver EC. 2000. Evolution of the bilaterian body plan: what have we learned from annelids? *Proc Natl Acad Sci USA*. 25;97(9):4434-7.
- Shain DH, Ramirez-Weber FA, Hsu J, Weisblat DA. 1998. Gangliogenesis in leech: morphogenetic processes leading to segmentation in the central nervous system. *Dev Genes Evol* 208(1):28-36.
- Siegfried E, Wilder EL, Perrimon N. 1994. Components of *wingless* signalling in *Drosophila*. *Nature* 367(6458):76-80.
- Smith PR. 1992. Polychaeta: excretory system. *Microscopic Anatomy of Invertebrates Volume 7: Annelida*. Wiley-Liss Inc., New York, pp. :71-108.
- Smith, P.R, Ruppert, E. E. 1988. Nephridia. In Westheide, W. und C. O. Hermanns (eds), *The Ultrastructure of the Polychaeta*. *Microdauna* 4: 231-262.
- St Johnston D, Nusslein-Volhard C. 1992. The origin of pattern and polarity in the *Drosophila* embryo. *Cell* 68(2):201-219.
- Stephan-Dubois F. 1958. Le rôle des Leucocytes dans la Régénération caudale de *Nereis diversicolor*. *Arch Anat Pathol (Paris)* 47(4):605-652.
- Struck T, Hessling R, Purschke G. 2002. The phylogenetic position of the Aeolosomatidae and Parergodrilidae, two enigmatic oligochaete-like taxa of the "Polychaeta", based on molecular data. *J Zool Syst Evol Res* 40:155-163.

- Tachezy S. 1999. Vergleichende Analyse der Segmententstehung während der Ontogenese und der Regeneration bei *Platynereis dumerilii* (Annelida, Polychaeta). Staatsexamensarbeit
- D. 2004. Segmentation. *Dev Cell* 7(3):301-312.
- Tautz D, Sommer RJ. 1995. Evolution of segmentation genes in insects. *Trends Genet* 11(1):23-27.
- Tessmar Raible KG. 2004. The evolution of sensory and neurosecretory cell types in bilaterian brains. Dissertation.
- Tettamanti G, Grimaldi A, Congiu T, Perletti G, Raspanti M, Valvassori R, de Eguileor M. 2005. Collagen reorganization in leech wound healing. *Biol Cell* 97(7):557-568.
- Tzetlin A, Filippova A. 2005. Muscular system in polychaetes (Annelida). *Hydrobiologia* 535/536:113-126.
- Tzetlin A, Zhadan A, Ivanov I, Müller M, Purschke G, Anderson DT. 2002. On the absence of circular muscle elements in the body wall of *Dysponetus pygmaeus* (Chrysopetalidae, "Polychaeta", Annelida). *Acta Zool (Stockh)* 83:81-85.
- Veeman MT, Axelrod JD, Moon RT. 2003. A second canon. Functions and mechanisms of beta-catenin-independent Wnt signaling. *Dev Cell* 5(3):367-377.
- Wattez-Combaz A, 1995. Involvement of the ventral nerve cord in determination of dorsoventral polarity during caudal regeneration in the polychaete annelid *Nereis pelagic* *Ann Sci Nat Zool Biol Animale* 16 (3) 97-103.
- Wedeer CJ. 1995. Regionalization and segmentation of the leech. *J Neurobiol* 27(3):277-293.
- Wessing A, Polenz A. 1974. Structure, development and function of the protonephridia in trochophores of *Pomatoceros triqueter* (Annelida, Polychaeta, Sedentaria). *Cell Tiss Res* 156:21-33.
- Westheide W. 1986. The nephridia of the interstitial polychaete *Hesionides arenaria* and their phylogenetic significance (Polychaeta, Hesionidae). *Zoomorphology* 106:35-43.
- Westheide W. 1997. The direction of evolution within the Polychaeta. *J Nat Hist* 21:1-15.
- Westheide W, Rieger R. 2007. Spezielle Zoologie Teil1: Einzeller und Wirbellose Tiere. Spektrum, Akademischer Verlag 2. Auflage.

- Willmer P. 1990. Invertebrate relationships: patterns in animal evolution. Camb Univ Press, Cambridge.
- Wilson E. 1892. The cell-lineage of *Nereis*. A contribution to the cytogeny of the annelid body. J Morphol (6):361-480.
- Wilson E. 1925. The Cell in Development and Heredity. MacMillan Company - New York.
- Wurst W, Bally-Cuif L. 2001. Neural plate patterning: upstream and downstream of the isthmic organizer. Nat Rev Neurosci 2(2):99-108.

Publikationen und Tagungsbeiträge

Arthropod-like Expression Patterns of *engrailed* and *wingless* in the Annelid *Platynereis dumerilii* suggest a Role in Segment Formation

Prud'homme B, de Rosa R, Arendt D, Julien JF, Pajaziti R, Dorresteijn AW, Adoutte A, Wittbrodt J, Balavoine G. 2003. Curr Biol 13(21):1876-1881.

Cell distribution pattern and *wingless* expression during the segment formation in *Platynereis dumerilii*

Raphael Pajaziti und Adriaan Dorresteijn

GFE Tagung in Münster- Abstract und Poster

Danksagung

Bedanken möchte ich mich

- An erster Stelle bei Herrn Prof. Dr. Adriaan Dorresteyn, für das interessante Thema, die freundschaftliche Betreuung dieser Arbeit, die kritische Durchsicht des Manuskriptes und für so manch hilfreiche Diskussion.
- bei Frau PD Dr. Bettina Westermann für die kritische Durchsicht der Arbeit, vielen praktischen Tipps und der Bereitschaft zur Übernahme der Begutachtung.
- bei Dr. Martin Hardt für die große Unterstützung am REM und TEM.
- bei allen restlichen Mitgliedern des Instituts für Zoologie, insbesondere bei Dr. Anne Holz, Dr. Christian Melaun, Dr. Christoph Schaub und Dipl.Biol. Georg Wolfstetter für die vielen praktischen Tipps und Hilfe bei dem täglichen Kampf um die richtige Seite der Macht.
- bei Dr. Henrike Schmidtberg für die Hilfe am REM und bei der Histologie.
- bei Brigitte Fronk für die technische Hilfe im Labor und bei Feinmechanikermeister Jörg Schmand für die großartige technische Umsetzung vieler Ideen und natürlich den sinnstiftenden Diskussionen um Fußball, Politik und den ganzen Rest.
- bei meiner Freundin Angela Bachmann für die kritische Durchsicht und das Durchhaltevermögen mich weiter anzutreiben diese Arbeit endlich fertigzuschreiben
- bei meinen Eltern dafür, dass sie mir alles das ermöglicht haben.

EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

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 September 2008

Dipl. Biol. Raphael Pajaziti