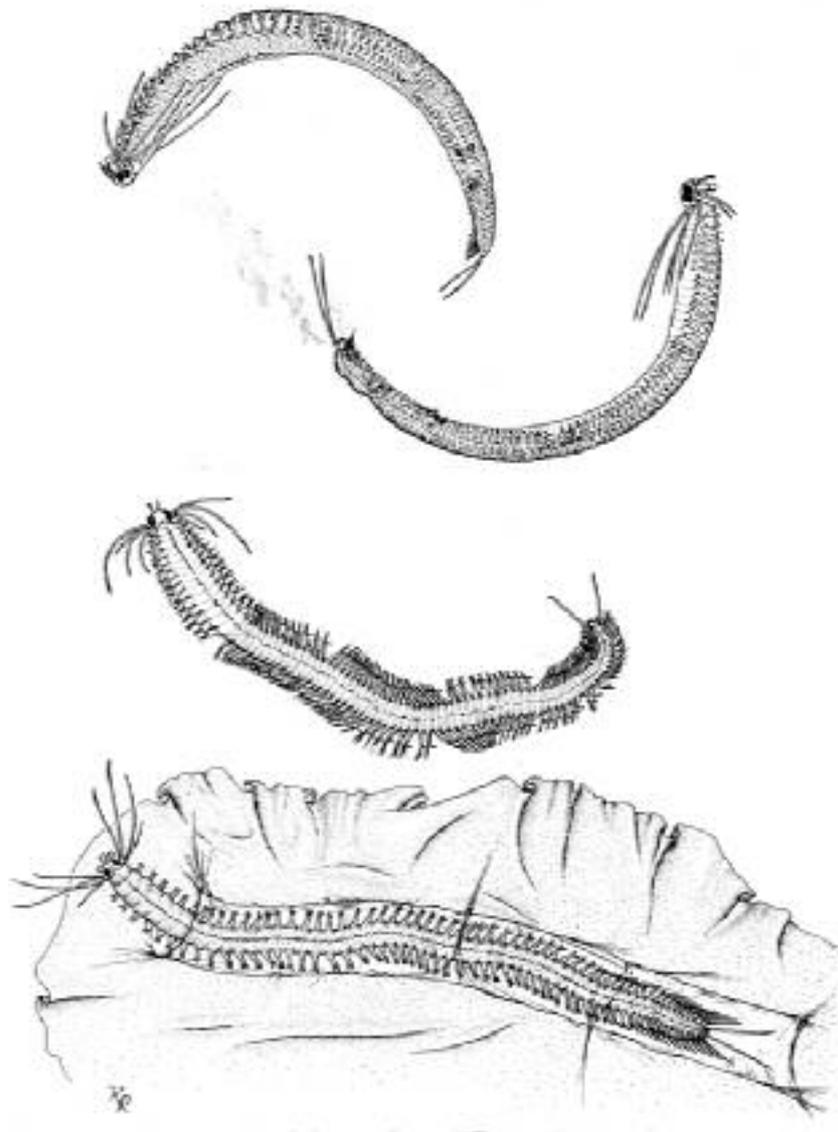


Proliferation und Charakterisierung von Elaeocyten bei *Platynereis dumerilii* (Annelida, Polychaeta)

Diplomarbeit



**Johannes Gutenberg-Universität Mainz
Fachbereich Biologie
Institut für Zoologie, Abteilung I**

**Vorgelegt von Mareike Schröer
Juni 2004**

Erstkorrektor: HD Dr. U. Hoeger

Zweitkorrektor: Prof. Dr. A. Fischer

Inhalt

Inhalt	3
Verwendete Abkürzungen	5
1 Einleitung	6
2 Material und Methoden	9
2.1 Verwendete Geräte	9
2.2 Verwendete Lösungen	9
2.3 Tiermaterial	12
2.3.1 <i>Platynereis dumerilii</i>	12
2.3.2 <i>Nereis diversicolor</i>	12
2.3.3 <i>Nereis virens</i>	12
2.4 Bestimmen des Geschlechts und des Reifezustands der Tiere	12
2.5 Bestimmung der Elaeocytengrößen	13
2.6 Dekapitieren von <i>Platynereis</i>	13
2.7 Beschichtung von Deckgläschen und Objektträgern	14
2.7.1 Polylysinbeschichtung.....	14
2.7.2 Gelatinebeschichtung.....	14
2.8 Gewinnung der Elaeocyten und Anheftung an Deckgläschen	15
2.9 Fixierung und Weiterbehandlung von Deckgläschen bzw. Elaeocyten	16
2.10 Fixierungsmethoden	16
2.10.1 Methanolfixierung.....	16
2.10.2 Formaldehydfixierung.....	16
2.10.3 Kombinierte Formaldehyd- und Methanolfixierung.....	17
2.10.4 Paraformaldehydfixierung.....	17
2.11 Verwendete Antikörper	17
2.11.1 Primäre Antikörper gegen Vitellin und Vitellogenin (polyklonal):.....	17
2.11.2 Primäre Antikörper gegen Coelomzellen.....	18
2.11.3 Sekundäre Antikörper:.....	18
2.11.4 Sonstige Antikörper:.....	18
2.12 Präadsorption von Antikörpern	19
2.13 Fluoreszenzmikroskopie	19
2.14 Laserscanmikroskopie	19
2.15 Anfärben der Zellkerne	19
2.16 Färbung mit Neutralrot	20
2.17 Färbung mit Acridinorange und MDY-64	20
2.18 Kryostatschnitte	20
2.18.1 Einfrieren von fixierten oder unfixierten Tieren.....	20
2.18.2 Kryostatschnitte.....	20
2.18.3 Fixierung von Kryostatschnitten.....	21
2.18.4 Immunohistochemie bei Kryostatschnitten.....	22
2.19 Methacrylatschnitte	23
2.19.1 BOUIN-Fixierung.....	23
2.19.2 Styrol-Methacrylat-Einbettung und Kunstharzdünnschnitte.....	23
2.19.3 Azanfärbung nach HEIDENHAIN.....	24
2.19.4 Doppelfärbung mit Hämalaun-Eosin.....	25

2.20	Paraffinschnitte	26
2.20.1	Fixierung von Totalpräparaten für Paraffineinbettung	26
2.20.2	Paraffineinbettung	26
2.20.3	Paraffinschnitte.....	27
2.20.4	Immunohistochemie bei Paraffinschnitten	27
2.21	Herstellen von Elaeocytenhomogenat für die Gelelektrophorese	28
2.22	Proteinbestimmung mit Bicinchonsäure (BCA assay)	28
2.23	Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)	29
2.24	Western-Blot von SDS-Gelen	29
2.25	Dot Blot für Proteine	31
3	Ergebnisse	32
3.1	Dünnschnitte von <i>Platynereis dumerilii</i>	32
3.2	Markierung der Coelomzellen durch die verwendeten Antikörper.....	41
3.3	Westernblots mit den Coelomzell-Antikörpern	47
3.4	Dot Blots mit den Coelomzell-Antikörpern	51
3.5	Markierung von Oocyten und Elaeocyten mit Vitellin-Antikörpern.....	53
3.6	Dot Blot-Versuche mit den Vitellin-Antikörpern.....	57
3.7	Granuläre Coelomzellen und extrazelluläre Granula	58
3.8	Vergleich der Fixierungsmethoden	61
3.9	Elaeocytengrößen bei dekapitierten Tieren und Kontrolltieren.....	62
3.10	Vergrößerte Elaeocyten („Riesen“elaeocyten)	65
3.11	Färbung von Elaeocyten mit Acridinorange und MDY-64.....	67
3.12	Autofluoreszenz bei <i>Platynereis dumerilii</i> Elaeocyten.....	71
4	Diskussion	73
4.1	Elaeocytenproliferation	73
4.2	Coelomzell-Antikörper	76
4.3	Nachweis von Vitellogenin und Vitellin	79
4.4	Granuläre Coelomzellen und extrazelluläre Granula	82
4.5	Elaeocytengrößen bei dekapitierten Tieren und Kontrolltieren.....	84
4.6	Extrem vergrößerte Elaeocyten („Riesen“elaeocyten)	86
4.7	Autofluoreszenz bei <i>Platynereis dumerilii</i> Elaeocyten.....	88
5	Zusammenfassung	89
6	Literatur	91
	Anhang	94

Verwendete Abkürzungen

°C:	Grad Celsius
µg:	Mikrogramm
µl:	Mikroliter
µm:	Mikrometer
A. dest.:	destilliertes Wasser
Abb.:	Abbildung
APS:	Ammoniumpersulfat
BCIP:	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolylphosphat
BSA:	Bovine Serum Albumin
cm:	Zentimeter
Da:	Dalton
DABCO:	Diazabicyclol-2,2,2-Octan
DAPI:	4',6-diamidino-2-phenylindole
DMSO:	Dimethylsulfoxid
DNA:	Desoxyribonukleinsäure
FITC:	Fluorescein-Isothiocyanat
g:	Erdbeschleunigung
h:	Stunden
kDa:	Kilodalton
l:	Liter
m:	milli
M:	molar
mg:	Milligramm
mm:	Millimeter
mM:	millimolar
NBT:	Nitroblautetrazoliumchlorid
nm:	Nanometer
PAGE:	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS:	Phosphate buffered saline
PFA:	Paraformaldehyd
ppm:	parts per million
RT:	Raumtemperatur
s:	Sekunden
SDS:	Natriumdodecylsulfat (Sodiumdodecylsulfat)
TEMED:	N,N,N',N'-Tetraethylendiamin
Tris:	Tris(hydroxymethyl)aminoethan
TRITC:	Tetramethylrhodamin-Isothiocyanat
Upm:	Umdrehungen pro Minute
UV:	Ultraviolett
v/v:	Volumen gegen Volumen
w/v:	Gewicht gegen Volumen

1 Einleitung

Platynereis dumerilii besitzt wie viele andere Polychaeten eine Leibeshöhle, die als Coelom bezeichnet wird, jedoch nicht vollständig von Coelomepithel ausgekleidet ist, sondern teilweise von den Muskeln der Körperwand begrenzt wird. Es handelt sich also eher um „ein Mittelding zwischen Coelom und Mixocoel“ (HAUENSCHILD und FISCHER 1969). Die Segmente werden durch Dissepimente getrennt, die allerdings unvollständig sind, so daß sich die Coelomflüssigkeit ungehindert innerhalb des Tieres bewegen kann. In der Coelomflüssigkeit flottieren verschiedene Typen von Zellen, die in Abb. 1 bis Abb. 3 dargestellt sind: Elaeocyten und unterschiedliche Granulocyten, die Abwehrfunktionen haben. Bei Tieren in der Phase der Geschlechtsreife befinden sich außerdem noch Keimballen oder weiter differenzierte Gameten im Coelom.

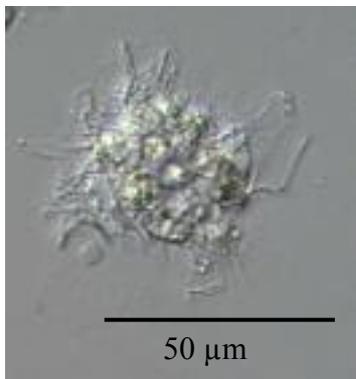


Abb. 1: *Platynereis dumerilii*: Granulocyte, die sich ähnlich einem „Spiegelei“ auf der Unterlage ausbreitet. Die Zelle bildet einen dünnen Saum aus, der zum Teil in Falten liegt. Das Cytoplasma enthält viele Granula.



Abb. 2: Freie Coelomzellen von *Platynereis dumerilii*: Elaeocyte, die ein Muskelfragment phagozytiert. Charakteristisch ist ein großer Lipidtropfen.



Abb. 4: *Platynereis dumerilii*: Oocytenballen, vereinzelt sind schon Lipidtropfen zu sehen, bei einigen Zellen tritt in der Mitte der Kern hervor. Die jungen Oocyten werden von einer Hüllzelle (nicht sichtbar) zusammengehalten.



Abb. 3: *Platynereis dumerilii*: Spermatocytenballen von eiförmiger Gestalt, der sich gerade in einzelne Spermatocyten auflöst. Bei den einzelnen Spermatocyten ist deutlich der große Kern zu sehen.

Die Elaeocyten von *Platynereis dumerilii* haben eine mehr oder weniger runde Gestalt, sind fast farblos oder leicht grünlich und durchsichtig. Sie sind leicht an ihrem großen Lipidtropfen zu erkennen. Eine weitere Besonderheit dieser Zellen besteht darin, daß sie eine voluminöse Vakuole besitzen, was für tierische Zellen eher untypisch ist. Die Zellen sind in der Lage, einen Pseudopodiensaum auszubilden und sich so an glatten Unterlagen anzuheften.

Ihre Aufgaben in vivo sind noch nicht restlos geklärt. Da sie zumindest zeitweilig größere Mengen an Glycogen und Lipiden enthalten (FISCHER und HOEGER 1993; HOEGER und KUNZ 1993), gelten sie als Speicherorgan für Reservestoffe.

Eine wichtige Funktion besteht auch darin, Muskelabbauprodukte, sogenannte Sarkolyten, zu phagocytieren (DEHORNE und DEFRETIN 1933). Solche Muskelfragmente entstehen bei Verletzungen durch äußere Einwirkung, aber auch bei der Umwandlung des atoken Tieres zur sogenannten Heteronereis-Form kurz vor der Geschlechtsreife. Zum Schwärmen wird eine andere Muskulatur benötigt als zum Kriechen, Schwimmen und Undulieren in der Gespinst-röhre. Deshalb wird die bestehende Muskulatur während der epitoken Metamorphose teilweise abgebaut. Auf diese Weise sorgen die Elaeocyten dafür, daß die Sarkolyten nach deren Verdau dem Körper erneut zu Verfügung gestellt werden können.

Eine weitere wichtige Aufgabe erfüllen die Elaeocyten der weiblichen Tiere, die bei Eintritt in die Phase der Geschlechtsreife Vitellogenin synthetisieren. Das Protein wird in die Coelomflüssigkeit abgegeben und aus dieser von den heranwachsenden Oocyten aufgenommen (FISCHER et al 1991, HAFER et al. 1992), welche es zu seiner endgültigen Speicherform, dem Vitellin, umwandeln. Das Vitellin wird in den Dottergranula der Eizellen gespeichert und dient als Nahrungsgrundlage für den heranwachsenden Embryo.

Die Elaeocyten in Nereiden sind schon seit dem Ende des vorletzten Jahrhunderts bekannt (CLAPARÈDE 1886). Sie wurden zunächst als sessile Zellen angesehen, die teils mit langen Stielen an der Wandung von Blutgefäßen ansitzen, vor allem in den Parapodien. Die Aufgabe dieser (damals) sogenannten Nephro-Phagocyten besteht darin, in die Coelomhöhle fallende Sarkolyten aufzunehmen und zu verdauen. Laut DEHORNE und DEFRETIN (1933) handelt es sich bei den frei in der Leibeshöhle flottierenden Zellen lediglich um gealterte Nephro-Phagocyten, die von ihrem Blutgefäß abgefallen sind. Daß diese Zellen noch immer Sarkolyten phagocytieren, wird mit einer großen Affinität des klebrigen Cytoplasmas zu Muskelmaterial erklärt. DEHORNE und DEFRETIN (1933) beschreiben die Entwicklung einer solchen Zelle folgendermaßen: Zunächst bilden sich flache Zellen auf der Wandung des Blutgefäßes. Diese erheben sich mehr und mehr und sind von einem dichten, homogenen Cytoplasma erfüllt. Schließlich bilden sie einen Stiel aus, und es treten kleine Vakuolen im voluminösen, distalen Zellbereich auf. Der große, runde distale Zellbereich kann weit vom Ort der Anheftung entfernt ins Coelom hineinreichen (s. Abb. 5). Ähnlich wie beispielsweise Cnidarierpolypen „fangen“ diese Phagocyten die Sarkolyten durch zufälligen Kontakt und Festkleben der „Beute“. Wenn eine solche Zelle ein paar Sarkolyten phagocytiert hat, deren Verdauungsüberreste in Vakuolen in der Zelle verbleiben, beginnt sie, Fett zu akkumulieren, löst sich von ihrem Blutgefäß ab und wird zur freien Elaeocyte. Diese Zellen werden als Endstadium in der Entwicklung der Nephro-Phagocyten aufgefaßt. Sie befinden sich im Zustand der Degeneration und lösen sich schließlich endgültig auf, wobei sie ihre Zellinhalte ins Coelom freisetzen und so den Gameten zur Verfügung stellen.

Neuere Untersuchungen über die Entstehung von Elaeocyten gibt es jedoch nur wenige (Übersicht bei DALES und DIXON 1981). Nach den letzteren Autoren werden die Coelomzellen bei Polychaeten von spezialisierten Bereichen des Coelomepithels gebildet.

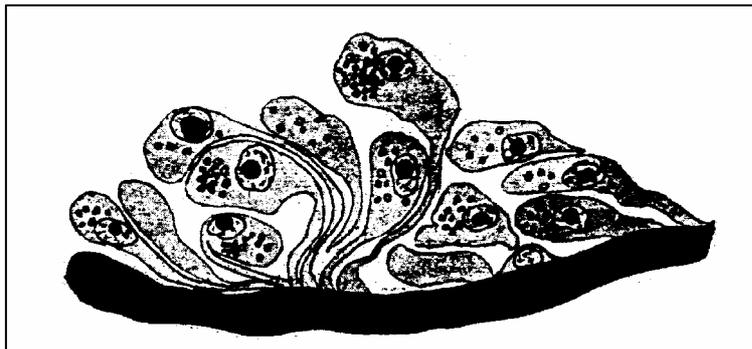


Abb. 5: Zeichnung von DEHORNE und DEFRETIN (1933) mit jungen, hier als Nephro-Phagocyten bezeichneten Elaeocyten, die alle an der Oberfläche eines Blutgefäßes verankert sind, teilweise aber an langen „Stielen“ weit in die Coelomhöhle hineinragen. Rechts unten ist eine neu entstehende Zelle abgebildet, die noch klein und flach ist und mit einer relativ großen Fläche am Blutgefäß anliegt.

Zielsetzung der Arbeit

Die vorliegende Arbeit entstand in Anknüpfung an eine frühere Diplomarbeit aus unserer Arbeitsgruppe (MAHLEIN 1991), bei der die bereits bekannte Vermehrung und Proliferation der Elaeocyten zu Beginn der Geschlechtsreife durch Bestimmung der Mitosehäufigkeit mit der Bromdesoxyuridin-Methode gezeigt wurde. Hierbei ergaben sich Hinweise, daß sich die Entstehung der Elaeocyten am dorsalen Blutgefäß vollzieht, aber auch andere Abschnitte des Coelothels, vor allem Blutgefäße, kamen in Frage. Deshalb sollte in dieser Arbeit genauer bestimmt werden, in welchen Bereichen des Blutgefäßsystems bei *Platynereis dumerilii* die Elaeocyten entstehen.

Außerdem sollte die Rolle der Elaeocyten bei der Vitellin- bzw. Vitellogeninsynthese näher beleuchtet werden, indem mit Hilfe von Antikörpern das Vitellogenin sichtbar gemacht wird. Auf diese Art und Weise erhoffte ich mir, die für Bildung und Speicherung des Dotterproteins zuständigen Zellorganellen in den Elaeocyten ausfindig machen zu können.

Ein weiterer zu untersuchender Aspekt ist der Einfluß des Gehirns, insbesondere seiner neuroendokrinen Sekrete, auf die Elaeocyten. Der Einfluß auf die Reifung der Keimzellen und die Metamorphose zur sogenannten Heteronereis-Form wurde bereits von HAUENSCHILD (1966) ausgiebig untersucht. Dabei zeigte sich, daß ein im Prostomium produziertes Hormon anfangs für die normale Reifung der Oocyten notwendig ist, der Wegfall des Hormons in einem späteren Stadium aber zu einer Beschleunigung der Reife führt. Auch bei männlichen Würmern ist die Einleitung der Gametogenese an das Vorhandensein eines Prostomiums gebunden, im weiteren Verlauf ist die Spermatogenese jedoch davon unabhängig (HAUENSCHILD und FISCHER 1969). Diese Befunde wurden durch Beobachtungen an Tieren gewonnen, bei denen durch Entfernung des Gehirns die Geschlechtsreife künstlich beschleunigt werden konnte. Darüber hinaus bewirkt dieser experimentelle Eingriff aber auch einen starken Anstieg der Proliferation von Elaeocyten, die somit ebenfalls unter dem Einfluß der neurosekretorischen Aktivität des Gehirns stehen.

Die Proliferation von Elaeocyten stellt einen interessanten Differenzierungsprozeß dar, bei dem die Zellen des Coelomepithels bzw. der Blutgefäße sich nach Zellteilung neu differenzieren und zu einem anderen Zelltyp mit charakteristischen Merkmalen (große Vakuole, Lipidtropfen) umwandeln (s. Abb. 2). Zur differentiellen Markierung von Elaeocyten sollten verschiedene gegen Coelomzellen von *Nereis diversicolor* entwickelte Antikörper auf ihre Spezifität bei Coelomzellen, insbesondere Elaeocyten, von *Platynereis dumerilii* getestet werden. Mit einem solchen spezifischen Antikörper könnte man bei proliferierenden Elaeocyten feststellen, von welchem Stadium an sie von dem Antikörper als solche erkannt werden und damit verschiedene Phasen der Differenzierung im Verlauf ihrer Proliferation widerspiegeln. Auf diese Weise wäre es auch möglich, verschiedene Subpopulationen von freien Elaeocyten zu unterscheiden.

2 Material und Methoden

2.1 Verwendete Geräte

- Blotapparatur (semi-dry), Biotec – Fischer
- Laser Scan Mikroskop: Leica R2
- Mikroskope: Zeiss Axioplan, Zeiss Axioskop mit Epifluoreszenzeinrichtung
- Mikro-Osmometer Model 3MO (Dinkelberg Labortechnik)
Mikrotom: Reichert-Jung Supercut 2050
- Vertikalelektrophoresekammer (10 x 10 cm, Gelstärke 0,75 mm), Bio Rad
MiniProtean 3[®]
- Waagen: Sartorius laboratory R2000, research L610
- Zentrifugen: DuPont Instruments Sorvall[®] RC-5B
Heraeus Biofuge A[®]
Hettich Rotanta / RP

2.2 Verwendete Lösungen

Betäubungslösung MgCl₂/Seewasser:

1 Teil Seewasser, 1 Teil 7,5% MgCl₂

Fixierungslösung für die Formalinfixierung (PEM/FA):

neun Teile PEM (s. u.), ein Teil Formaldehyd (36,5%)

PEM: 0,1 M Pipes (Piperazin-N,N'-bis-(2-Ethan)Sulfonsäure)

2 mM EGTA (Ethylenglykol-bis-(2-Aminoethylether)-N,N'-Tetraessigsäure)

1 mM MgSO₄

pH ad 6,95 (mit NaOH eingestellt)

PBS (Phosphate Buffered Saline):

137,00 mM NaCl

2,70 mM KCl

8,00 mM Na₂HPO₄*2H₂O

1,50 mM KH₂PO₄

0,01 % Na₃N (antibakteriell)

pH ad 7,4

PBT: PBS mit 0,04% TWEEN 20 (nichtionisches Detergens). Die Konzentration von TWEEN wurde in einigen Fällen auch variiert (0,01-0,1%), um den Effekt des Detergens' auf die Permeabilisierung der Zellmembranen zu untersuchen.

PBS-DABCO-Glycerin: 25,00 mg/ml Diazabicyclol-2,2,2-Octan (DABCO) in PBS ansetzen
1:10 mit Glycerin verdünnen

DABCO/DAPI: 25,00 mg/ml Diazabicyclol-2,2,2-Octan (DABCO) in PBS ansetzen
1:10 mit Glycerin verdünnen
1:1 mischen mit DAPI-Stammlösung (0,5 µg/ml PBS)
Endkonzentration DAPI: 0,25 µg/ml DABCO/DAPI

NH₄Cl-Lösung: PBS (siehe oben)
+ 50 mM NH₄Cl

PFA-Fixierungsmittel: 2,7 mM KCl
 8 mM Na₂HPO₄*2H₂O
 1,5 mM KH₂PO₄
 0,5 M NaCl
 4 % Paraformaldehyd
 0,04 % TWEEN 20
 pH ad 6,95 (mit NaOH eingestellt)

BOUIN'sches Gemisch:

15 Teile gesättigte wäßrige Pikrinsäure filtrieren, dann mit 5 Teilen Formol (etwa 35 %) mischen und 1 Teil Eisessig zusetzen. Formol und Eisessig sollten erst kurz vor Gebrauch dazugegeben werden. Statt Wasser kann bei marinen Objekten Seewasser verwendet werden. (Rezept aus ROMEIS, Mikroskopische Technik)

Blockierungslösungen:

- Blocking Solution (u.a. für Kryostatschnitte): 0,01 % (v/v) Tween 20
 0,5 M NaCl
 0,1 % Ovalbumin
 0,5 % Fischgelatine
 in PBS
- Schafserum (Sigma S-2263), 1:10 verdünnt in PBS
- 5 % Magermilchpulver in PBS
- 1 % Magermilchpulver in PBS

Lösungen für die Proteinbestimmung (BCA-Test):

Lösung A (in Aqua dest.):

Na ₂ CO ₃	2,00% (w/v)
Na-Tartrat	0,16% (w/v)
Natriumhydroxid	0,40% (w/v) (= 1N)
NaHCO ₃	0,95% (w/v)

Lösung unbeschränkt haltbar

Lösung B (in Lösung A):

BCA (Na-Salz) in A 1,00% (w/v)

Etwa eine Woche bei Raumtemperatur haltbar

Lösung C:

CuSO₄*5H₂O 4,00% (w/v)

Lösung unbeschränkt haltbar

Gebrauchs-Reagenz:

50 Teile B und 1 Teil C mischen

Das Reagenz ist einige Stunden haltbar.

Protein-Standard:

Rinderserumalbumin (BSA) 1mg/ ml in entsprechendem Puffer

Lösungen für Polyacrylamid-Gelelektrophorese:

4x Sammelgelpuffer:

0,5 M Tris-Cl, pH 6,8

in ddH₂O lösen. Für SDS-PAGE zusätzlich 0,4 % (w/v) SDS zusetzen.

4x Trenngelpuffer:

1,5 M Tris-Cl, pH 8,8

0,4 % (w/v) NaN_3

in ddH₂O lösen. Für SDS-PAGE zusätzlich 0,4 % (w/v) SDS zusetzen.

Reduzierender SDS-Probenpuffer (LÄMMLI 1970):

125 mM Tris-Cl, pH 6,8

2 mM EDTA

20 % (w/v) Glycerin

10 % (v/v) β -Mercaptoethanol

4 % (w/v) SDS

0,04 % (w/v) Bromphenolblau

in H₂O lösen

Lösungen für Westernblot von SDS-Gelen:

Blotpuffer: nach KYHSE-ANDERSEN (1984)

Puffer 1: 25 mM Tris in 20% Methanol, pH 10,4

Puffer 2: 300 mM Tris in 20% Methanol, pH 10,4

Puffer 3: 40 mM Norleucin (z.B. SIGMA N-6752) in 25 mM Tris, pH 9,4

Weitere Lösungen

- PBS 5x: 685 mM NaCl
13,5 mM KCl
40 mM Na_2HPO_4
7,5 mM KH_2PO_4
pH ad 7,5

- PBT: 0,1% TWEEN 20 in 1x PBS

- Blocking Puffer: 5% Magermilchpulver in 1xPBS mit Ultraschall suspendiert

- Antikörper-Puffer: Blocking Puffer 1:4 verdünnt in PBS

- Äquilibrierungslösung: 100 mM Tris
100 mM NaCl
50 mM MgCl_2
pH ad 9,0

Lösungen für Dot Blots:

Äquilibrierungslösung: 100 mM Tris
100 mM NaCl
50 mM MgCl_2
pH ad 9,0

Reduzierender SDS-Probenpuffer (LÄMMLI 1970):

125 mM Tris-Cl, pH 6,8

2 mM EDTA

20 % (w/v) Glycerin

10 % (v/v) β -Mercaptoethanol

4 % (w/v) SDS

0,04 % (w/v) Bromphenolblau

in H₂O lösen

Färbelösung: 10 ml Äquibrierungslösung
100 µl NBT
75 µl BCIP

2.3 Tiermaterial

2.3.1 *Platynereis dumerilii*

Platynereis dumerilii ist natürlicherweise ein Bewohner der felsigen Buchten des Mittelmeeres. Er wird in einem eigenen Kulturenraum nach der Methode von HAUENSCHILD und FISCHER (1969) gezüchtet und gehalten. Die Hälterung erfolgt bei konstanten Temperatur- und Lichtbedingungen (18°C; Beleuchtungsdauer 16/8 h hell/dunkel). Eine Ausnahme bildet die künstliche Mondphase, bei der alle 28 Tage für eine Woche in der Dunkelphase ein schwaches Dämmerlicht (Glimmlampe) zugeschaltet wird. Die Tiere befinden sich in Kunststoffschalen mit Deckel und werden ständig belüftet. Sie leben in Gespinnströhen am Boden der Schale. Reife Tiere werden regelmäßig abgesammelt und zunächst nach Geschlecht getrennt gehalten. Nach Erreichen der Schwärbereitschaft werden sie zum Ablachen zusammengesetzt. Das Züchten und die Entwicklung der Larven erfolgen in reinem natürlichem Seewasser; die adulten Tiere hingegen werden in einem Gemisch, bestehend aus natürlichem und künstlichem Seewasser im Verhältnis 1:1, gehalten. Gefüttert werden die Würmer jeweils einmal in der Woche mit zerkleinertem Spinat, zerkleinertem Fischfutter (Tetramin[®]) und Algen der Art *Tetraselmis marina*.

2.3.2 *Nereis diversicolor*

Nereis diversicolor wird in einer kontinuierlichen Kultur bei 12-15°C in künstlichem Seewasser (Tropic Marin[®] 33 ‰) gehalten. Die Tiere leben eingegraben im Sand in großen Kunststoffbecken und werden mit Fischfutter (Tetramin[®]) gefüttert. Sie vermehren sich in Kultur, werden aber nicht gezielt gezüchtet. Eine Besonderheit dieser Art besteht darin, daß das Geschlechterverhältnis bei ca. 1000:1 Weibchen zu Männchen liegt.

2.3.3 *Nereis virens*

Nereis virens wird in demselben Raum wie *Nereis diversicolor* ebenfalls bei 12-15°C gehalten. Es handelt sich bei den Versuchstieren um Wildfänge, die aus der Oosterschelde nahe Yerseke in den Niederlanden stammen. Die Tiere graben sich in das Bodensubstrat (ebenfalls aus Yerseke stammender Muschelbruch) ein und können dort im Extremfall mehrere Monate lang ohne Nahrung überleben.

2.4 Bestimmen des Geschlechts und des Reifezustands der Tiere

Platynereis dumerilii läßt sich durch 20minütige Inkubation in einem 1:1 Gemisch aus MgCl₂ (7,5%) und Seewasser betäuben. Im betäubten und damit entspannten Zustand wird das Tier ringförmig auf einen Objektträger gelegt, so daß sich Kopf und Schwanzende berühren. In die Mitte gibt man einen Tropfen Seewasser oder MgCl₂-Seewasser-Gemisch. Nun wird vorsichtig an der Innenseite des Rings mit einer kleinen spitzen Schere, bei Bedarf unter Zuhilfenahme einer Pinzette, ein Parapodium abgeschnitten, so daß etwas Coelomflüssigkeit inklusive darin enthaltener Zellen austritt. Der Wurm kann nun in Seewasser zurückgesetzt werden und erwacht nach ca. 10 Minuten aus seiner Betäubung. Die entstandene Wunde wird durch Kontraktion verschlossen und das Parapodium regeneriert. Die ausgetretene Coelomflüssigkeit kann mit Deckgläschen mit Abstandshaltern oder ohne Deckgläschen unter dem Mikroskop betrachtet werden. Meist findet man darin Elaeocyten, Granulocyten und Gameten. Anhand letzterer läßt sich das Geschlecht feststellen. Bei Tieren am Beginn der Geschlechtsreife findet man Keimballen, die die Bestimmung des Geschlechts nicht immer eindeutig ermöglichen. Im etwas fortgeschritteneren Zustand kann man dann relativ leicht Oocytenballen von

Spermatogonienballen unterscheiden. Bei den weiblichen Tieren kann man den Reifezustand anhand des Oocytenmessers charakterisieren. Dieser kann mit Hilfe von Digitalfotos und dem hier verwendeten AnalySIS-Programm nach entsprechender Kalibrierung des Bildfeldes leicht gemessen werden. Bei den Männchen kann man das Stadium der Geschlechtsreife anhand des Vorhandenseins von Spermatogonienballen, Spermatocytenballen, einzelnen Spermatocyten, Spermatidentetraden oder freien Spermien unterscheiden.

2.5 Bestimmung der Elaeocytengrößen

Die zu beobachtenden Tiere werden einzeln in kleinen Boverischalen bei täglichem Wasserwechsel gehalten. Sie werden jeden Tag einmal betäubt und auf einen Objektträger gelegt. Die nach Anschneiden eines Parapodiums austretende Coelomflüssigkeit wird dann unter dem Mikroskop betrachtet (siehe Abschnitt 2.4). Mit einer Digitalkamera werden bei 20facher Vergrößerung Fotos von den Elaeocyten gemacht, auf denen im Idealfall jeweils ca. 50 Zellen zu sehen sind. Zum Aufnehmen einer Zellgrößenverteilung sollten pro Tier und Tag mindestens 100 Zellen zum Vermessen zur Verfügung stehen. Dies erfordert von jeder Coelomflüssigkeitsprobe mehrere Fotos an unterschiedlichen Stellen. Die Auswertung erfolgt mit dem AnalySIS-Programm. Durch Umfahren der Zellen mit der Maus kann die eingeschlossene Fläche errechnet werden und daraus wiederum ein durchschnittlicher Durchmesser jeder einzelnen Zelle. Für die weitere Auswertung werden die ermittelten Zelldurchmesser in Größenklassen im Abstand von 3 µm eingeteilt. Die Fotos sollten möglichst bald nach Entnahme der Probe gemacht werden, da die Elaeocyten sonst ihre Vakuole verlieren oder einen Pseudopodiensaum ausbilden könnten, was beides die sichtbare Fläche verändert und damit zu falschen Durchmesserangaben führt.

2.6 Dekapitieren von *Platynereis*

Die Würmer werden in einem Gemisch aus gleichen Teilen Seewasser und MgCl₂-Lösung (7,5 %) betäubt. Im erschlafften Zustand legt man sie möglichst gestreckt auf einen Objektträger. Unter dem Binokular werden die Tentakel des Kopfes nach vorne gestrichen. Nun wird der Kopf mit zwei gekreuzten Rasierklingen in Klingenhaltern (oder einem Augenskalpell) abgetrennt. Dies kann direkt hinter dem Prostomium, vor dem ersten Parapodienpaar, erfolgen. Bei diesem Schnitt ist die Wunde relativ klein und die Mundöffnung bleibt meist sogar intakt. Die andere Möglichkeit ist, den Schnitt hinter dem muskulösen Pharynx zu führen, also etwa zwischen dem vierten und fünften parapodientragenden Segment. In diesem Fall entsteht eine größere Wunde, die sich aber durch Kontraktion relativ schnell schließt und bei Verwendung von scharfen, sauberen Klingen in der Regel nach 1-2 Tagen gut verheilt ist. Die dekapitierten Tiere werden im Kulturreaum einzeln in kleinen Boverischalen in Seewasser gehalten, welches nach Möglichkeit jeden Tag gewechselt werden sollte. Um die Überlebenschancen der geköpften Tiere (vor allem am ersten Tag) zu erhöhen, kann man dem Seewasser Antibiotika zugeben (Penicillin und Streptomycin, jeweils 0,02 %). Die Antibiotika werden abgewogen, in etwas destilliertem Wasser gelöst und dann mit Seewasser auf die gewünschte Konzentration verdünnt.

Um den Einfluß neurosekretorischer Substanzen auf Elaeocyten und Geschlechtszellen zu untersuchen und als Kontrolle gegenüber Tieren, denen nach der Dekapitierung das Gehirn fehlt, wird an Tieren, die zwischen viertem und fünftem parapodientragenden Segment dekapitiert worden sind, eine Prostomium-Implantation vorgenommen. Hierzu wird das Prostomium eines Spendertieres oder auch das des Empfängertieres selbst vom Pharynx abgetrennt und von seinen Tentakeln befreit. Um das Einführen des Prostomiums in die Leibeshöhle zu erleichtern, legt man den Wurm U-förmig auf den Objektträger und schneidet eine Parapodienansatzstelle auf der Außenseite an. Das verbleibende Stück des Kopfes mit dem darin enthaltenen Gehirn wird durch die entstandene kleine Öffnung an der Parapodienansatzstelle ins Coelom des Wurmes gesteckt und mit einer Nadel einige Segmente weiterschoben, wobei

das Tier mit einer feinen Pinzette festgehalten wird. Durch die starken Bewegungen beim Erwachen aus der Betäubung kommt es jedoch vor, daß das Prostomium wieder aus dem Coelom herausgedrückt wird.

Die Überlebenschancen der dekapitierten Tiere kann man weiter erhöhen, indem man im betäubten Zustand vorsichtig den Darminhalt herausdrückt. Beim Erwachen aus der Narkose kommt es andernfalls leicht zu Blutungen und Darmrissen, da sich die Tiere sehr ruckartig bewegen. Um dem Hervorquellen des Darmes am Vorderende vorzubeugen, kann man nach der eigentlichen Dekapitierung den Darm ein Stückchen herausziehen und gesondert abschneiden.

2.7 Beschichtung von Deckgläschen und Objektträgern

2.7.1 Polylysinbeschichtung

Poly-L-Lysin (Sigma, MW > 300 000 g/mol) wird in der Konzentration 1mg/ml in Aqua dest. gelöst. Da Polylysin relativ schwer löslich ist, geschieht dies am besten über Nacht auf dem Magnetrührer. Die Objektträger oder Deckgläschen werden mit 100% Ethanol gereinigt. Mit einer Pipette wird der Objektträger dann mit ca. 20 Tropfen bzw. das Deckgläschen mit etwa 50 µl des gelösten Polylysins gleichmäßig benetzt. Durch Verdunsten der Lösung bei Zimmertemperatur werden die Objektträger oder Deckgläschen getrocknet und zum Schutz vor Staub dabei abgedeckt.

Im Vergleich zu Objektträgern erwies sich die Verwendung, beschichteter Deckgläschen (15x15 mm) als praktischer, weil so die verschiedenen Waschschrte einfach in den Kammern von 24-well Zellkulturschalen durchgeführt werden konnten. Objektträger sind durch ihre Größe nicht so leicht zu handhaben.

2.7.2 Gelatinebeschichtung

Eine 0,5%ige Gelatinelösung in Aqua dest. wird auf 60°C erwärmt. Die mit 100% Ethanol gereinigten Deckgläschen werden mit etwa 50 µl der Gelatinelösung gleichmäßig benetzt. und anschließend wie oben (siehe Abschnitt 2.7.1) getrocknet.

Beim Vergleich von Polylysin und Gelatine fiel auf, daß auf den polylysinbeschichteten Flächen eine etwas größere Anzahl von Zellen haftet und diese beim Bewegen des Deckglases besser fixiert sind. Die Beschichtung erscheint also für die Anheftung von Elaeocyten geeigneter. Der Unterschied ist jedoch nicht besonders groß, von Gelatinebeschichtung ist also nicht unbedingt abzuraten.

Eine alternative Reinigungsmöglichkeit für die Deckgläschen vor der Beschichtung besteht darin, sie über Nacht in 10% Extran (Merck) einzulegen (in einer 24-well Zellkulturschale) und/oder sie mit Ultraschall zu behandeln. Anschließend wäscht man sie noch in Aqua dest., um die Rückstände des Reinigungsmittels zu entfernen.

Wie sich im Verlauf der Untersuchungen zeigte, bringen die Gelatine- und Polylysinbeschichtungen den Nachteil mit sich, daß sie bei Behandlung mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern eine relativ starke Hintergrundfluoreszenz verursachen. Deshalb versuchte ich, die Elaeocyten auf unbeschichtete Deckgläschen zu bringen. Mit Hilfe eines Zentrifugeneinsatzes zum Anzentrifugieren von Zellen aus größeren Flüssigkeitsvolumina (s. Abschnitt 2.8) gelang es, auch ganz ohne Beschichtung eine fast ebenso große Zelldichte auf den Deckgläschen zu erreichen.

2.8 Gewinnung der Elaeocyten und Anheftung an Deckgläschen

Zunächst werden die Tiere mit $MgCl_2$ /Seewasser (siehe Abschnitt 2.2) betäubt. Im Vergleich zu *Platynereis* (Betäubungszeit 10-20 min) ist bei *Nereis diversicolor* eine wesentlich längere Wartezeit (30-60 min) erforderlich, wenn man das gleiche Gemisch verwendet. Um den Vorgang zu beschleunigen, kann man die $MgCl_2$ -Konzentration erhöhen und/oder das Gefäß kühl stellen. Bei *Nereis virens* wirkt die $MgCl_2$ -Betäubungslösung aufgrund seiner Körpergröße nicht. Die Tiere werden deshalb in wenig Seewasser auf einen Metallblock in der $-20^\circ C$ -Gefriertruhe gestellt, bis das Wasser zu frieren beginnt. Die Tiere sind dann genügend betäubt, wenn sie sich auch bei Berührung nicht mehr bewegen und völlig erschlafft sind.

Das betäubte Tier wird mit Insektennadeln vorn und hinten in einer mit Silikon ausgegossenen Kunststoffschale festgesteckt. Mit einer feinen, spitzen Schere, gegebenenfalls unter Zuhilfenahme einer feinen Pinzette, wird die Coelomhöhle dorsolateral eröffnet. Man schneidet das Tier der Länge nach auf, möglichst ohne den Darm zu verletzen. Anschließend wird etwas Seewasser auf das Tier gegeben, so daß die im Coelom flottierenden Zellen herausgespült werden. Die Zellsuspension wird mit einer Pipette aufgenommen und in ein Eppendorfgefäß gegeben. Der Vorgang wird noch 1-2 mal wiederholt, um eine möglichst hohe Zellausbeute zu erreichen. Dabei kann man auch vorsichtig mit einem stumpfen Gegenstand, z.B. einer Kunststoff-Pipettenspitze, letzte Zellen aus dem Tier herausdrücken.

Falls der Darm des Tieres bei der Präparation verletzt wurde, befinden sich Verdauungsenzyme in der Zellsuspension, die die Elaeocyten schädigen. Deshalb werden die Elaeocyten durch Zentrifugation im Eppendorfgefäß eine Minute lang bei 150 g sedimentiert. Der Überstand mit kleinen und damit langsam sedimentierenden Partikeln (z.B. freien Spermien) wird mit einer Pipette abgesaugt und verworfen; das Pellet wird mit frischem Seewasser aufgenommen. Dieser Vorgang wird noch einmal wiederholt. Sind immer noch zu viele freie Spermien oder Spermatidenquartette enthalten, so kann man noch eine zweiminütige Zentrifugation bei 50 g, anschließen. Das Pellet wird dann in Seewasser resuspendiert und die Suspension durch ein Nylonnetz mit einer Maschenweite von 50 μm gesiebt. Hierdurch werden eventuelle Epidermisstücke und vor allem Oocyten und Keimballen aus der Suspension entfernt. Das Filtrat enthält dann nur noch Elaeocyten, Granulocyten und kleine ($< 50 \mu m$) freie Oocyten. Die Zellsuspension wird auf beschichtete Deckgläschen oder Objektträger aufgetragen. Nach 15 Minuten haben sich die Zellen abgesetzt, eventuell einen Saum ausgebildet und sich mit Pseudopodien festgeheftet, so daß der weitgehend zellfreie Überstand mit einer Pipette abgenommen werden kann. Nun sind die Zellen bereit für die Fixierung, die auch möglichst bald geschehen sollte, da die Elaeocyten im unfixierten Zustand leicht ihre Vakuolen verlieren.

Um die Elaeocytendichte auf dem Deckgläschen bzw. Objektträger zu erhöhen, wurde von der Institutswerkstatt eigens zu diesem Zweck ein Zentrifugeneinsatz angefertigt. Dieser besteht aus zwei Plexiglasplatten, die mit vier Schrauben aneinandergedreht werden. Die untere Platte besitzt eine Aussparung für einen Objektträger, die obere vier Bohrungen mit Dichtungsringen. Die Deckgläschen, an die Zellen angeheftet werden sollen, werden unterhalb der Dichtungsringe auf den Objektträger gelegt und durch Zudrehen der vier Schrauben wasserdicht fixiert. Nun gibt man bis zu 1 ml Zellsuspension in jede Bohrung und zentrifugiert zwei Minuten lang bei 550 g. Anschließend werden die Überstände abgesaugt und die Deckgläschen mit den anhaftenden Zellen entnommen. Die Fixierung sollte auch hier möglichst bald geschehen, da die Zellen nach Absaugen des Überstandes schnell eintrocknen oder bei längerer Aufbewahrung in unfixiertem Zustand in Seewasser oder Puffer ihre Vakuolen verlieren.

2.9 Fixierung und Weiterbehandlung von Deckgläschen bzw. *Elaeocyten*

Die Fixierungs- und Waschschriffe erfolgen in 24-well Zellkulturschalen. Für jedes Deckglas wird eine Kammer mit 2,5 ml der entsprechenden Flüssigkeit gefüllt und das Deckglas senkrecht hineingestellt. Wenn die fixierten (siehe Abschnitt 2.10) Zellen zunächst aufbewahrt werden sollen und nicht direkt weiterbehandelt werden, wäscht man 10 Minuten mit PBS und bewahrt sie dann auch in PBS im Kühlschrank auf.

Man kann die Zellen 15 Minuten bei 37°C mit Protease K (100µg/ml) behandeln, wodurch sie für den Antikörper permeabel werden. Dazu legt man die Deckgläschen waagrecht auf einen Heizblock und überschichtet sie mit ca. 50 µl der Proteaselösung. Vor allem wenn im Fixierungsmedium noch kein Detergens enthalten ist, ist es ratsam, zweimal 10 Minuten mit PBT zu waschen. Danach erfolgt die Blockierung für eine halbe Stunde bei Raumtemperatur und anschließend die Inkubation mit dem primären Antikörper, bei Raumtemperatur mindestens zwei Stunden oder bei +4°C über Nacht. Hierzu legt man die Deckgläschen waagrecht in ein mit feuchtem Papier ausgelegtes, verschließbares Behältnis, um eine feuchte Kammer herzustellen. Von dem Antikörper reichen 30 µl aus, um ein Deckgläschen zu benetzen. Daran schließen sich zwei 10minütige Waschschriffe mit PBS an. Auch der sekundäre Antikörper wird in der feuchten Kammer aufgetragen, ebenfalls 30 µl pro Deckglas. Die Inkubation erfolgt für mindestens zwei Stunden bei Raumtemperatur oder bei +4°C über Nacht; in jedem Fall aber im Dunkeln, sofern es sich um fluoreszenzmarkierte Antikörper handelt. Danach wird noch zweimal 10 Minuten mit PBS ebenfalls im Dunkeln gewaschen. Die Deckgläschen werden auf der nicht mit Zellen besetzten Seite vorsichtig mit saugfähigem Papier abgetrocknet und dann mit Zell-Seite nach unten auf einen vorbereiteten Objektträger gelegt. Auf diesem befindet sich ein Tropfen (ca. 10 µl) PBS-DABCO-Glycerin, gegebenenfalls als Gemisch mit DAPI-Lösung. PBS-DABCO-Glycerin soll ein schnelles Ausbleichen der Fluoreszenz verhindern. Die fertigen Präparate kann man im Dunkeln bei -20°C aufbewahren.

Sind die Zellen einmal fixiert, kann man die Prozedur an jeder Wasch-Stelle unterbrechen und die Deckgläschen in PBS (mit 0,01% Natriumazid) bei +4°C bis zu mehreren Tagen aufheben.

2.10 Fixierungsmethoden

2.10.1 Methanolfixierung

Die Kammern einer 24-well Zellkulturschale werden mit jeweils 2,5 ml eiskaltem Methanol (-20°C; Tiefkühltruhe) befüllt. Die Kulturschale wird einige Minuten bei -20°C aufbewahrt, bevor die Deckgläschen (15x15 mm) hineingestellt werden. (Dabei verbleibt die Kulturschale in der Tiefkühltruhe.) Die Fixierungszeit beträgt mindestens 15 Minuten. Dann werden die Deckgläschen entnommen und in die Waschlösung überführt. Mit Objektträgern wird ebenso verfahren, wobei eine Petrischale oder Ähnliches verwendet wird. Methanol bewirkt eine Denaturierung der Proteine. Außerdem werden Lipide aus der Membran herausgelöst.

2.10.2 Formaldehydfixierung

Die Fixierungslösung PEM/FA (siehe Abschnitt 2.2) sollte jeweils frisch gemischt werden. Die Deckgläschen mit den *Elaeocyten* werden in 24-well Kulturschalen gestellt, deren Kammern mit jeweils 2,5 ml der Fixierungslösung gefüllt sind. Die Fixierung dauert eine Stunde bei Zimmertemperatur. Das Formaldehyd sorgt für eine Quervernetzung der Proteine, eventuell auch mit dem Polylysin. Im Anschluß an die Fixierung erfolgt noch eine Behandlung mit PBT (siehe Abschnitt 2.2), um die Membranen zu permeabilisieren. Im nächsten Schritt werden die Deckgläschen für 10 Minuten in eine NH₄Cl-Lösung (50 mM) gestellt, um eventuelle Aldehydreste des Fixierungsmittels zu binden.

2.10.3 Kombinierte Formaldehyd- und Methanolfixierung

Es besteht die Möglichkeit, Zellen zunächst mit PEM/FA zu fixieren und sie anschließend noch mit Methanol zu behandeln. Auch bei den bereits fixierten Zellen werden allerdings die Lipidtropfen herausgelöst.

2.10.4 Paraformaldehydfixierung

Im Gegensatz zum Fixierungsmittel PEM/FA muß die Lösung nicht jedes Mal frisch angesetzt werden. Es empfiehlt sich, das Paraformaldehyd zunächst in destilliertem Wasser zu lösen, dieses dabei zu erwärmen und den pH-Wert einzustellen. Danach wird das Ganze mit konzentriertem Puffer so gemischt, daß die in Abschnitt 2.2 angegebenen Endkonzentrationen erreicht werden. Auch das Paraformaldehyd bewirkt eine Quervernetzung der Proteine. Das schon in der Fixierungslösung enthaltene TWEEN 20 sorgt für eine Permeabilisierung der Membranen, so daß auch Strukturen im Zellinneren optimal fixiert werden. Die Fixierung der auf Deckgläschen befindlichen Zellen wird in 24-well Kulturschalen vorgenommen, und das PFA-Fixierungsmittel (siehe Abschnitt 2.2) sollte ca. 1 Stunde bei Zimmertemperatur einwirken. Nach der Fixierung folgt zweimaliges Waschen in PBT (jeweils 10 Minuten) und eine 10minütige Behandlung mit NH_4Cl -Lösung (50 mM), um Aldehydreste des Fixierungsmittels zu binden.

Die Osmolarität der PFA-Fixierungslösung (PBT mit Paraformaldehyd, siehe Abschnitt 2.2) sollte der des Seewassers angepaßt werden, um ein Platzen der Zellen infolge von osmotischer Wasseraufnahme bzw. ein Schrumpfen der Zellen wegen Wasserentzugs zu vermeiden. Die Osmolarität wurde durch Gefrierpunktserniedrigung festgestellt. Bei dieser Methode wird die beim Gefrieren freiwerdende Wärme gemessen und bildet ein indirektes Maß für die Anzahl der osmotisch aktiven Moleküle.

2.11 Verwendete Antikörper

2.11.1 Primäre Antikörper gegen Vitellin und Vitellogenin (polyklonal):

1. Anti-Vitellin. Das verwendete Antiserum wurde durch Immunisierung eines Kaninchens mit *Nereis virens* Vitellin (gereinigt nach FISCHER und SCHMITZ 1981) erhalten. Das Serum wurde in folgenden Ansätzen und Verdünnungen eingesetzt:
 - 1:50 verdünnt in PBS, Immunisierungsdauer 90 Tage, präadsorbiert mit *Nereis virens*-♂-Totalhomogenat (s. Abschnitt 2.12).
 - Anti-Vitellin wie oben, jedoch in Blockierungslösung (PBS + 0,2% BSA + 0,01% TWEEN 20)
 - Anti-Vitellin wie oben, jedoch 1:5000 verdünnt in PBS

2. Anti-Vitellin aus Kaninchen, Kaninchenserum 1:10 verdünnt in PBS, Immunisierungsdauer 165 Tage, präadsorbiert mit *Nereis virens*-♂-Totalhomogenat. Bei diesem Antikörper war durch die längere Immunisierungsdauer eine stärkere Färbung zu erwarten da dieser weniger verdünnt vorliegt und das Kaninchen länger immunisiert wurde. Dieses Antiserum wurde 1:50 und 1:5000 verdünnt (in PBS) eingesetzt. In weiteren Ansätzen wurden verwendet:
 - Anti-Vitellin wie oben, jedoch über eine Affinitätssäule gereinigt, 1:500 verdünnt in PBS. Das affinitätsgereinigte Anti-Vitellin wurde freundlicherweise von Frau Dr. N. REBSCHER (Institut f. Zoologie, Universität Heidelberg) zur Verfügung gestellt.
 - Anti-Vitellin wie oben, jedoch nicht präadsorbiert, 1:5000 verdünnt in PBS.
 - Anti-Vitellin wie oben, jedoch präadsorbiert mit *Platynereis dumerilii*-♂-Totalhomogenat (1:50 in PBS)

3. Anti-Vitellogenin aus Kaninchen. Dieses Serum wurde bereits 1989 hergestellt (HEIL 1995), erwies sich jedoch bei – 20°C gelagert als unverändert funktionstüchtig. Dieses Serum war ebenfalls präadsorbiert, und wurde in Verdünnungen von 1:50 – 1:500 in PBS eingesetzt.

2.11.2 Primäre Antikörper gegen Coelomzellen

Eine Reihe von primären Antikörpern, die ich in meinen Versuchen an Elaeocyten getestet habe, stammt aus dem Laboratoire d'Endocrinologie des Invertébrés, Biologie Animale de l'Université de Lille, Villeneuve d'Ascq. Sie wurden von Frau Dr. PORCHET gegen Gesamtzell-Fractionen von *Nereis diversicolor* hergestellt. Dazu wurden BALB/c Mäuse mit Gesamtzell-Fractionen von *Nereis diversicolor* immunisiert, und deren Milzzellen mittels Hybridomtechnik (KÖHLER und MILSTEIN 1975; KÖHLER et al. 1976) kultiviert. Als Antikörperlösungen wurden die unverdünnten Zellkulturüberstände verwendet; für die Inkubation von Blotmembranen wurden 1:10-Verdünnungen hergestellt. Da die verwendeten Antikörper gegen *N. diversicolor* entwickelt worden waren, mußte deren Spezifität für die Elaeocyten von *Platynereis dumerilii* erst vergleichend untersucht werden. Folgende Antikörper wurden in meinen Versuchen getestet:

- | | | |
|-------------|------------|------------|
| - CC 1 | - CC 41,1 | - CC 45 |
| - CC 10 | - CC 41,12 | - CC 45,14 |
| - CC 11 | - CC 41,13 | - CC 45-2 |
| - CC 13,612 | - CC 41,14 | - CC 59 |
| - CC 25 | - CC 41,15 | - GT 52 |
| - CC 30 | - CC 41,19 | |
| - CC 41 | - CC 41,20 | |

Die Bezeichnungen wurden von Frau Dr. PORCHET übernommen, wobei CC für „cellules coelomiques“ steht.

2.11.3 Sekundäre Antikörper:

- Goat-Anti-Rabbit, FITC-markiert (SIGMA), 1:80 verdünnt in PBS, fluoreszenzmarkiert
- Goat-Anti-Rabbit-Alexa 488, 1:300 bis 1:400 verdünnt in PBS, fluoreszenzmarkiert (Molecular Probes) (Alexa 488 fluoresziert grün, Absorptionsmaximum bei Wellenlänge 488 nm)
- Goat-Anti-Mouse, FITC-markiert (SIGMA, F-0257), 1:32 verdünnt in PBS
- Goat-Anti-Mouse-Alexa 546 (Molecular Probes), 1:400 verdünnt in PBS, fluoreszenzmarkiert (Alexa 546 fluoresziert rot, Absorptionsmaximum bei Wellenlänge 546 nm)
- Goat-Anti-Rabbit-AP: mit alkalischer Phosphatase gekoppelt, 1:20000 in 1:4 verdünntem Blockpuffer
- Goat-Anti-Mouse-AP: mit alkalischer Phosphatase gekoppelt, 1:20.000 in 1:4 verdünntem Blockingpuffer, (SIGMA A-3562)
- Goat-Anti-Rabbit-Alexa 568 (Molecular Probes), 1:400 verdünnt in PBS, fluoreszenzmarkiert (Alexa 568 fluoresziert rot, Absorptionsmaximum bei Wellenlänge 568 nm, bessere Fluoreszenzstabilität als Alexa 546)

Die unspezifische Bindung der sekundären Antikörper und die damit verbundene unspezifische Fluoreszenz wurde in Kontrollexperimenten ohne primären Antikörper untersucht (siehe z.B. Abschnitt 3.5). Sie erwies sich stets als sehr gering oder überhaupt nicht erkennbar.

2.11.4 Sonstige Antikörper:

- Rhodamin-Phalloidin: Phalloidin (Gift des Fliegenpilzes) bindet an Aktin, z.B. im Muskelgewebe. 1:50 verdünnt in PBS, fluoreszenzmarkiert (Rhodamin fluoresziert rot)

2.12 Präadsorption von Antikörpern

Die Präadsorption dient zur Entfernung unspezifischer Antikörper aus dem Serum und somit zum selektiveren Nachweis markierter Epitope. Hierzu werden zunächst mit einem Perkussionsmörser in flüssigem Stickstoff Gewebsteile bzw. ganze Tiere von *Nereis virens* bzw. *Platynereis dumerili*-Männchen zerkleinert und anschließend mit einem zehnfachen Volumen (w/v) PBS homogenisiert. Das Serum mit dem zu präadsorbierenden Antikörper wird dann mit diesem Totalhomogenat im Verhältnis 1:1 über Nacht bei 4°C auf einem Schüttler inkubiert. Am nächsten Morgen wird die Suspension abzentrifugiert (Sorvall® RC-5B bei 0-10°C und 10 000 Upm, 30 min); der Überstand kann als gereinigter Antikörper weiterverwendet werden.

2.13 Fluoreszenzmikroskopie

Für die Fluoreszenzmikroskopie wird ein Zeiss Axioskop mit einer Zeiss Auflicht-Fluoreszenzlampe verwendet. Für das Betrachten und Fotografieren der DAPI-Fluoreszenz und anderer Emission im blauen Spektralbereich, wird mit UV-Licht angeregt (Filtersatz 1: Anregungsart Ultraviolett H 365, Erregerfilter BP 365/11, Farbteiler FT 395, Sperrfilter LP 397). Um grüne Fluoreszenz sichtbar zu machen (z.B. FITC), wird mit blauem Licht angeregt (Filtersatz 2: Anregungsart Blau 450-490, Erregerfilter BP 450-490, Farbteiler FT 510, Sperrfilter LP 520). Für das Betrachten der roten Fluoreszenz (z.B. bei Verwendung von Alexa 546) ist grünes Anregungslicht erforderlich (Filtersatz 3: Anregungsart Grün H 546, Erregerfilter BP 546/12, Farbteiler FT 580, Sperrfilter LP 590).

2.14 Laserscanmikroskopie

Hierbei wird das Präparat mit dem Licht eines Lasers angeregt. Für Anregung im Blaubereich wird ein Argonlaser verwendet (Detektion von grüner Fluoreszenz). Für die Anregung mit grünem Licht verwendet man einen Kryptonlaser. Damit wird die Detektion von roter Fluoreszenz möglich. Das Objekt wird jeweils in einer bestimmten Ebene punktförmig abgetastet; das dabei erhaltene Rasterbild der fluoreszierenden Strukturen wird digital gespeichert. Der Scanvorgang wird zu Erhöhung der Genauigkeit in ein und derselben Ebene mehrfach wiederholt. Es besteht die Möglichkeit, mehrere Ebenen an derselben Stelle des Objektes digital zu stapeln und so einen räumlichen Eindruck zu gewinnen. Außerdem lassen sich Bilder mit verschiedenfarbiger Fluoreszenz (z. B. bei der Verwendung unterschiedlich fluoreszenzmarkierter Antikörper) an derselben Stelle und in derselben Ebene überlagern und digital zu einem Bild fusionieren.

Bei der Laserscanmikroskopie sollte die Betrachtungszeit nicht zu lang sein, da sonst durch die intensive Bestrahlung Farbstoffe wie Acridinorange zerstört werden und die Vakuolenintegrität bei Elaeocyten verloren geht.

2.15 Anfärben der Zellkerne

Das Chromatin der Zellkerne läßt sich mit sog. DNA-interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffen sichtbar machen. Ein solcher Farbstoff ist Bisbenzimid (Hoechst 33342), der als Stammlösung in der Konzentration 0,5 µg/ml PBS verwendet und mit der Zellsuspension (in Seewasser) 1:1 gemischt wird. Ein anderer Fluoreszenzfarbstoff ist DAPI, der ebenfalls als Stammlösung in der Konzentration 0,5µg/ml PBS vorliegt und mit der Zellsuspension 1:1 gemischt wird. Unter dem Fluoreszenzmikroskop ist schon nach sehr kurzer Zeit (1-2 Minuten) eine kräftige blaue Fluoreszenz zu beobachten. Bei meinen Färbungen brachte die DAPI-Färbung das bessere Ergebnis, deshalb habe ich diese in allen weiteren Versuchen angewendet. Die Färbung ist sowohl für lebende als auch für fixierte Zellen geeignet. Man kann den DAPI-Farbstoff auch dem Einbettungsmedium PBS-DABCO-Glycerin beimischen und so die Zellkerne beim letzten Einbettungsschritt anfärben.

2.16 Färbung mit Neutralrot

Neutralrot wird in einer Endkonzentration von 10 µg/ ml Seewasser angewendet. Es färbt die Vakuole der Elaeocyten nach dem Prinzip der Ionenfalle und funktioniert daher nur bei lebenden, intakten Zellen und nicht auf fixiertem Material. Die Vakuole erscheint schon nach wenigen Minuten kräftig orangerot. Die Neutralrotfärbung kann auch mit einer DAPI-Färbung kombiniert werden.

2.17 Färbung mit Acridinorange und MDY-64

Die Stammlösung des Zellmembranmarkers MDY-64 (Molecular Probes Y-7531) wird 1:5000 verdünnt angewendet. Es werden Membrankompartimente mit grüner Fluoreszenz markiert, wobei der Fluoreszenzfilter (Anregungsart Blau 450-490, Erregerfilter BP 450-490, Farbteiler FT 510, Sperrfilter LP 520) das Maximum etwas beschneidet. MDY-64 wurde für Vitalfärbungen eingesetzt.

Acridinorange wird in der Konzentration 10 mg/ml in Dimethylsulfoxid gelöst. Diese Stammlösung wird dann im Verhältnis 1:100 mit Seewasser bzw. Elaeocytensuspension verdünnt. Mit Acridinorange können Vakuolen, Lysosomen und Zellkerne von lebenden Zellen angefärbt werden. Es entsteht eine Fluoreszenz, deren Farbe vom pH-Wert abhängig ist, im neutralen Bereich erscheint sie grünlich, im sauren Bereich orange bis rot. Der Zellkern fluoresziert gelbgrün, Lipidtropfen werden nicht gefärbt. Zum Betrachten der Fluoreszenz verwendet man am besten blaues Anregungslicht (z.B. Anregungsart Blau 450-490, Erregerfilter BP 450-490, Farbteiler FT 510, Sperrfilter LP 520).

Für die Vital-Fluoreszenzfärbung werden Würmer betäubt und Coelomzellen wie unter 2.8 beschrieben gewonnen. Nun gibt man pro Deckglas 10 µl Acridinorange (Stammlösung 1:100 verdünnt mit Seewasser) und 10 µl MDY-64 (Stammlösung 1:5000 verdünnt mit Seewasser) auf die Zellen und läßt die Substanzen etwa 2 Minuten einwirken. Danach werden die Deckgläschen vorsichtig in Seewasser gewaschen und sofort mit Deckglassplittern als Abstandhalter und Seewasser als Flüssigkeit unter dem Mikroskop betrachtet. Da es sich um lebende Zellen handelt, dürfen sie auf keinen Fall austrocknen, und die Haltbarkeit ist sehr begrenzt.

2.18 Kryostatschnitte

2.18.1 Einfrieren von fixierten oder unfixierten Tieren

Von einem Weinkorken werden mit einem scharfen Messer etwa 0,5 cm dicke Scheiben abgeschnitten. Auf diese wird anschließend zunächst mit Hilfe von Einbettmedium (Saccharoselösung) ein Filterpapier „geklebt“, das am Rand Informationen zum Präparat aufweist. Danach wird darauf das Präparat in Einbettmedium mit Hilfe von aufgetauter gekochter Rinderleber unter optischer Kontrolle positioniert und anschließend in schmelzendem Isopentan kryofixiert (siehe unten).

In einem Styroporbehälter mit Flüssigstickstoff (LN) werden ca. 20 ml Isopentan in ein Becherglas gefroren. Nach Präparation und Einbetten eines Kryostatpräparates auf der Korkscheibe wird das gefrorene Isopentan mit einem Eisenstab mit Zimmertemperatur zum Schmelzen gebracht und das Kryostatpräparat für ca. 30 Sekunden in das schmelzende Isopentan (-165°C) getaucht.

Eingefrorene Präparate können in 50 ml Falcon-Gefäßen bei -80°C für mehrere Wochen und Monate aufbewahrt werden.

2.18.2 Kryostatschnitte

Das Objekt wird bei einer Temperatur von -18 bis -20°C mit einem ebenso kalten Messer geschnitten. Die Schnitte von 8 oder 10 µm Dicke werden auf bei Raumtemperatur aufbewahrte mit Poly-L-Lysin beschichtete Deckgläschen aufgenommen. Zur Kontrolle, ob die

Schnitte die gewünschten Strukturen enthalten, kann eine Schnellfärbung der Probeschnitte mit Methyleneblau durchgeführt werden. Die Schnitte für die Immunohistochemie werden mit einem Fettstift (PAP-Pen) umrandet, damit aufgetragene Flüssigkeit nicht herunterfließen kann. Dabei wird eine wenige mm breite Öffnung des Fettkreises gelassen, durch die man die Flüssigkeiten nach der Inkubation ablaufen lassen kann. Die Schnitte dürfen nicht eintrocknen und werden deshalb sofort in eine feuchte Kammer (kleine Kunststoff-Petrischale mit angefeuchtetem Filterpapier im Deckel) gelegt.

2.18.3 Fixierung von Kryostatschnitten

Die auf Poly-L-Lysin-beschichtete Deckgläschen aufgenommenen Schnitte werden in kleine Petrischalen mit wassergetränktem Filterpapier im Deckel zum Herstellen einer feuchten Atmosphäre gelegt. Wenn das Tier vor dem Einfrieren noch nicht fixiert wurde, muß die Fixierung an den Schnitten erfolgen. Dazu werden diese mit Fixierungslösung überschichtet, die in verschiedenen Konzentrationen angewendet werden kann und unterschiedlich lange Einwirkdauer benötigt. Bei meinen Schnitten wurden drei verschiedene Fixierungslösungen (Fix) mit jeweils drei unterschiedlichen Einwirkzeiten ausprobiert:

Fix 1: 2,7 mM KCl
 8,0 mM Na₂HPO₄*2H₂O
 1,5 mM KH₂PO₄
 0,5 M NaCl
 4 % Paraformaldehyd
 0,04 % TWEEN 20

Fix 2: 2,7 mM KCl
 8,0 mM Na₂HPO₄*2H₂O
 1,5 mM KH₂PO₄
 137,0 mM NaCl
 4 % Paraformaldehyd
 0,04 % TWEEN 20

Fix 3: 2,7 mM KCl
 8,0 mM Na₂HPO₄*2H₂O
 1,5 mM KH₂PO₄
 137,0 mM NaCl
 2 % Paraformaldehyd
 0,04 % TWEEN 20

	Fix 1	Fix 2	Fix 3	unfixiert
2 Minuten	0 von 1	0 von 1	0 von 2	1 von 2
10 Minuten	1 von 1	2 von 2	0 von 1	
20 Minuten	2 von 2	1 von 1	1 von 1	

Tabelle 1: Die Tabelle gibt die Anzahl der Deckgläschen an, auf denen sich mindestens ein brauchbarer Schnitt befand, abhängig von der Fixierungslösung, der Einwirkungszeit und der Anzahl der auf diese Weise behandelten Deckgläschen. Es wird deutlich, daß 2 Minuten Inkubationszeit nicht ausreichen. Bei 4 % Paraformaldehyd-gehalt sind 10 Minuten ausreichend, bei 2 % Paraformaldehyd-gehalt muß die Inkubation hingegen länger erfolgen. Interessanterweise ist auch ein unfixierter Schnitt relativ gut erhalten, was bei den unfixierten Präparaten aber nicht die Regel ist.

Insgesamt ließ die Qualität der Schnitte jedoch noch zu wünschen übrig, insbesondere was die Erhaltung der Elaeocyten angeht. Wie sich später herausstellte, ist es ratsam, die Polychaeten in einer Länge von 10-20 Segmenten zu fixieren und danach erst einzufrieren. Bei den Schnitten entfällt dann der Fixierungsschritt. Um die Würmer im gestreckten Zustand zu fixieren,

werden die betäubten und dadurch erschlafften Tiere am Vorder- und Hinterende mit Insektennadeln auf einer Silikonmatte festgesteckt, und die Fixierungslösung (PBT mit 0,5 M NaCl und 4 % PFA) wird vorsichtig daraufgeträufelt, bis das Tier vollständig unter der Flüssigkeitsoberfläche liegt. Die Fixierungszeit beträgt 1-2 Stunden bei Raumtemperatur. Die fixierten Tiere können problemlos für die Einbettung in kleinere Stücke zerteilt werden, indem man sie mit zwei gekreuzten Rasierklingen auf einer Wachsplatte schneidet. Die fixierten Würmer dürfen nicht austrocknen. Sie werden mehrfach in PBS gewaschen, 5-6 mal je 10 Minuten lang. Danach werden die Objekte in eine 10 %ige Saccharoselösung überführt, in der sie verbleiben, bis sie absinken, also mindestens 30 bis 60 Minuten, je nach Größe des Objekts. Ebenso wird mit einer 20 %igen Saccharoselösung verfahren. Schließlich wird die Probe über Nacht in eine 30 %ige Saccharoselösung eingelegt. Die Saccharose wird jeweils in PBS gelöst. Am darauffolgenden Tag können die Objekte dann eingefroren werden.

2.18.4 Immunohistochemie bei Kryostatschnitten

Die fixierten Schnitte werden dreimal je 15 Minuten mit PBS gewaschen. Dies geschieht, indem die Fixierungslösung über eine Lücke des Fettstiftrings, der die Schnitte umgibt, abgelassen wird und letzte Reste vorsichtig mit Filterpapier abgesaugt werden. Anschließend wird mit der Waschflüssigkeit überschichtet. Das Entfernen einer Flüssigkeit und Auftragen der nächsten erfolgt immer auf diese Weise. Die drei Waschschrte mit PBS entfallen bei Schnitten von bereits fixierten Tieren.

Als nächstes erfolgt eine 5minütige Inkubation in 0,01 % TWEEN 20. Für jedes Deckglaschen werden zum Überschichten der Schnitte etwa 50 µl Flüssigkeit benötigt. Als nächster Schritt folgt eine 5minütige Behandlung mit NH₄Cl in PBS, daran anschließend ein 5minütiges Waschen in PBS. Im Anschluß läßt man die „blocking solution“ (siehe Abschnitt 2.2) für 30 Minuten einwirken. Danach kann der primäre Antikörper eingesetzt werden. Die Inkubation erfolgt über Nacht bei +4°C (im Kühlschrank).

Am nächsten Tag wird dreimal 10 Minuten lang mit PBS gewaschen, dann der sekundäre Antikörper daraufgegeben. Dieser sollte, da es sich um einen fluoreszenzmarkierten Antikörper handelt, im Dunkeln einwirken. Entsprechend sind alle folgenden Schritte auch im Dunkeln auszuführen. Die Inkubationszeit beträgt 60 bis 120 Minuten bei Zimmertemperatur. Nach dieser Zeit wird erneut dreimal 10 Minuten mit PBS gewaschen. Die Lösung wird mit Hilfe von Filterpapier möglichst gründlich entfernt (ohne die Schnitte zu berühren), dann wird kurz mit bidestilliertem Wasser gewaschen, welches wiederum vorsichtig mit Filterpapier entfernt wird. Im Anschluß daran werden die Präparate luftblasenfrei in Mowiol (mit DAPI-Zusatz) eingedeckt. Sie können dann relativ lange im Kühlschrank im Dunkeln aufbewahrt werden. Als alternatives Eindeckmittel kann auch DABCO/DAPI verwendet werden, die Aufbewahrung erfolgt dann bei -20°C im Dunkeln. In diesem Fall entfällt der Waschschrte mit bidestilliertem Wasser vor dem Eindecken.

Bei meinen Schnitten verwendete ich folgende primären Antikörper:

- Anti-Vitellin, 165 Tage immunisiert, aus Kaninchen (Rabbit), Verdünnung 1:50
- CC 41,14
- CC 59
- GT 52

Sekundäre Antikörper:

- Goat-Anti-Rabbit-FITC, Verdünnung 1:80 in PBS
- Goat-Anti-Rabbit-Alexa 488, Verdünnung 1:400
- Goat-Anti-Mouse-FITC, Verdünnung 1:32 in PBS

teilweise gleichzeitig mit dem sekundären Antikörper wurden aufgetragen:

- Rhodamin-Phalloidin, Verdünnung 1:50

2.19 Methacrylatschnitte

2.19.1 BOUIN-Fixierung

Der Wurm wird in betäubtem, gestrecktem Zustand mit zwei Insektennadeln auf einer Silikonmatte in einer Petrischale festgesteckt, wobei eine Nadel im Kopf (soweit vorhanden) und die andere ungefähr in der Mitte des Tieres steckt, da das Hinterende nicht mit eingebettet und somit verworfen werden soll. Das BOUIN'sche Gemisch wird dann auf das Objekt getropft, so daß sich dieses schließlich vollkommen unter der Flüssigkeitsoberfläche befindet. Nach mindestens einer Stunde Fixierungszeit (abhängig von der Größe des Objektes) können Kopf und Hinterende (hinter dem 20. parapodientragenden Segment) mit Hilfe von zwei gekreuzten Rasierklingen abgeschnitten werden. Das Objekt wird dann bis zur Einbettung in einem Schnappdeckelgläschen in BOUIN'schem Gemisch (unter dem Abzug) aufbewahrt, was problemlos über mehrere Wochen möglich ist.

2.19.2 Styrol-Methacrylat-Einbettung und Kunstharzdünnschnitte

1. Vorbereitung des Esters

Das n-Butyl-Methacrylat ist mit 10 ppm Hydrochinonmonomethylether stabilisiert und muß zur Einbettung entstabilisiert werden. Dazu wird ein Scheidetrichter mit gleichen Teilen Ester und 2% NaOH gefüllt und geschüttelt. Der Stabilisator löst sich in der NaOH und bildet die untere Phase. Nach der Trennung der Phasen wird die untere abgelassen. Diese Prozedur wird fünfmal wiederholt. Anschließend wird zur Entfernung der NaOH 10 mal mit Aqua bidest. (gleiches Volumen oder mehr) ausgeschüttelt und die Lauge abgelassen. Der so entstabilisierte Ester wird durch Zugabe von grobkörnigem CaCl_2 in einem Erlenmeyerkolben getrocknet und nach einigen Minuten filtriert. Die Lösung sollte ganz klar sein und ist dann mehrere Wochen im Kühlschrank haltbar.

2. Ansatz zur Einbettung

Zunächst werden die Trichter und Flaschen für die Einbettung im Trockenschrank getrocknet, verschlossen und auf Zimmertemperatur abgekühlt. Dann nimmt man den entstabilisierten Ester und das Styrol aus dem Kühlschrank und läßt es auf Zimmertemperatur erwärmen, damit sich beim Öffnen kein Kondenswasser bildet. Es wird ein Gemisch von entstabilisiertem Ester und Styrol im Verhältnis 1:1 hergestellt. Als Initiator gibt man exakt 4 Gewichtsprozent wasserhaltiges Benzoylperoxid (im trockenen Zustand explosiv) hinzu. Durch das Wasser im Benzoylperoxid wird die Lösung trübe. Man trocknet wieder mit CaCl_2 , filtriert und erhält eine klare Endmischung, die ca. 2 Tage im Kühlschrank haltbar ist.

3. Entwässerung der Objekte

Die in meinem Fall in wäßrigem BOUIN fixierten und auch darin aufbewahrten Tiere werden zunächst in 70% Ethanol überführt, welches mehrfach gewechselt wird, bis keine gelbe Färbung durch BOUIN-Lösung mehr zu sehen ist. Die Objekte können problemlos auch mehrere Tage in 70 % Ethanol eingelegt werden. Vor der Einbettung in Agar in kleinen Kunststoffgefäßen (z.B. Eppendorfgefäße) werden die Tiere kurz in 50 % Ethanol überführt und anschließend abgetupft. Im warmen Agar erfolgt dann die Orientierung je nach Schnittebene (längs oder quer). Der erkaltete Agar wird mitsamt Objekt aus dem Einbettgefäß entnommen, zurechtgeschnitten und in 70 % Ethanol eingelegt. Danach werden die Objekte über Nacht in 80% Ethanol aufbewahrt und am nächsten Tag auf dem Schüttler weiter entwässert. Sie kommen ca. 30 Minuten lang in 90% Ethanol, dann etwa 30 Minuten in 96% Ethanol. Danach kann man sie zweimal für mindestens 30 Minuten, vor allem im zweiten Schritt jedoch besser länger (50-70 Minuten), in 100% Ethanol einlegen. Schließlich werden sie dann noch mit 100% Ethanol zweimal über mindestens 30 Minuten (vor allem beim zweiten Mal besser 45

bis 90 Minuten) vollständig entwässert. Die Zeit, die die Objekte in den unterschiedlichen Ethanolkonzentrationen verweilen müssen, hängt hauptsächlich von der Größe der Objekte ab.

4. Einbettung

Die in 100% Ethanol (unvergällt) gebrachten Objekte werden in ein Gemisch aus Ethanol und Endmischung ca. 1:1 überführt, in dem sie ca. 45 Minuten verbleiben. Danach wird dieses durch ein Gemisch aus Ethanol und Endmischung im Verhältnis 1:2 ersetzt, welches auch ca. 45 Minuten einwirken sollte. Anschließend kann das Objekt in die reine Endmischung gebracht werden, wo man es einmal 1-2 Stunden beläßt, dann einmal über Nacht bei Raumtemperatur und am nächsten Tag noch einmal für 1-3 Stunden in frischer Endmischung. Die Endmischung sollte unbedingt mindestens zweimal gewechselt werden. Danach werden die Objekte mit Endmischung in trockene Gefäße eingegossen und sofort gut verschlossen. Als Gefäß bieten sich z.B. Eppendorfgefäße oder Gelatinekapseln an. Vor Gebrauch trocknet man die Einbettgefäße im Ofen, verschließt sie und läßt sie auf Zimmertemperatur abkühlen.

5. Polymerisation

Nach 1-2 Stunden bei Zimmertemperatur polymerisiert man im Trockenschrank, zuerst ca. 24 Stunden lang bei 50°C (Wärmeschrank) und dann bei 60°C für ca. 23 Stunden.

6. Weiterverarbeitung

Die Gelatinekapseln werden von den harten Kunststoffblöcken mit warmem Wasser entfernt. Der Kunststoff von Eppendorfgefäßen und Ähnlichem kann mechanisch entfernt werden. Das Material kann nun mit dem Mikrotom geschnitten werden. Ich fertigte Schnitte von 5 µm Dicke an (Schneidemodus 3). Die Schnitte werden auf mit Ethanol gereinigte und mit einem Diamantstift beschriftete Objektträger (bei kleinen Objekten auf Eiweißglycerin-beschichtete Objektträger) mit Aqua bidest. gelegt. Auf dem Wärmetisch bei 60°C strecken sie sich mit genügend Aqua bidest. vollständig. Man läßt die Objektträger auf dem Wärmetisch liegen, bis das Wasser vollständig verdunstet ist.

Chemikalien:

- Benzoylperoxid: Dibenzoylperoxid, C₁₄H₁₀O₄ mit 25% Wasser, MERCK 801641
- Butylmethacrylat: stabilisiert mit 10 ppm Hydrochinonmonomethylether, C₈H₁₄O₂, Sigma 23,586-5
- Styrol: Vinylbenzol. Zur Synthese, stabilisiert mit 20 ppm 4-tert-Butylbrenzcatechin, C₈H₈, MERCK 807679

2.19.3 Azanfärbung nach HEIDENHAIN

1. Schnitte entmethacrylatisieren und in Wasser bringen:

- Objektträger 3x für je 10-15 Minuten in 100 % Xylol einlegen, anschließend abtropfen lassen und zweimal (10 bzw. 5 min) in 100 % Ethanol einlegen.
- Objektträger für jeweils 5 Minuten in Ethanol der Konzentrationen 90%, 70 % und 50 % überführen, im Anschluß daran 1x in Wasser, jedoch nicht zu lange (maximal 30Minuten), da die Schnitte sonst quellen.

2. Einstellen in die vorgewärmte Azokarminlösung (siehe unten), im Wärmeschrank bei 56°C, 10-30 Minuten.

3. Kurzes Abspülen der Schnitte in Aqua dest.

4. Differenzieren in Anilin-Alkohol (1 ml Anilinöl auf 1000 ml 96 %igen Alkohol), bis die Zellkerne hervortreten, 15-30 Sekunden.

Der Vorgang läßt sich beschleunigen, wenn dem Anilin-Alkohol etwas Aqua dest. zugesetzt wird.

5. Auswaschen des Anilins in Essigsäure-Alkohol (1 ml Eisessig auf 100 ml 96 %igen Alkohol), 30-60 Sekunden.
Durch diesen Schritt wird das Differenzieren unterbrochen. Sollte das Gewebe noch zu stark rot gefärbt sein, kommt das Präparat wieder zurück in Anilin-Alkohol.
6. 2 Stunden beizen in 5 %iger wäßriger Phosphorwolframsäure.
Das Bindegewebe wird dabei noch weiter entfärbt.
7. Kurzes Abspülen in Aqua dest.
8. 2 Stunden oder länger (über Nacht) in Anilinblau-Orange G-Essigsäure (siehe unten) färben.
9. Kurz in Aqua dest. abwaschen, differenzieren in 96 %igem Alkohol (kurz); dann 3x 10 Minuten in 100 % Ethanol und 4x 15 Minuten in 100 % Xylol einlegen, danach einschließen in Balsam (Eukitt).
Man kann auch aus der Färbelösung sofort in 96 %igen Alkohol eintauchen, um ein zu rasches Ausziehen der Farbstoffe zu vermeiden. Langsamere Differenzierung erreicht man auch durch Verwendung von Isopropylalkohol anstelle von Ethanol.

Die Cuticula ist blau gefärbt, Kerne rot (seltener blau), Muskelgewebe je nach Fixierung rötlich bis orange, saure Mukosubstanzen blau.

Herstellen der Färbelösungen (aus: ROMEIS, Mikroskopische Technik):

- A. Azokarmin-Färbelösung: 0,1 g Azokarmin G in 100 ml Aqua dest. aufschwemmen, kurz aufkochen und nach Abkühlen auf Zimmertemperatur filtrieren. Zuletzt wird der Lösung 1 % Eisessig zugesetzt.
- B. Anilinblau-Orange G-Färbelösung: 0,5 g Anilinblau wasserlöslich und 2 g Orange G in 100 ml Aqua dest. lösen, 8 ml Eisessig zusetzen, aufkochen und nach dem Erkalten filtrieren. Zur Färbung verdünnt man diese Stammlösung 1:1 bis 1:3 mit Aqua dest.

Die Schnitte dürfen an keiner Stelle trockenfallen!

2.19.4 Doppelfärbung mit Hämalaun-Eosin

Die Färbung zeigt Zellkerne und sauren Schleim blau, alles Übrige in verschiedenen Tonabstufungen rot. Die Vorgehensweise ist folgende:

1. Schnitte entparaffinieren bzw. entmethacrylatisieren und in Aqua dest. bringen.
2. In Hämalaun zur Kernfärbung einstellen, 3-8 Minuten.
3. Spülen in Aqua dest. oder in 0,1 %iger HCl.
4. Bläuen in fließendem Leitungswasser, 10 Minuten.
5. Färben in Eosin, 0,2 % in Aqua dest., 15 Minuten.
Es soll mäßig überfärbt werden.
6. Auswaschen in Wasser, 1-5 Minuten.
7. Differenzieren in 80 %igem Ethanol.
8. 2x 2 Minuten in 96-100 %igen Alkohol.
9. 3-5 Minuten in 100 % Xylol.
10. Eindecken.

2.20 Paraffinschnitte

2.20.1 Fixierung von Totalpräparaten für Paraffineinbettung

Die Objekte für die Paraffineinbettung werden mit 4% Paraformaldehyd in PBS fixiert. Zunächst wird 5% Paraformaldehyd unter Erwärmen in Aqua dest. gelöst und der pH-Wert von 7,4 mit NaOH eingestellt. Dann wird die Lösung mit 5x PBS im Verhältnis 4:1 gemischt.

Die Würmer werden betäubt und mit jeweils zwei Insektennadeln auf einer Silikonmatte in einer Petrischale im gestreckten Zustand festgesteckt. Die frisch angesetzte Fixierungslösung wird dann daraufgeträufelt, bis sich das gesamte Tier unter der Oberfläche befindet. Die Fixierung dauert etwa zwei Stunden bei Raumtemperatur. Dann werden die Würmer mit zwei gekreuzten Rasierklingen auf die gewünschte Länge geschnitten und in PBS gewaschen. Sie können bis zur Einbettung in PBS im Kühlschrank aufbewahrt werden.

2.20.2 Paraffineinbettung

Die Paraffineinbettung hat im Vergleich zur Saccharoseeinbettung für Kryostatschnitte den Vorteil der besseren Strukturerhaltung. Gegenüber der Styrol-Methacrylateinbettung liegt der Vorteil darin, daß die Objekte nicht ganz so hohen Temperaturen ausgesetzt werden und damit eine immunohistochemische Behandlung der Schnitte noch eher möglich ist.

Paraffine sind Mischungen aus gesättigten Kohlenwasserstoffen, deren Schmelzpunkt mit zunehmender Kettenlänge steigt. Für histologische Routinearbeiten verwendet man Paraffin mit einem Schmelzpunkt von 56-58°C. Käuflich zu erwerbende Produkte enthalten heute verschiedene plastische Polymere, die die Schneidbarkeit verbessern und die Infiltrationsgeschwindigkeit steigern, z.B. Paraplast (Firma Shandon), Histoplast (Firma Serva), Histosec (Firma Merck) usw.

Die fixierten Tiere werden zunächst entwässert, wobei die Verweildauer in den verschiedenen Ethanolkonzentrationen je nach Größe der Objekte variiert. Bei meinen *Platynereis*-Stücken wurden folgende Zeiten gewählt:

50% Ethanol: 20 Minuten

70% Ethanol: 20 Minuten

80% Ethanol: 20 Minuten

90% Ethanol: 20 Minuten

96% Ethanol: 20 Minuten

100% Ethanol (vergällt): 40 Minuten

100% Ethanol (vergällt): 40 Minuten

100% Ethanol (vergällt): 40 Minuten

100% Ethanol (unvergällt): 40 Minuten

100% Ethanol (unvergällt): 40 Minuten

Nach der Entwässerung der Präparate muß der Alkohol entfernt werden. Dazu werden Flüssigkeiten verwendet, die sowohl mit Alkohol, als auch mit Paraffin/ Paraplast mischbar sind (Intermedien). Hierzu zählen: Chloroform, Benzol, Xylol, Isopropanol, Isobutylalkohol (Butanol) usw. Bei meinen Objekten wurde folgendermaßen vorgegangen:

2-Butanol: 10 Minuten

2-Butanol: 10 Minuten

2-Butanol: 10 Minuten im Wärmeschrank bei ca. 60°C

2-Butanol / Paraplast (1:1): 1 Stunde im Wärmeschrank bei ca. 60°C

Paraplast: über Nacht im Wärmeschrank bei ca. 60°C

Paraplast: 2 Stunden im Wärmeschrank bei ca. 60°C

Paraplast: 1 Stunde im Wärmeschrank bei ca. 60°C

Danach kann die Einbettung vorgenommen werden. Die Proben werden in spezielle Förmchen mit Paraplast übertragen und orientiert. Die Abkühlung des Paraplastes soll in Eiswasser erfolgen, damit das Gefüge des erstarrten Paraplastes homogen feinkristallin wird. Der erstarrte Paraffinkörper wird im Kühlschrank aufbewahrt.

2.20.3 Paraffinschnitte

Der Paraffinkörper mit dem Präparat wird auf einen Holzblock aufgeschmolzen und eingespannt. Mit dem Mikrotom werden Schnitte von 6 µm Dicke angefertigt. Dabei muß der Paraffinkörper unter Umständen mit Eis gekühlt werden. Die Schnitte läßt man auf der Oberfläche von Aqua bidest. bei 46°C flottieren, damit sie sich strecken. Danach werden sie mit Aqua bidest. auf gereinigten, mit Eiweißglycerin beschichteten Objektträgern ausgerichtet. Man läßt sie dann auf einer Wärmeplatte bei 46 °C antrocknen.

Zum Färben müssen die Schnitte zuerst entparaffiniert werden. Dies geschieht durch Einstellen der Küvette mit den Objektträgern in folgende Flüssigkeiten:

100% Xylol: 10-15 Minuten

100% Xylol: 10-15 Minuten

100% Ethanol: 5-10 Minuten

100% Ethanol: 5-10 Minuten

90% Ethanol: 5-10 Minuten

70% Ethanol: 5-10 Minuten

50% Ethanol: 5-10 Minuten

Aqua dest.: 1-3 Minuten

Daran anschließend findet die Färbung statt.

Die Azanfärbung nach HEIDENHAIN wird ebenso durchgeführt wie bei den Methacrylatschnitten. Der Färbevorgang selbst sollte jedoch verkürzt werden, da die Schnitte dicker sind und sich kräftiger anfärben. In der Azokarminlösung reichen 5-10 Minuten aus, die Färbung in Anilinblau und Orange G sollte nur 2 Stunden dauern. Je nachdem, wie stark überfärbt wurde, kann sich die nötige Differenzierungszeit deutlich verlängern.

2.20.4 Immunohistochemie bei Paraffinschnitten

Die Schnitte werden wie für die Azanfärbung entparaffiniert. Danach werden sie in Küvetten mit folgendem Inhalt gestellt:

1x 10 Minuten PBT

1x 10 Minuten NH₄Cl-Lösung

1x 10 Minuten PBS

Daran anschließend werden die Objektträger mit Blockierungslösung überschichtet und für mindestens 30 Minuten auf Plastikstegen in einer feuchten Kammer inkubiert. Im nächsten Schritt wird anstelle der Blockierungslösung der primäre Antikörper aufgetragen. Die Inkubation erfolgt ebenfalls auf Plastikstegen in einer feuchten Kammer, entweder für 2 Stunden bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C. Danach wird 2x 10 Minuten mit PBS in einer Küvette gewaschen und die Inkubation mit dem sekundären Antikörper durchgeführt, abermals in der feuchten Kammer für 2 Stunden bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C, in jedem Fall im Dunkeln. Die abschließenden Waschschrte erfolgen ebenfalls im Dunkeln: 2x 10 Minuten PBS. Dann können die Schnitte in PBS-DABCO-Glycerin mit DAPI-Zusatz eingedeckt werden.

PBT: PBS + 0,01 % TWEEN 20

NH₄Cl-Lösung: PBS + 50 mM NH₄Cl

Blockierungslösung: PBS + 1% Magermilchpulver

2.21 Herstellen von *Elaeocytenhomogenat* für die Gelelektrophorese

Von *Platynereis dumerilii* werden 5-6 Tiere gleichen Geschlechts und ähnlichen Reifezustands verwendet, von *Nereis diversicolor* genügen 3-4 relativ große Tiere. Die Würmer werden betäubt, die *Elaeocyten* wie für die Anheftung an Deckgläschen entnommen und weiterbehandelt, jedoch werden die Zellsuspensionen der 3-6 Tiere nach dem Sieben durch das 50 µm Nylonnetz vereinigt. Die Zellsuspension kann eingefroren oder direkt weiterverwendet werden. Die Zellen werden durch Zentrifugation (Biofuge A, 12.000 Umdrehungen pro Minute, 4 Minuten lang) sedimentiert, das Pellet wird in 100 µl Seewasser aufgenommen und danach durch Ultraschallbehandlung (einige Sekunden lang) homogenisiert. Das Homogenat wird ohne weitere Behandlung verwendet. Sollten sich immer noch Flocken in der Suspension befinden, so gibt man 4% SDS (gleiche Konzentration wie im Probenpuffer) dazu und erwärmt für 5 Minuten auf 95°C. Anschließend wird noch einmal 2 Minuten lang zentrifugiert (Biofuge A, 12.000 Umdrehungen pro Minute), und der Überstand wird weiterverwendet. Vom Überstand wird eine Proteinbestimmung (BCA-Test; s. 2.22) durchgeführt.

Vor dem Auftragen auf das Gel wird das Homogenat im Verhältnis 1:1 mit SDS-PAGE-Probenpuffer (LÄMMLI 1970) gemischt und für 5 Minuten auf 95°C erhitzt. SDS ist ein Detergens mit Sulfatgruppen, das die Proteine umgibt und negativ geladen ist. Je größer das Protein, desto mehr SDS-Moleküle lagern sich an. Auf diese Weise ist die Ladung der Proteine stets proportional zu ihrer Größe. β -Mercaptoethanol spaltet die Disulfidbrücken innerhalb der Moleküle und zerstört damit die Tertiärstruktur der Proteine. Die weitere Denaturierung erfolgt durch das Erhitzen auf 95°C. Da die räumliche Struktur der Proteine nach dieser Prozedur zerstört ist und die Ladung sich proportional zur Größe der Moleküle verhält, erfolgt die Auftrennung während der Elektrophorese ausschließlich aufgrund der Molekülgröße.

2.22 Proteinbestimmung mit *Bicinchonsäure* (BCA assay)

Nach KAUSHAL und BARNES (1986)

Reaktionsprinzip: Proteine reduzieren Cu^{2+} zu Cu^{1+} mit Hilfe von OH^- . Das Cu^{1+} reagiert dann mit zwei Molekülen BCA zu einem farbigen BCA- Cu^{1+} -Komplex.

Die Proteinbestimmung wird in Mikrotiterplatten mit einem Photometer (Dynatech MR5000) durchgeführt. Jede Probe bzw. jede Konzentration des Protein-Standards wird dreifach zur Bestimmung angesetzt. In jede Kammer der Mikrotiterplatte werden 10 µl Probe (1-10 µg Protein) bzw. 0, 2, 4, 6, 8 und 10 µl des Protein-Standards (mit Aqua dest. auf 10 µl aufgefüllt) sowie 200 µl Gebrauchsreagenz (s. 2.1) gegeben. Die Platte wird dann mit Folie abgedeckt, eine Stunde bei 50-60°C inkubiert und bei 550 nm (oder 562 nm) gemessen. Aus den Werten des Protein-Standards kann eine Eichkurve erstellt und danach der Proteingehalt der Probe berechnet werden.

2.23 Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

Es wurden Polyacrylamid-Minigel verwendet, bestehend aus einem 10%igen Trenngel und einem 6%igen Sammelgel.

	10% Trenngel	6% Sammelgel
30% Acrylamid	1333 µl	400 µl
2% Bisacrylamid	533 µl	160 µl
4x Trenngelpuffer	1000 µl	/
4x Sammelgelpuffer	/	500 µl
Aqua dest.	1111 µl	928,5 µl
TEMED	3 µl	1,5 µl
APS 10%	20 µl	10 µl
Menge für 1 Gel	4 ml	2 ml

Tabelle 2: Pipettierschema. Acrylamid : Bisacrylamid = 37,5:1; Auftragemenge Proteinprobe (1:1 Gemisch mit reduzierendem SDS-Probenpuffer): 10-15 µl pro Slot für ein 0,75 mm-Gel; Auftragemenge Markerproteingemisch: 4 µl pro Slot für ein 0,75 mm-Gel.

Die PAGE wird in einer MiniProtean[®]3 Elektrophoresekammer (Bio Rad) durchgeführt. Die Lösungen für Trenn- und Sammelgel werden gemäß Rezept in Szintillationsgefäße pipettiert und anschließend zwischen die Glasplatten gebracht. Dabei wird zunächst das Trenngel gegossen und mit 1 ml 60% (v/v) Isopropanol überschichtet. Man läßt das Gel bei Raumtemperatur auspolymerisieren und entfernt anschließend das Isopropanol. Dann wird das Sammelgel auf das Trenngel gegossen und der Kamm eingesteckt. Wenn das Sammelgel wiederum bei Raumtemperatur polymerisiert ist, wird die Elektrophoresekammer zusammengesetzt und das Gel mit den vorbereiteten Proteinproben (in Probenpuffer) beschickt (zum Beispiel 10 µl pro Slot mit einem Proteingehalt von 0,5 µg/µl). Die Elektrophorese wird bei einer angelegten Spannung von 200 V durchgeführt, die Laufzeit beträgt etwa 45 Minuten.

verwendetes Markerproteingemisch:

SDS-6H, SIGMA mit folgenden Markerproteinen:

205 kDa Myosin
 116 kDa β-Galactosidase
 97 kDa Phosphorylase B
 66 kDa BSA
 45 kDa Ovalbumin
 29 kDa Decarboanhydrase

2.24 Western-Blot von SDS-Gelen

Färbereagenzien (dunkel halten):

- Nitroblau-tetrazoliumchlorid (NBT); 3% Stammlösung in 75% Dimethylformamid
- 5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat (BCIP), p-toluidin-Salz; 2% Stammlösung in 100% Dimethylformamid

Vorgehen:

SDS-Gel in Puffer 3 (s. 2.2) legen und die Blotapparatur vorbereiten:

negativer Pol (-) Oberseite

6 x Filterpapier (Whatmann) in Puffer 3

Gel in Puffer 3

Nitrozellulose-Membran in Puffer 1

2 x Filterpapier in Puffer 1 (s. 2.2)

4 x Filterpapier in Puffer 2 (s. 2.2)

positiver Pol (+) Unterseite

Die Stromstärke wird auf 40 mA/Gel eingestellt. Die Blotzeit beträgt 1,5-2 h. Bei schweren Proteinen (MW > 200 000) kann die Blotzeit erhöht werden, da größere Proteine langsamer aus dem Gel wandern. Nach dem Blotten können die Blotmembranen getrocknet oder aber direkt weiterverwendet werden.

Weiterbehandlung des Blots:

Für Färbungen mit alkal. Phosphatase-gekoppeltem sek. Antikörper (Goat α -rabbit-AP, SIGMA) werden Nitrocellulosemembranen verwendet.

Um die Proteinbanden sichtbar zu machen, wird eine Ponceau-S-Färbung der Blots vorgenommen. Dazu werden diese für ca. 5 Minuten in Färbelösung eingelegt und anschließend in Aqua dest. differenziert, bis die Banden gut sichtbar sind (nicht zu lange differenzieren, geht sehr schnell). Nun kann die Blotfolie auch in einzelne Teststreifen zerschnitten werden, um sie mit unterschiedlichen Antikörpern zu inkubieren.

- Für 1h bei RT oder über Nacht bei +4°C in Blocking Puffer einlegen (Schüttler).
- 5-15 min in PBS waschen (Schüttler).
- Primären Antikörper in Antikörper-Puffer (siehe oben) verdünnen. Blotmembran einlegen und auf dem Schüttler bewegen (1-2h bei RT oder über Nacht bei +4°C). AK-Lösung dann für erneuten Gebrauch sammeln und wieder einfrieren.
- 5 x 5 min waschen mit PBT.
- 1 x 5 min waschen in PBS (Schüttler).
- Inkubation mit sekundärem Antikörper: alkal. Phosphatase-gekoppelter sekundärer Antikörper (Goat α -rabbit-AP SIGMA) 1:20.000 verdünnt in Antikörper-Puffer, 60-90 Minuten auf dem Schüttler bei Raumtemperatur.
- 5x5 min waschen in PBT.
- 1x5 min waschen in A. dest.
- für 1 min in 20 ml Äquilibrierungslösung legen; danach:
- 200 μ l NBT-Lösung und
- 150 μ l BCIP-Lösung zugeben.
- im Dunkeln entwickeln (Entwicklungszeit: 5-30 Minuten, in Ausnahmefällen auch länger); danach zum Abstoppen der Färbung in A. dest. legen.
- Trocknen.

Verwendete primäre Antikörper:

Als primäre Antikörper dienen verschiedene Kulturüberstände aus Frankreich (Lille), jeweils 1:10 verdünnt mit PBS. Die Inkubation erfolgt in Kunststoffröhrchen bei Raumtemperatur auf dem Schüttler.

2.25 Dot Blot für Proteine

Auf eine trockene Nitrocellulosemembran werden Proteinproben in unterschiedlicher Konzentration sowie Vergleichssubstanzen punktförmig aufgetragen, jeweils 1-10 µl pro Dot (auf demselben Blot für jeden Dot die gleiche Flüssigkeitsmenge).

Verwendete Proteinproben: - Vitellin von *Nereis virens* (2 µg/ Dot bzw. 0,2 µg/ Dot)

- BSA (2 µg/ Dot)

- *Nereis diversicolor* ♀-Elaeocytenhomogenat von 5 Tieren, aufgenommen in 100 µl Seewasser (unverdünnt bzw. 1:10-Verdünnung)

Um den Einfluß des SDS-PAGE-Probenpuffers auf die Epitope der Proteine hinsichtlich ihrer Bindung von Antikörpern zu untersuchen, werden vergleichsweise native und mit SDS bzw. Probenpuffer ohne Bromphenolblau behandelte Proben aufgetragen. Hierzu wird das Homogenat zum einen in gleichem Volumen 4%iger SDS-Lösung (gleiche Konzentration wie im Probenpuffer) solubilisiert. Im zweiten Ansatz wird das Homogenat im Verhältnis 1:1 mit Probenpuffer versetzt und 5 Minuten lang auf 95°C erhitzt. Der Farbstoff Bromphenolblau wird weggelassen, da er nur dazu dient, die Lauffront während der Elektrophorese sichtbar zu machen und die Beurteilung der Färbung der Dots erschweren würde.

Um den Einfluß von Fixierungsmitteln auf die Antikörperfärbung zu untersuchen, schneidet man die Blotfolie in zwei Teile mit jeweils den gleichen aufgetragenen Proben und inkubiert eine Hälfte eine Stunde lang in der zu untersuchenden Fixierungslösung. Während des Fixierungsvorgangs kann es zu Veränderungen an den Epitopen der Proteine kommen, so daß der primäre Antikörper diese nicht mehr erkennt. Im Anschluß an die Fixierung werden beide Blothälften zweimal 10 Minuten lang in PBS gewaschen und mindestens 2 Stunden bei Raumtemperatur auf dem Schüttler oder über Nacht bei +4°C in Blocking Puffer (5% Magermilchpulver in PBS, mit Ultraschall gelöst) eingelegt, danach noch einmal 10 Minuten mit PBS gewaschen. Dann trennt man die Blotmembran weiter in Streifen auf, die jeweils die gleichen Proben enthalten, um sie mit verschiedenen primären Antikörpern zu inkubieren. Die Inkubation mit den primären Antikörpern erfolgt für 1-2 Stunden bei Raumtemperatur auf dem Schüttler oder über Nacht bei 4°C. Auch alle nachfolgenden Schritte werden auf dem Schüttler bei Raumtemperatur durchgeführt. Zunächst wird fünfmal 5 Minuten lang mit PBT (PBS mit 0,1 % Triton X-100) gewaschen, dann einmal 5 Minuten mit PBS. Danach erfolgt die 60-90minütige Inkubation mit alkalischer Phosphatase-gekoppeltem sekundärem Antikörper, der in 1:4 mit PBS verdünntem Blocking Puffer in einer Konzentration von 1:20000 vorliegt. Daran anschließend wird dreimal 5 Minuten mit PBT und einmal 5 Minuten mit destilliertem Wasser gewaschen. Die Nitrocellulosestreifen werden dann für 1 Minute in Äquilibriumlösung (s. 2.2) inkubiert und danach in Färbelösung überführt und im Dunkeln entwickelt. Wenn die Färbung dunkelviolett ist (Entwicklungszeit 5-10 Minuten), wird sie durch Einlegen des Streifens in Wasser abgestoppt. Die Blotmembran wird im Dunkeln zwischen Filterpapier getrocknet und auch nach dem Trocknen dunkel aufbewahrt. Die Blotmembran kann auch zwischendurch (im Anschluß an einen Waschschrift) getrocknet und trocken aufbewahrt werden, danach kann die Prozedur fortgesetzt werden.

3 Ergebnisse

3.1 Dünnschnitte von *Platynereis dumerilii*

Die Suche nach der Bildungszone der Elaeocyten habe ich mit Methacrylat-Längsschnitten begonnen.

Die Tiere wurden mit BOUIN'schem Gemisch fixiert, die Segmente 2 bis 19 in Methacrylat eingebettet und entlang ihrer Längsachse von ventral nach dorsal geschnitten. Die Schnitte wurden einer Azanfärbung nach HEIDENHAIN unterzogen, unter dem Mikroskop betrachtet und mit einer Digitalkamera fotografiert. Dabei habe ich gezielt nach Stellen gesucht, an denen es Hinweise auf eine eventuelle Sprossung von Elaeocyten gibt. Besonders genau habe ich das Dorsalgefäß und andere Blutgefäße betrachtet. Die Lage und Beziehungen der erwähnten Blutgefäße sind dabei folgender Schemazeichnung (aus HAUENSCHILD und FISCHER 1969) zu entnehmen:

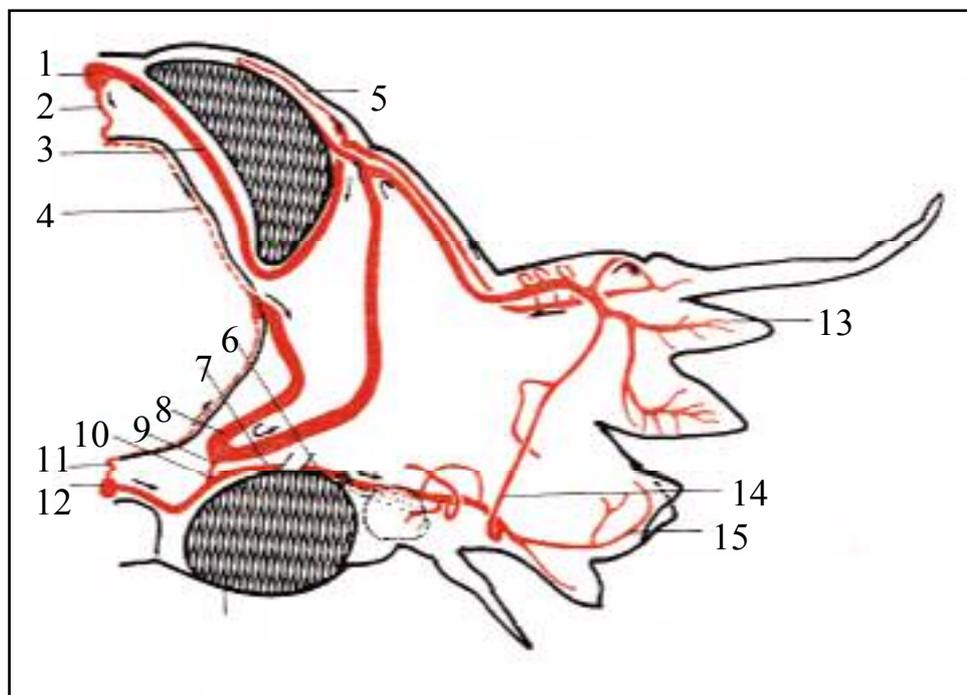


Abb. 6: Zeichnung aus HAUENSCHILD und FISCHER (1969), verändert. Schema des Blutgefäßsystems in der rechten Segmenthälfte. Blutgefäße rot, Pfeile = Strömungsrichtung. 1 = Dorsalgefäß, 2 = Dorsointestinalgefäß, 3 = Dorsoparapodialgefäß, 4 = Gefäßnetz in der Darmwand, 5 = Rete dorsale, 6 = das am Unterbrechungsstrich beginnende Gefäß ist die Fortsetzung des im vorhergehenden Segment entspringenden Ventroparapodialgefäßes, 7 = von hier ab wendet sich das Ventroparapodialgefäß nach caudal und führt das Blut dem Rete parapodiale ventrale des nächsten Segments zu, 8 = Lateralgefäß, 9 = Anastomose zwischen 8 und 10, 10 = Ventroparapodialgefäß, 11 = Ventrointestinalgefäß, 12 = Ventralgefäß, 13 = Rete parapodiale dorsale, 14 = Verbindungsgefäß zwischen 13 und 15, 15 = Rete parapodiale ventrale.

Bei meinen Untersuchungen habe ich folgendes beobachtet:

Entlang des dorsalen Blutgefäßes ist kein gehäuftes Auftreten von Elaeocyten zu sehen (Abb. 7). An keiner Stelle in meinen Präparaten gibt es Hinweise auf eine Sprossung dieser Zellen an der Gefäßwand des Dorsalgefäßes, nur selten ist überhaupt eine Zelle in direktem Kontakt zur Gefäßwand zu sehen. Auffällig ist hingegen eine Akkumulation von Elaeocyten rund um die Dorsoparapodialgefäße, welche segmental beidseitig in das dorsale Blutgefäß münden (Abb. 7). Außerdem ist eine Schicht von Zellen zu sehen, die oberflächennahe Blutgefäße am Ansatz des Notopodiums umgibt. Auch an den Ventroparapodialgefäßen und an feineren Gefäßverzweigungen innerhalb des Parapodiums treten Anhäufungen von Zellkernen und Coelomzellen auf.

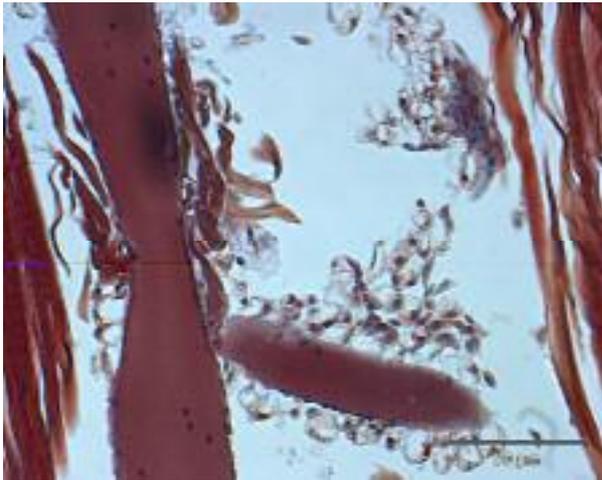


Abb. 7: Methacrylat-Längsschnitt, Azanfärbung. Dorsales Blutgefäß mit rechts einmündendem Dorsoparapodialgefäß; Wandung des Dorsalgefäßes ohne anliegende Elaeocyten, Dorsoparapodialgefäß vollständig von Elaeocyten umgeben. Präparat: *Platynereis dumerilii* Weibchen, Oocytendurchmesser 45 µm, 3 Tage vor der Fixierung dekapitiert.

Auf weiter ventral geführten Längsschnitten (auf Höhe des Darmes) ist das Dorsoparapodialgefäß quer getroffen (ohne Abb.). Auch hier war festzustellen, daß Elaeocyten lückenlos nebeneinander eng an der Gefäßwand anliegen, auch in mehreren Schichten. Diese unterscheiden sich jedoch nicht von frei in der Körperhöhle befindlichen Elaeocyten.

Hinweise auf eine eventuelle Entstehung von Elaeocyten fand ich im Parapodium, an den zu- und/oder abführenden Gefäßen des Rete parapodiale dorsale und auch an feineren Verästelungen (Abb. 8 und Abb. 9). Auch an den Ventroparapodialgefäßen fand ich Hinweise auf Zellproliferation (Abb. 10 und Abb. 11).

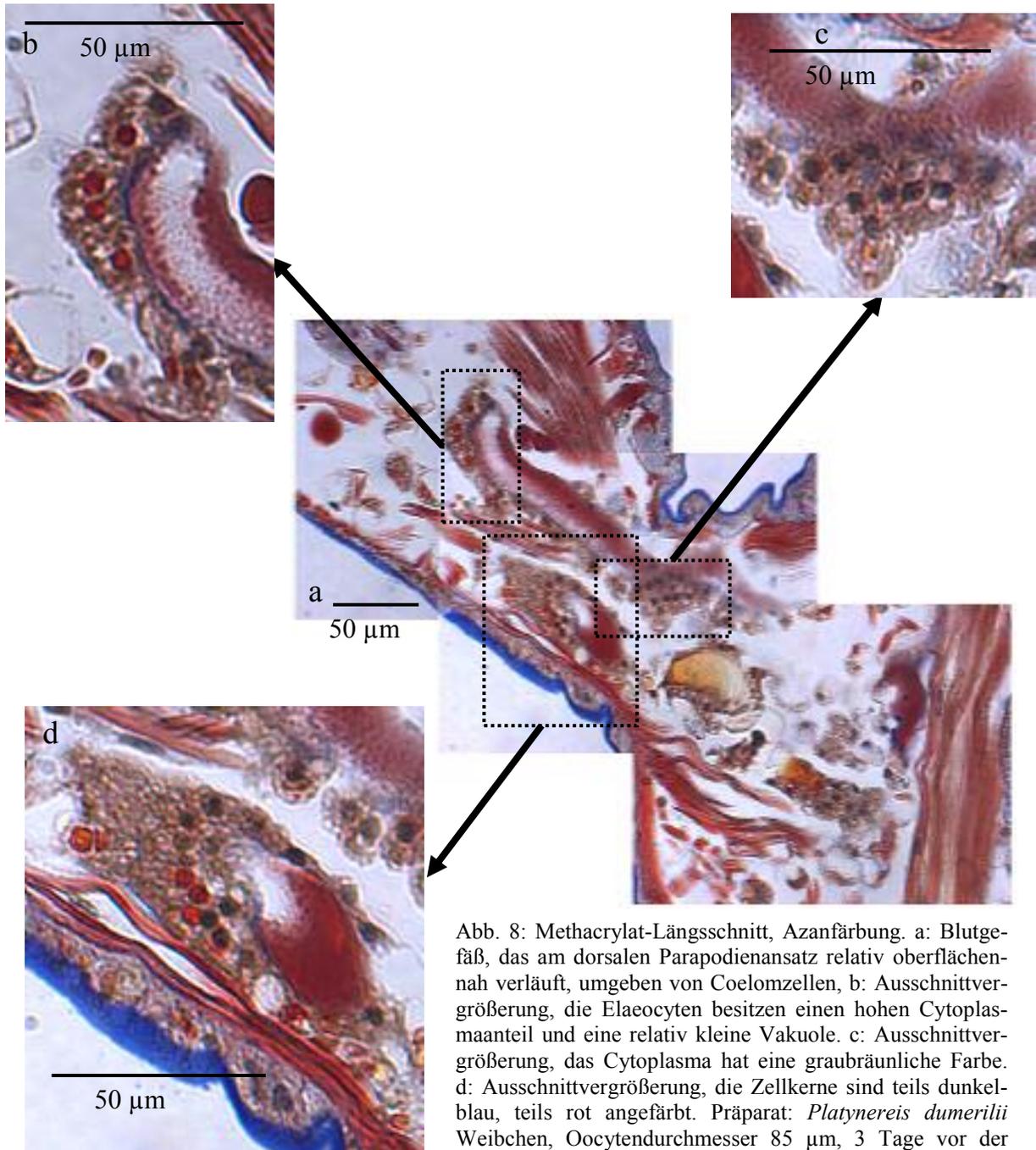


Abb. 8: Methacrylat-Längsschnitt, Azanfärbung. a: Blutgefäß, das am dorsalen Parapodienansatz relativ oberflächennah verläuft, umgeben von Coelomzellen, b: Ausschnittvergrößerung, die Elaeocyten besitzen einen hohen Cytoplasmaanteil und eine relativ kleine Vakuole. c: Ausschnittvergrößerung, das Cytoplasma hat eine graubräunliche Farbe. d: Ausschnittvergrößerung, die Zellkerne sind teils dunkelblau, teils rot angefärbt. Präparat: *Platynereis dumerilii* Weibchen, Oocytendurchmesser 85 µm, 3 Tage vor der Fixierung dekapitiert.

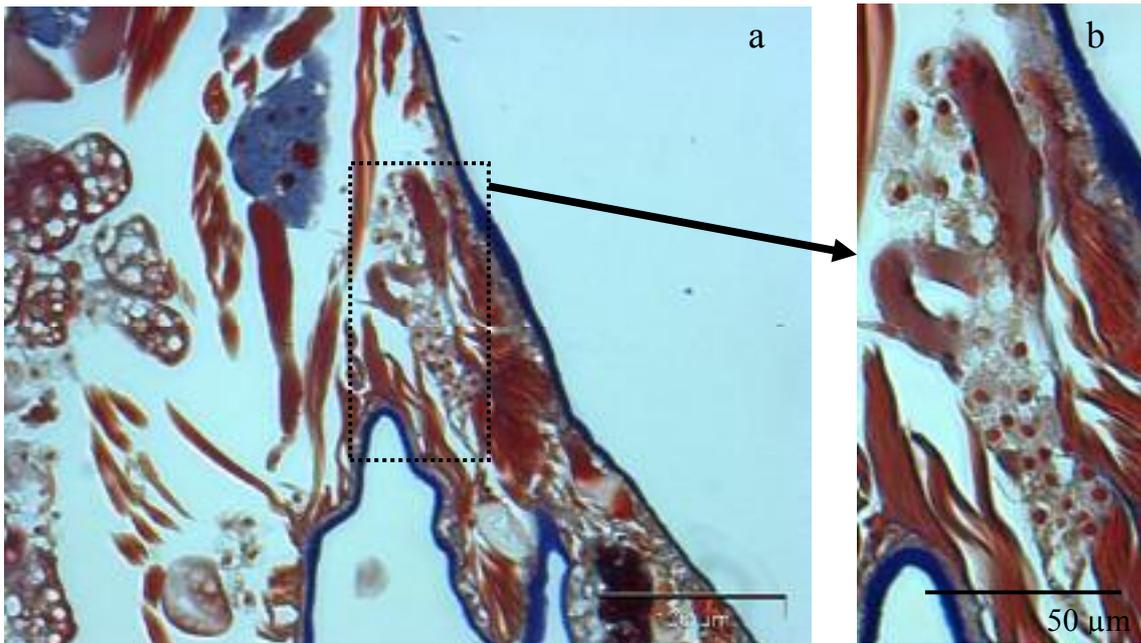


Abb. 9: Methacrylat-Längsschnitt, Azanfärbung. feinere Gefäßverästelungen innerhalb des Parapodiums mit Anhäufungen von Zellkernen. a: Lage des Parapodialgefäßes, b: Ausschnittvergrößerung, bei genauem Hinsehen zeigen sich cytoplasmareiche Zellkörper, die mit zunehmender Entfernung vom Ort der Kernanhäufung auch Vakuolen enthalten (von unten nach oben zunehmende Reife der Zellen). Präparat: *Platynereis dumerilii* Weibchen, Oocyten Durchmesser 55 μm , nicht dekapitiert.

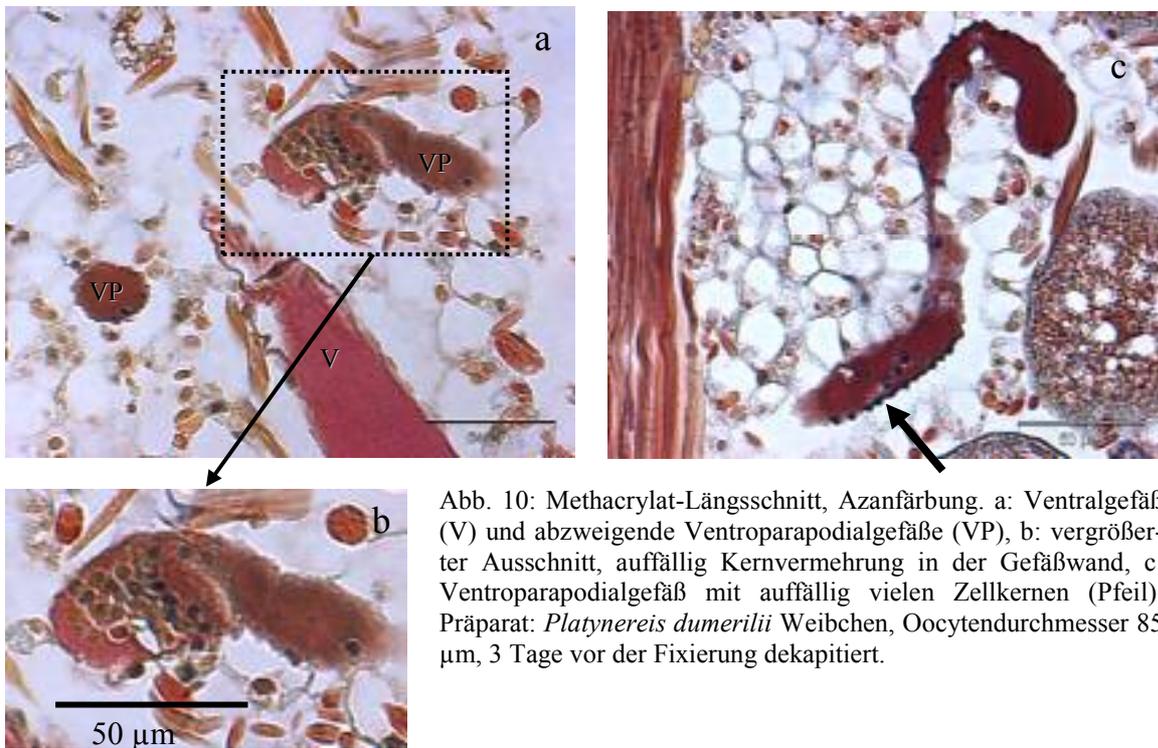


Abb. 10: Methacrylat-Längsschnitt, Azanfärbung. a: Ventralgefäß (V) und abzweigende Ventroparapodialgefäße (VP), b: vergrößerter Ausschnitt, auffällig Kernvermehrung in der Gefäßwand, c: Ventroparapodialgefäß mit auffällig vielen Zellkernen (Pfeil). Präparat: *Platynereis dumerilii* Weibchen, Oocyten Durchmesser 85 μm , 3 Tage vor der Fixierung dekapitiert.

Auf Methacrylat-Querschnitten (ohne Abb.) war in der ventralen Region des Tieres neben dem großen Ventralgefäß und den Ventroparapodialgefäßen eine große Zahl kleinerer Blutgefäße vorhanden. Diese vom Ventralgefäß abzweigenden kleineren Gefäßschlingen hatten oft eine große Anzahl von Kernen auf ihrer Oberfläche.

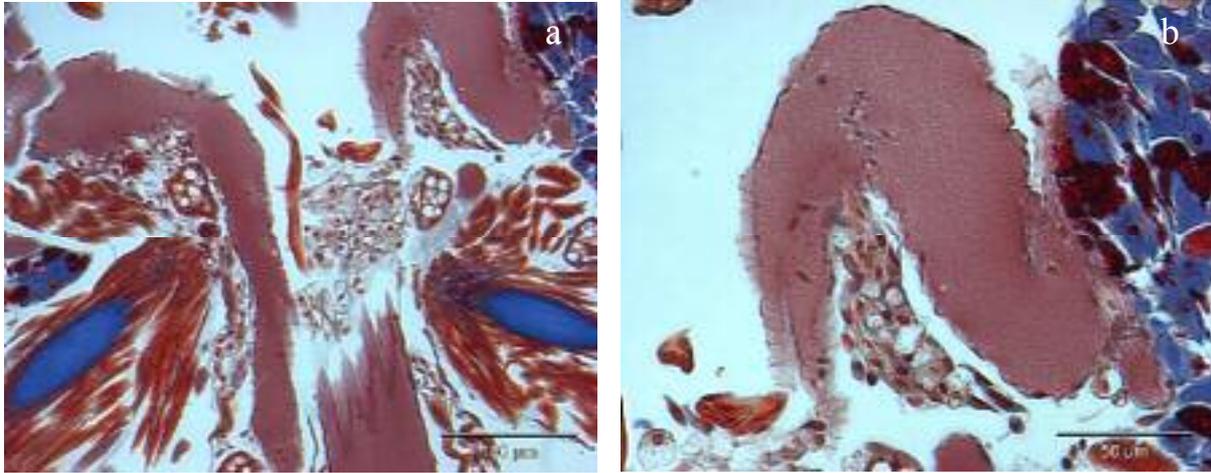


Abb. 11: Methacrylat-Längsschnitt, Azanfärbung. a: ventrales Blutgefäß mit einem davon abzweigenden Ventroparapodialgefäß auf jeder Seite. Die Borsten treten blau hervor. b: Traube von Zellen am rechten Ventroparapodialgefäß. Die Zellen sind im Vergleich zu freien Elaeocyten relativ klein, haben einen hohen Cytoplasmaanteil und eine runde Vakuole von relativ geringem Volumen. Präparat: *Platynereis dumerilii* Weibchen, Oocytendurchmesser 55 µm, nicht dekapitiert.

Als nächstes habe ich Paraffin-Querschnitte angefertigt, da die Paraffineinbettung im Gegensatz zur Methacrylateinbettung oft eine bessere Epitoperhaltung für eine spätere Antikörperfärbung bietet. Auch diese Schnitte wurden auf Elaeocyten-Proliferationszonen hin untersucht. Die Würmer wurden mit Paraformaldehyd fixiert, die Segmente 7 bis 20 in Paraffin eingebettet und quer geschnitten. Die Schnitte wurden mit Azan nach HEIDENHAIN gefärbt, am Mikroskop betrachtet und mit einer Digitalkamera fotografiert. Insbesondere habe ich nach meinen ersten Erkenntnissen aus den Methacrylat-Längsschnitten die Dorsoparapodial-, Parapodial- und Ventroparapodialgefäße gesucht und Hinweise auf eventuelle Zellproliferationszonen festgehalten.

Hinweise auf Zellsprossung gab es nur auf Querschnitten, in denen Parapodien getroffen waren. Ein Beispiel zeigt Abb. 12. Hier waren auf beiden Seiten des Tieres jeweils an den Blutgefäßen, die dorsolateral dicht unter der Oberfläche verlaufen und die Parapodialgefäße mit den Hauptblutgefäßen des Rumpfes verbinden, auffällige Zellanhäufungen zu sehen. Die Zellen sitzen dicht gepackt der Gefäßwand auf, vor allem an der dem Körperinneren zugewandten Seite, weniger an der oberflächennahen Seite.

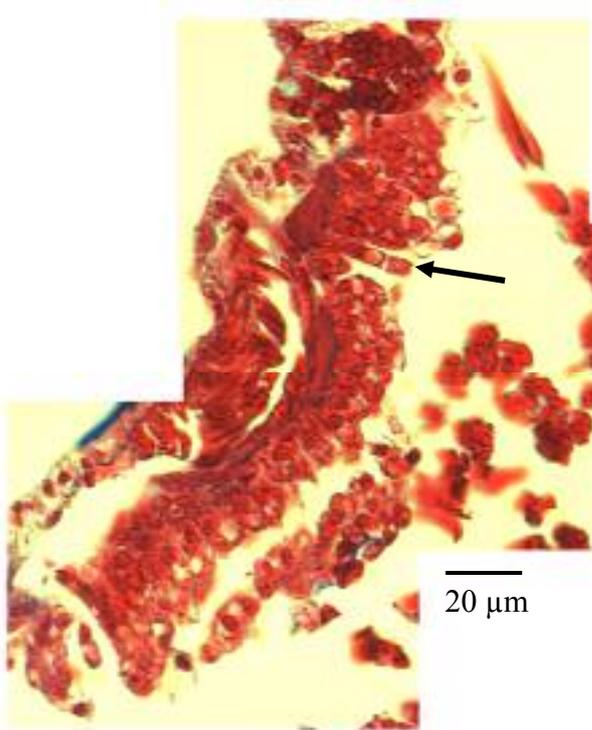


Abb. 12: Paraffin-Querschnitt, Azanfärbung, Durchlichtaufnahme. Parallele Anordnung von teilweise extrem langgestreckten Zellen (Pfeil). Die Kerne liegen meist auf einer Höhe nebeneinander. Die Zellen scheinen nur an der dem Körperinneren zugewandten Seite zu sprossen. Sie hängen traubenförmig vom Blutgefäß herab. An dieser Stelle liegen die meisten Vakuolen distal und die Kerne proximal zum Blutgefäß. Präparat: *Platynereis dumerilii* Männchen, 2 Tage vor der Fixierung dekapitiert.

Wegen der relativ schlechten Strukturhaltung bei den Paraffinschnitten habe ich noch einmal Tiere mit BOUIN'schem Gemisch fixiert, die Segmente 5 bis 20 in Methacrylat eingebettet und dann quer geschnitten. Die Schnitte wurden auch mit Azan nach HEIDENHAIN gefärbt, mikroskopiert und digital fotografiert. Abb. 13 zeigt einen Querschnitt in der Übersicht. Auch hier lag beim Betrachten das Augenmerk hauptsächlich auf Dorsoparapodial-, Parapodial- und Ventroparapodialgefäßen. An den oberflächennahen Gefäßen des Notopodiums waren auch hier regelmäßig Zellsprossungen zu beobachten. An den Ventroparapodialgefäßen waren lediglich Kernvermehrungen zu sehen, und die Dorsoparapodialgefäße zeichneten sich durch anliegende „erwachsene“ Elaeocyten aus.

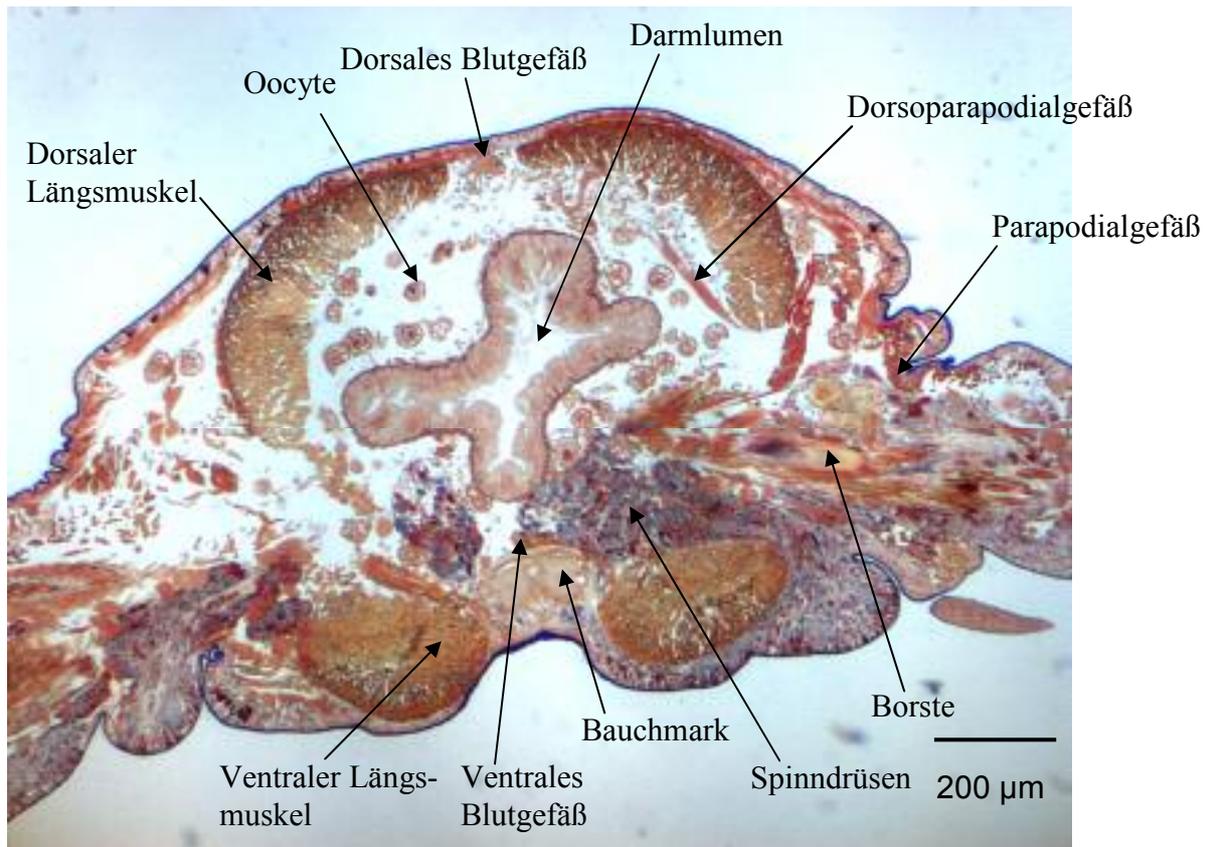


Abb. 13: Methacrylat-Querschnitt durch *Platynereis dumerilii*, Azanfärbung. Übersicht, Querschnitt im vorderen Bereich des Wurmes (zwischen 5. und 20. Segment). Präparat: Weibchen, Oocytendurchmesser 50 µm, 2 Tage vor der Fixierung dekapitiert.

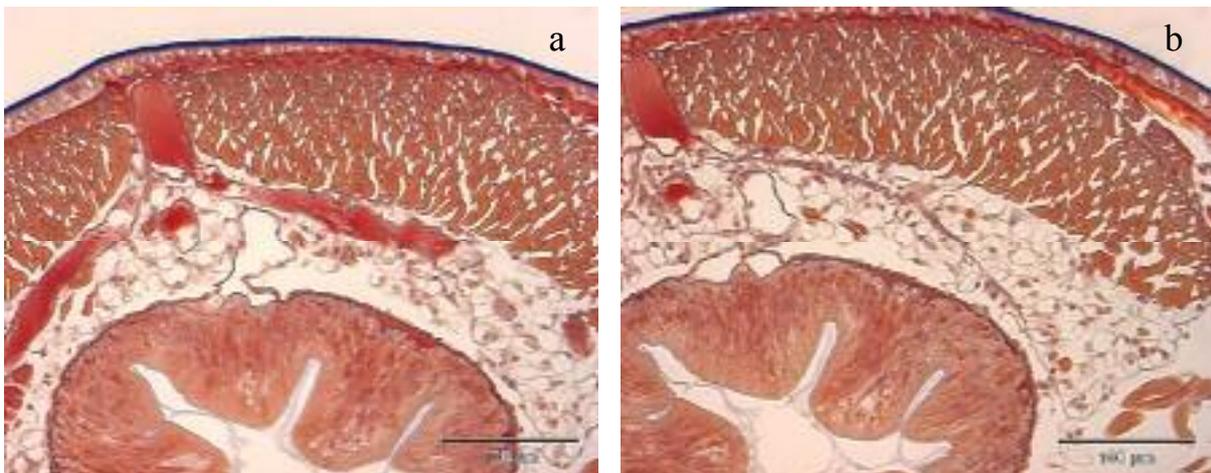


Abb. 14: Methacrylat-Querschnitt, Azanfärbung. a: Verlauf der Dorsoparapodialgefäße, die segmental in das Dorsalgefäß einmünden, zwischen dem Darm und der dorsalen Längsmuskulatur. b: Der Schnitt wurde knapp vor oder hinter dem Dorsoparapodialgefäß geführt, so daß man nur das Coelothel sieht, welches dann die Wandung des Gefäßes bildet. Um die Dorsoparapodialgefäße herum sammeln sich große Mengen von Elaeocyten an. Diese sitzen teilweise geordnet und lückenlos aneinander an der Gefäßwand oder am Dissepiment an, wobei meistens die Vakuole proximal und das Cytoplasma mit dem Kern distal orientiert ist. Präparat: *Platynereis dumerilii* Männchen, 2 Tage vor der Fixierung dekapitiert.

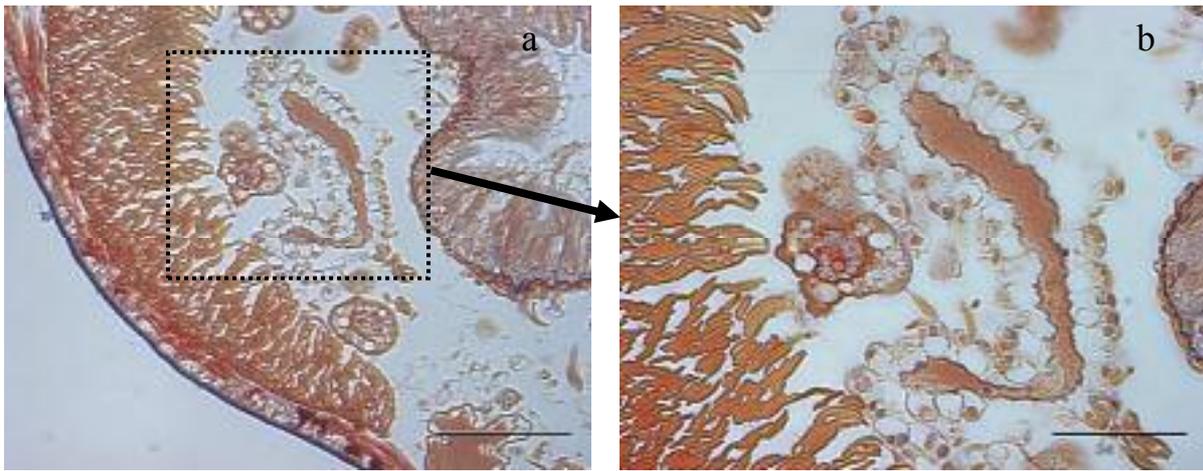


Abb. 15: Methacrylat-Querschnitt, Azanfärbung. a: Dorsoparapodialgefäß mit ansitzenden Elaeocyten, b: Ausschnittvergrößerung, die Elaeocyten haben Sarkolyten phagocytiert (spindelförmige Einschlüsse) und sind alle mit ihrer Vakuole zum Blutgefäß hin orientiert. Die von den Elaeocyten aufgenommenen Sarkolyten unterscheiden sich in ihrer Farbe (blau, gelb, rot), was auf einen unterschiedlichen pH-Wert in den Verdauungsvakuolen schließen läßt. Präparat: *Platynereis dumerilii* Weibchen, Oocytendurchmesser 50 µm, 2 Tage vor der Fixierung dekapitiert.

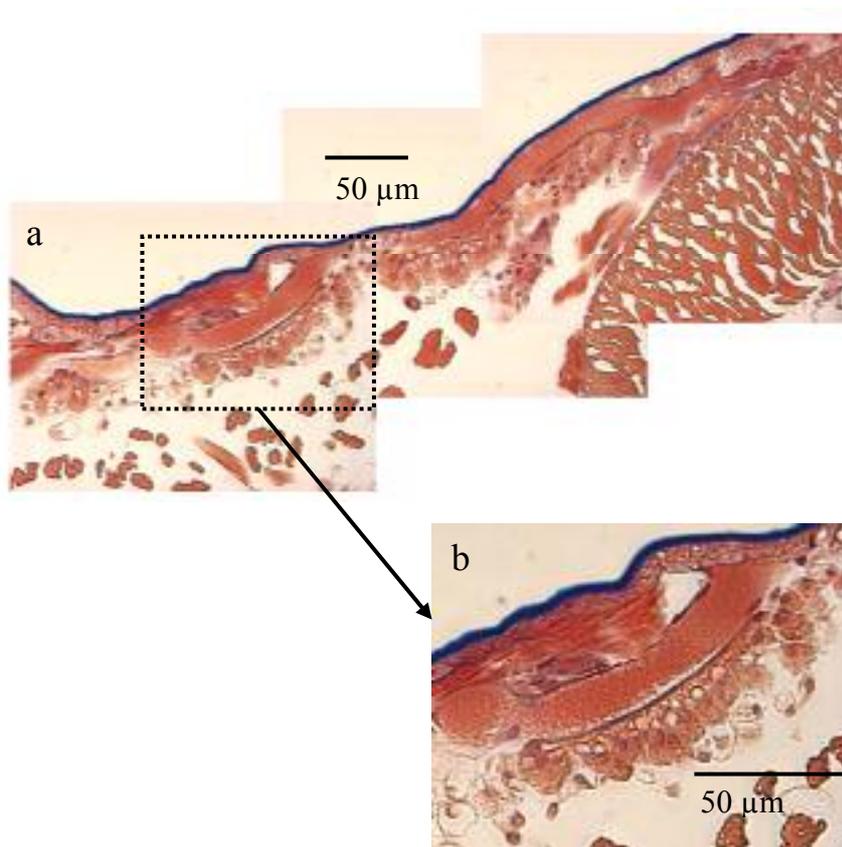


Abb. 16: Methacrylat-Querschnitt, Azanfärbung. a: In diesem Schnitt ist die Proliferationszone über eine besonders lange Strecke getroffen. Sie erstreckt sich an der Dorsalkante des Parapodiums über die gesamte Länge der Verbindungsgefäße zwischen Rete dorsale und Rete parapodiale dorsale, wobei nicht klar ist, ob es sich um das zuführende oder abführende Gefäß handelt, da beide parallel verlaufen. Das erstere wird vom Ventroparapodialgefäß gespeist, das zweite mündet in das Dorsoparapodialgefäß. Die Zellen entstehen an der Ventralseite der Blutgefäße, die das Parapodium mit Blut versorgen und/oder dessen Blut über das Dorsoparapodialgefäß zum Dorsalgefäß zurückführen. b: Ausschnittvergrößerung, proliferierende Zellen am Blutgefäß. Präparat: *Platynereis dumerilii* Männchen, 2 Tage vor der Fixierung dekapitiert.

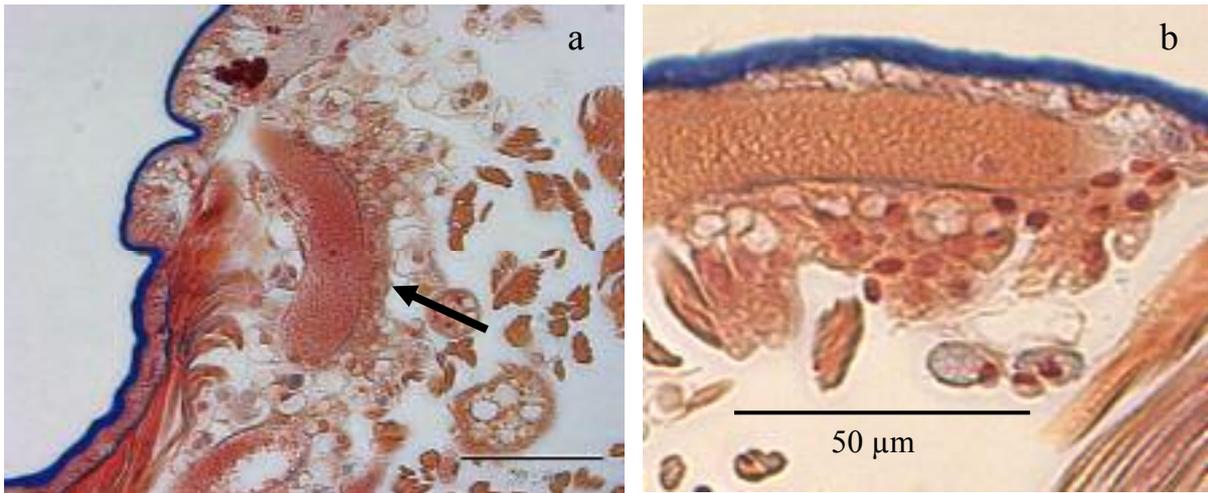


Abb. 17: Methacrylat-Querschnitt, Azanfärbung. a: An dieser Stelle (Pfeil) sind einige Zellen zu sehen, die noch keine Vakuole ausgebildet haben und auch noch nicht die charakteristische langgestreckte Form besitzen. Anhand der Kerne sieht man, daß es sich um viele kleine, dicht nebeneinander am Gefäß ansitzende Zellen handelt. Präparat: *Platynereis dumerilii* Weibchen, Oocytendurchmesser 50 µm, 2 Tage vor der Fixierung dekapitiert. b: Hier sieht man bei den drei Zellen links im Bild besonders deutlich die langgestreckte Form mit einer relativ kleinen Ansatzfläche am Blutgefäß. Präparat: *Platynereis dumerilii* Männchen, 2 Tage vor der Fixierung dekapitiert.



Abb. 18: Methacrylat-Querschnitt, Azanfärbung. Die entstehenden Zellen bilden proximal zum Blutgefäß ihre Vakuole aus, der Zellkern hingegen liegt distal. Das Cytoplasma erscheint bräunlich und granulär und füllt den größten Teil der Zelle aus. Elaeocyten, die nicht mehr am Blutgefäß ansitzen, haben eine wesentlich größere Vakuole und einen geringeren Cytoplasmaanteil, erscheinen dadurch blasser, fast durchsichtig bis auf den Kern. Es sind besonders deutlich zwei Generationen von Elaeocyten zu sehen, die jüngere sitzt noch am Blutgefäß an und besitzt kleine Vakuolen, die ältere befindet sich weiter distal, hat den Kontakt zum Gefäß verloren und besitzt große Vakuolen. Präparat: *Platynereis dumerilii* Männchen, 2 Tage vor der Fixierung dekapitiert.

Auf anderen Schnitten (ohne Abb.) sieht man den größten Teil der Vakuolen distal und die Zellkerne proximal zum Gefäß. Davon abgesehen stimmt das Erscheinungsbild der Zellen mit Abb. 18 überein, wo die Vakuolen sich direkt an der Fläche befinden, die an das Blutgefäß grenzt.

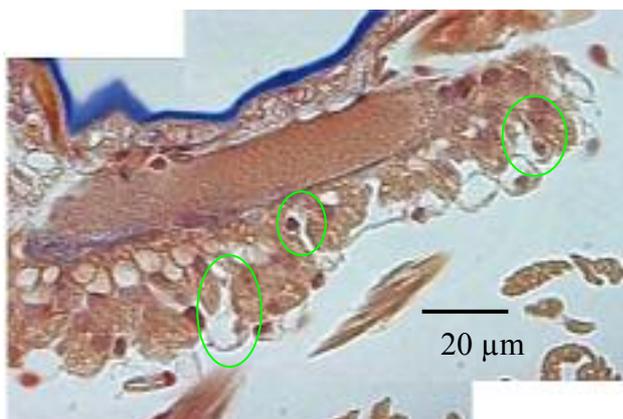


Abb. 19: Methacrylat-Querschnitt, Azanfärbung. In dieser Abbildung sind einige Stellen zu finden, an denen sich Zellen gerade aus dem Verband zu lösen scheinen (eingekreist). Sie stehen noch in engem Kontakt zu ihren Nachbarzellen, besitzen aber bereits eine ausgedehnte Vakuole und haben keine Verbindung zum Blutgefäß mehr. Präparat: *Platynereis dumerilii* Männchen, 2 Tage vor der Fixierung dekapitiert.

3.2 Markierung der Coelomzellen durch die verwendeten Antikörper.

Von den Antikörpern aus Lille war nur bekannt, daß sie gegen Coelomzellen von *Nereis diversicolor* entwickelt worden waren. Nun sollte mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie herausgefunden werden, ob die Antikörper auch gegen Coelomzellen von *Platynereis dumerilii* verwendbar sind und wenn ja, welche Coelomzelltypen und welche Strukturen im Speziellen markiert werden. Getestet wurde an einer Coelomflüssigkeitsprobe von weiblichen Tieren, die also Elaeocyten, Granulocyten, Oocyten und Sarkolyten enthält. CC 41,14 wurde zusätzlich auch an einer Coelomflüssigkeitsprobe von männlichen Tieren ausprobiert.

Die fixierten Elaeocyten wurden mit den verschiedenen primären Antikörpern inkubiert und anschließend mit einem FITC-markierten sekundären Antikörper (grüne Fluoreszenz) behandelt. Außerdem wurden die Zellkerne mit DAPI gefärbt (blaue Fluoreszenz). Um ein einheitliches Ausgangsmaterial für die vergleichenden Untersuchungen der Antikörperspezifität zu haben, wurde der vereinigte Coelominhalt von fünf *Platynereis dumerilii*-Weibchen mit ähnlichen Oocytengrößen (60-80 µm) verwendet (Abb. 20 bis Abb. 27).

Die folgenden Antikörper wurden getestet:

CC 1	CC 41,1	CC 45
CC 10	CC 41,12	CC 45-2
CC 11	CC 41,13	CC 45,14
CC 13,612	CC 41,14	CC 59
CC 25	CC 41,15	GT 52.
CC 30	CC 41,19	
CC 41	CC 41,20	

Dabei war bei folgenden keine Färbung zu erkennen:

CC 11	CC 41,12	CC 45
CC 13,612	CC 41,13	CC 45-2
CC 25	CC 41,19	CC 45,14
CC 30	CC 41,20	

Die Ergebnisse der Markierungen der restlichen Antikörper sind in den folgenden Abbildungen dargestellt.

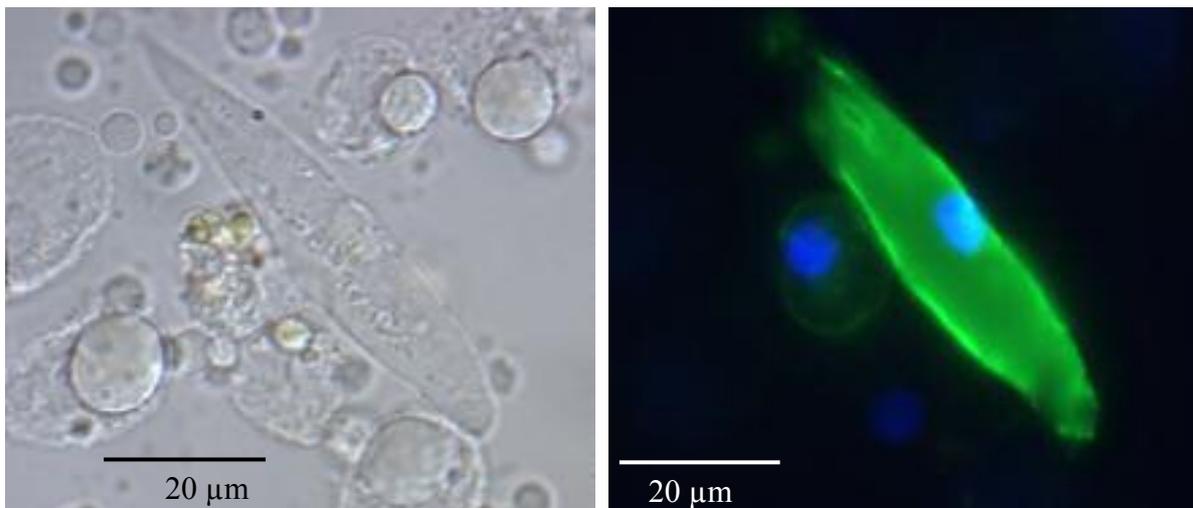


Abb. 20: Markierung von Sarkolyten (Muskelfragmenten) durch den CC 1 Antikörper. Die umgebenden Elaeocyten (s. linke lichtmikroskopische Aufnahme) werden hingegen nicht oder nur schwach gefärbt.

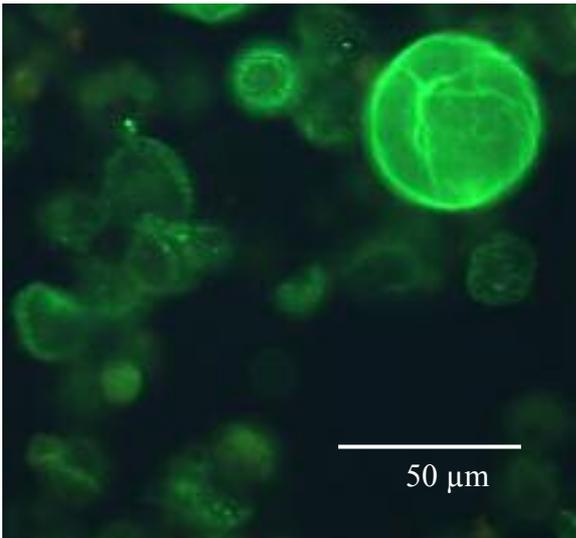
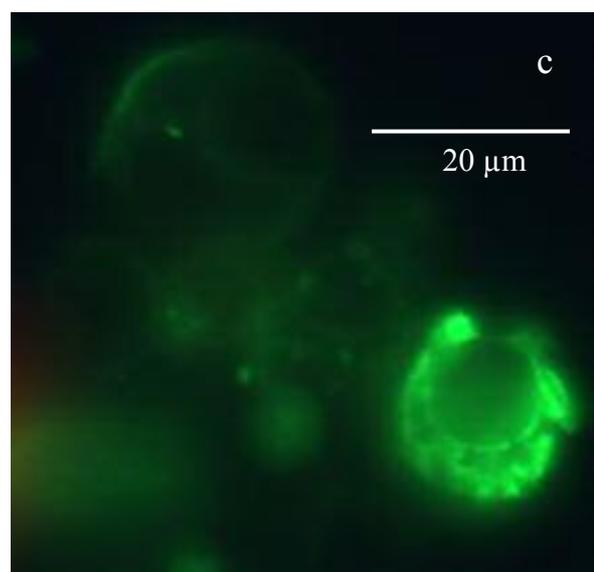
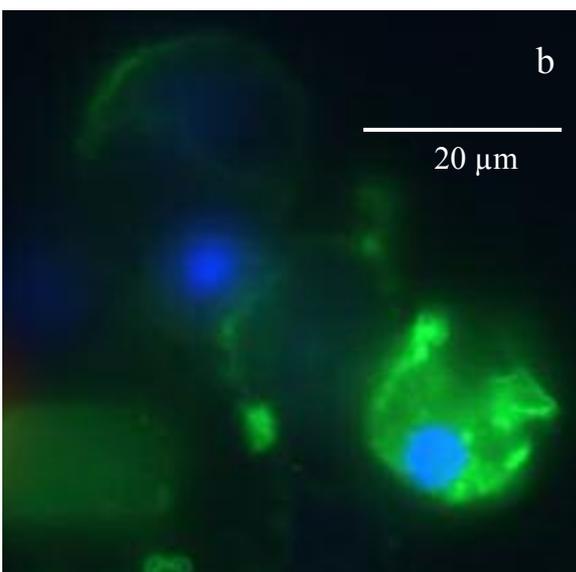


Abb. 21: CC 10 färbt die äußerste Oberfläche von Oocyten an, die Oberfläche von Elaeocyten jedoch nur sehr schwach. Auffällig ist, daß auf der Oberfläche der Elaeocyten granuläre Strukturen markiert werden, im Gegensatz zu den Markierungen anderer Antikörper (s. u.).



Abb. 22: Markierung von Coelomzellen mit CC 41. a: lichtmikroskopische Aufnahme, b: Fluoreszenzmikroskopie, derselbe Bildausschnitt in der Ebene des Kernes, c: Fluoreszenzmikroskopie, derselbe Bildausschnitt in der Ebene des Lipidtropfens. Es werden faserartige Strukturen im Zellinneren angefärbt, jedoch nicht bei allen Zellen (Vergleich mit lichtmikroskopischem Bild).



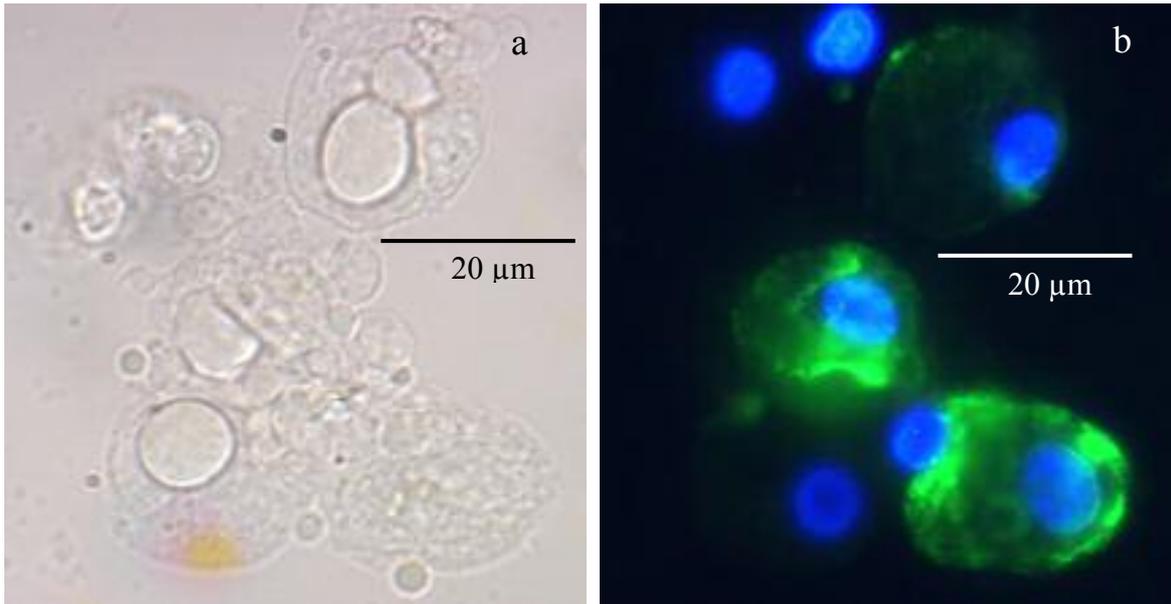


Abb. 23: Markierung von Elaeocyten durch CC 41,1. a: lichtmikroskopische Aufnahme, b: CC 41,1 färbt ebenfalls Strukturen im Zellinneren bei einem Teil der Elaeocyten an, andere hingegen, die im lichtmikroskopischen Bild zu sehen sind, werden überhaupt nicht fluoreszenzmarkiert.

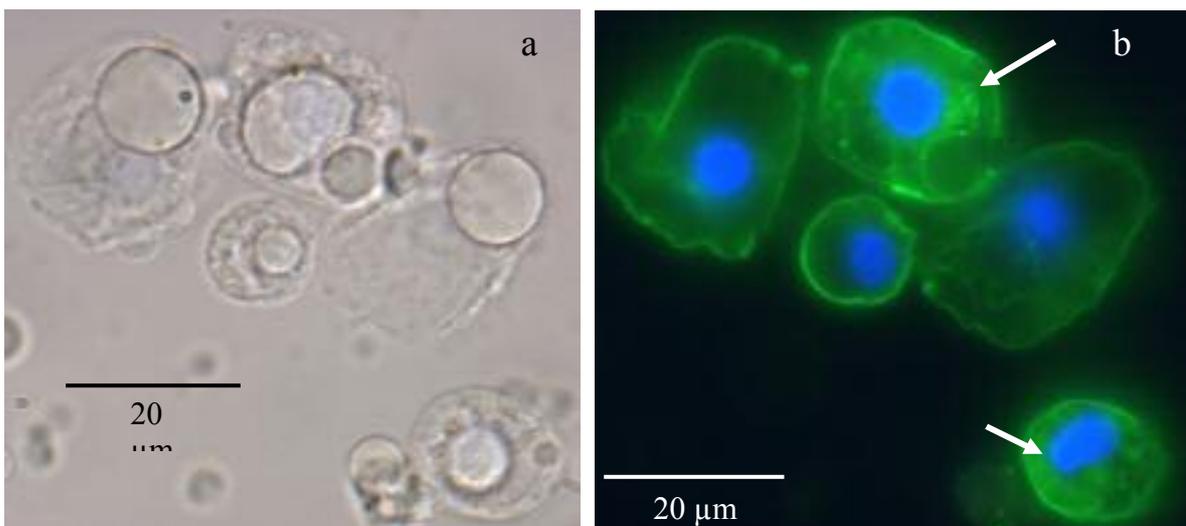


Abb. 24: Markierung von Elaeocyten mit CC 41,15. a: lichtmikroskopische Aufnahme, b: CC 41,15 markiert die Membran der meisten Elaeocyten, jedoch kommt es vor, daß einzelne Zellen nicht markiert werden. Bei genauerem Hinsehen erkennt man, daß in manchen Zellen intrazelluläre Vesikel angefärbt werden, die vor allem um den Kern herum zu finden sind (Pfeile).

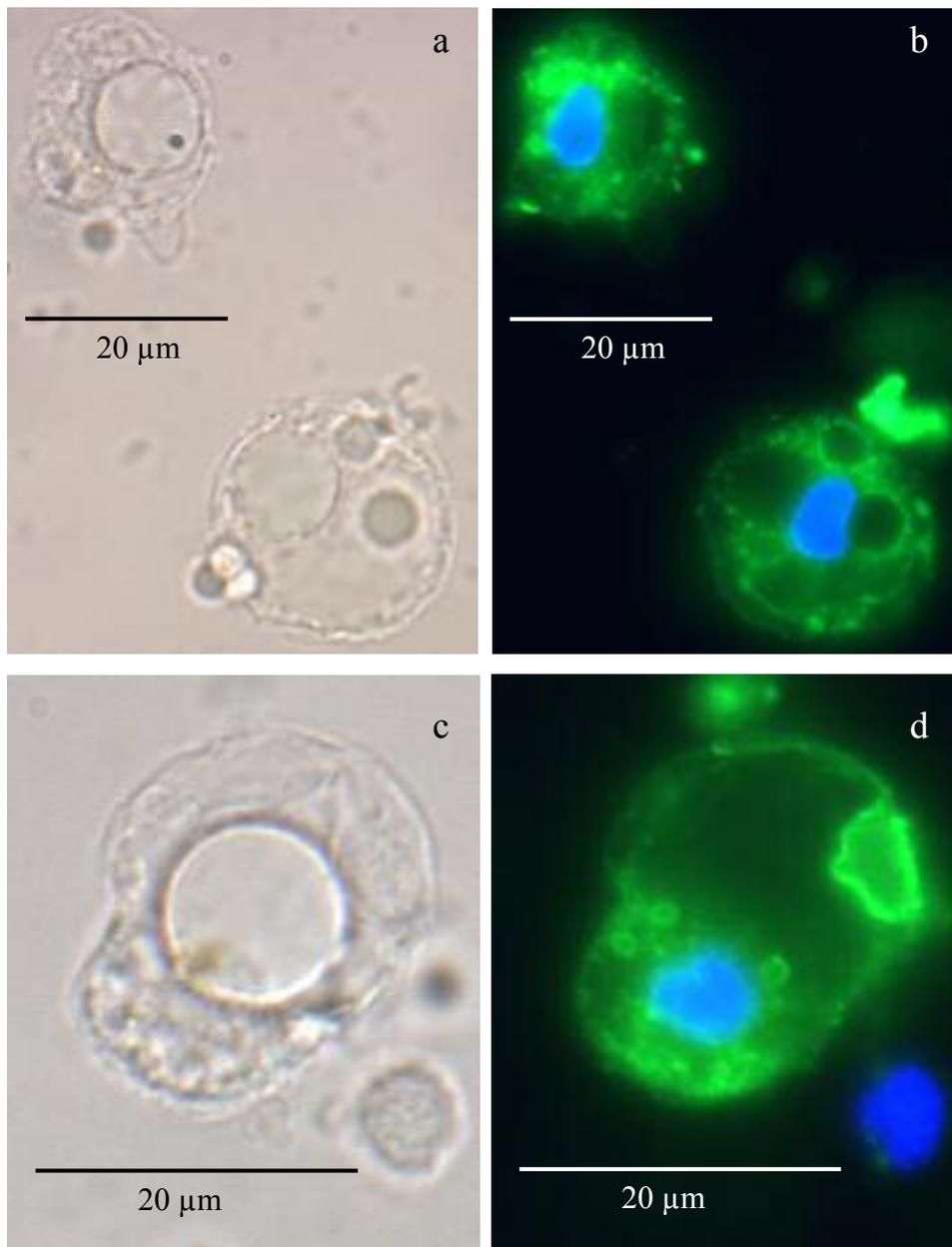


Abb. 25: Markierung von Elaeocyten durch den CC 59-Antikörper. a und c: lichtmikroskopische Aufnahmen, b und d: CC 59 färbt noch deutlicher als CC 41,15 intrazelluläre Vesikel an.

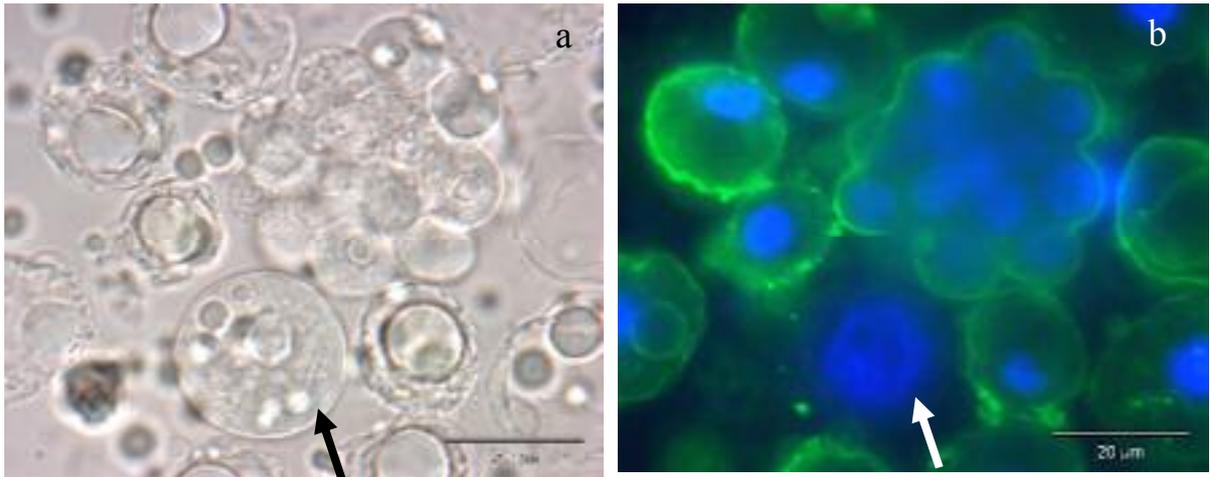


Abb. 26: Markierung von Coelomzellen durch GT 52. a: lichtmikroskopische Aufnahme, b: GT 52 färbt die Membran von Elaeocyten sowie von den Hüllzellen der Oocytenballen an, jedoch nicht die von freien Oocyten (Pfeile).

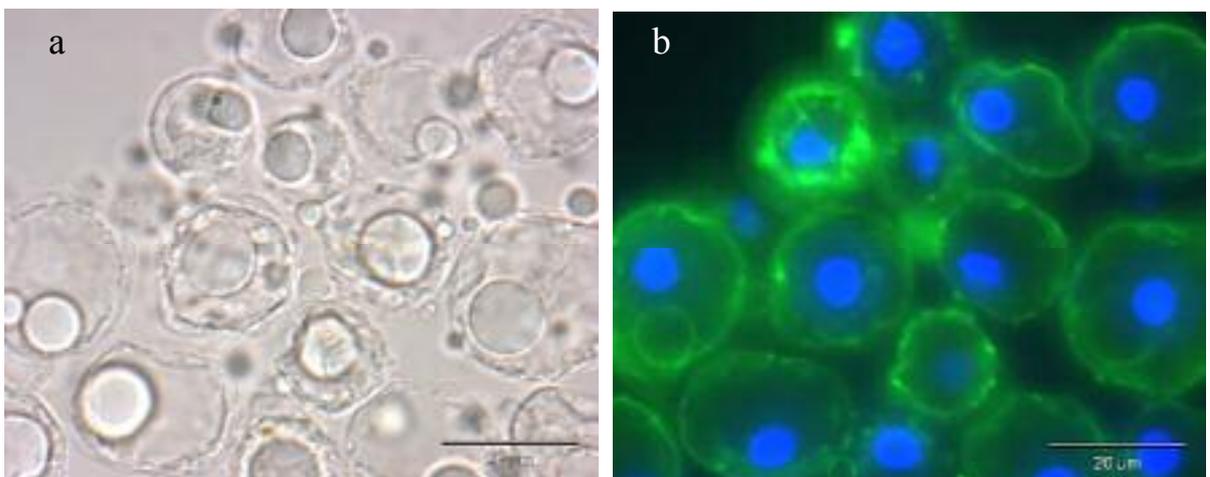


Abb. 27: Markierung von Coelomzellen durch GT 52. a: lichtmikroskopische Aufnahme, b: Die Membranen der Elaeocyten sind durch GT 52 alle relativ gleichmäßig angefärbt.

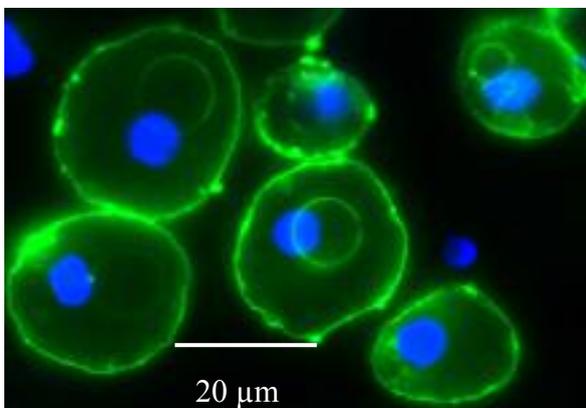


Abb. 28: CC 41,14 macht die äußeren Membranen der Elaeocyten sowie den Rand des Lipidtropfens sichtbar. Präparat: *Platynereis dumerilii* Männchen

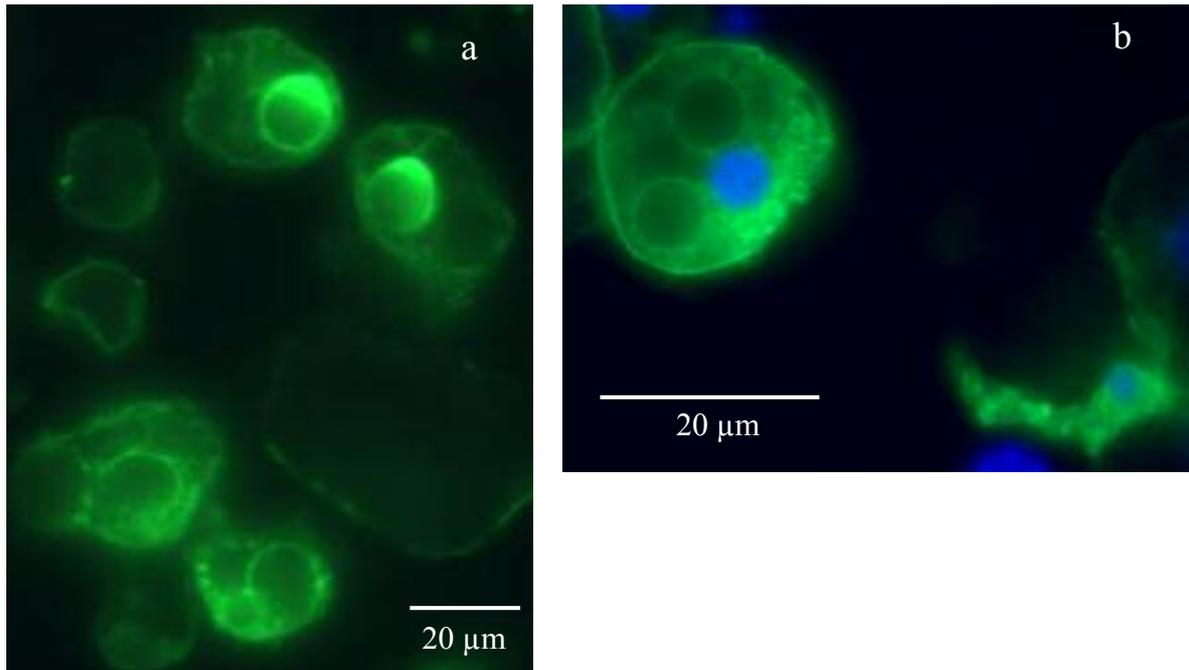


Abb. 29: Markierung von Coelomzellen durch CC 41,14. a: Bei manchen Lipidtropfen sieht es so aus, als säße ihnen eine Proteinkappe auf, die kräftig angefärbt wird. Bei anderen Elaeocyten hingegen ist der Lipidtropfen schwächer umrandet, dafür fällt auf, daß kleine Vesikel im Cytoplasma markiert sind. Präparat: *Platynereis dumerilii* Weibchen, vereinigter Coelominhalt von vier Tieren, Oocytengröße 65 µm, 35 µm, 35 µm und 25 µm, alle Tiere 2 Tage vor der Fixierung dekapitiert. b: Die linke Zelle enthält zwei Lipidtropfen anstelle von einem, wie es bei den meisten Elaeocyten von *Platynereis dumerilii* der Fall ist. Hier sind deutlich Einschlüsse im Cytoplasma sichtbar, der Rand der Lipidtropfen ist zu sehen, sticht aber nicht hervor. Bei der rechten Zelle ist die Zellmembran nicht angefärbt, wohl aber wiederum Einschlüsse im Cytoplasma. Der Lipidtropfen liegt außerhalb der sichtbaren Ebene, die große Vakuole wird als dunkle Fläche erkennbar. Präparat: *Platynereis dumerilii* Weibchen, vereinigter Coelominhalt von zwei Tieren, Oocytengröße 50 µm und 80 µm.

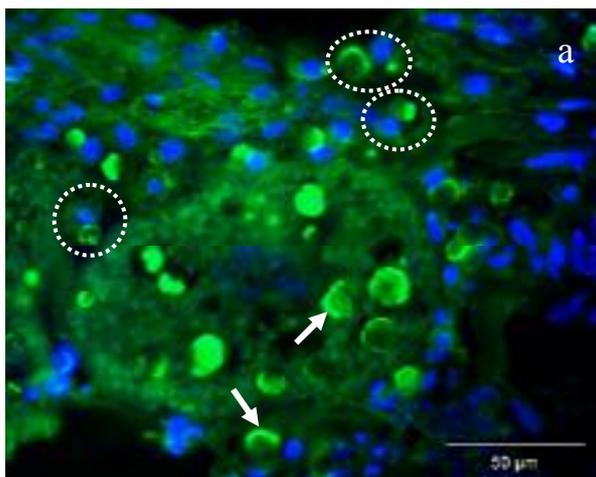


Abb. 30: Kryostatschnitt; eine große Oocyte mit zahlreichen Dottergranula und etwas größeren, runden Lipidtropfen. Bei der Oocyte ist außerdem der Kern angeschnitten, und die Chromatinstruktur wird sichtbar. Die Lipidtropfen werden ebenso wie die der Elaeocyten durch CC 41,14 angefärbt. Auch hier ist an manchen Stellen eine Art Kappe auf den Lipidtropfen zu sehen (Pfeile). Um die Oocyte herum befinden sich Elaeocyten (eingekreist), erkennbar an Kern und Lipidtropfen. Das Cytoplasma ist nur ganz schwach gefärbt, die Zellmembran gar nicht. Präparat: *Platynereis dumerilii* Weibchen, Oocytengröße 100 µm.

3.3 Westernblots mit den Coelomzell-Antikörpern

Die bereits (siehe Abschnitt 3.2) an fixierten Coelomzellen getesteten Antikörper wurden anschließend auf Teststreifen aus Nitrocellulosemembran angewendet, auf die durch SDS-PAGE aufgetrennte Proteine von *Platynereis dumerilii*-Coelomzellen durch Westernblot transferiert worden waren. Mit diesem Versuch sollte die Spezifität der Antikörper genauer untersucht und das Molekulargewicht der markierten Proteine bzw. deren Untereinheiten abschätzbar gemacht werden. Zum Vergleich wurde der Versuch auch mit Teststreifen, die Coelomzellproteine von *Nereis diversicolor* enthielten, durchgeführt, da die Antikörper gegen Coelomzellen dieser Art entwickelt worden waren.

Die Markerbanden wurden durch Ponceau-S-Färbung direkt nach dem Blotten sichtbar gemacht. Die mit den verschiedenen primären Antikörpern und alkal. Phosphatasegekoppeltem sekundärem Antikörper behandelten Streifen wurden mit NBT und BCIP gefärbt (Entwicklungszeiten in der Abbildungslegende angegeben). Viele Banden waren jedoch so schwach, daß sie mit dem bloßen Auge kaum und auf den eingescannten Abbildungen überhaupt nicht mehr zu sehen waren. Die Lokalisierung dieser Banden ist hier durch gestrichelte Linien angedeutet.

Als Marker wurde folgendes Gemisch verwendet:

- 205 kDa Myosin
- 116 kDa β -Galactosidase
- 97 kDa Phosphorylase B
- 66 kDa BSA
- 45 kDa Ovalbumin
- 29 kDa Decarboanhydrase

1. Antikörper: CC 11; CC 25; CC 41,12; CC 41,13; CC 41,14; CC 41,19; CC 45; CC 45-2; CC 45,14.

Getestet wurden solche Antikörper, von denen aufgrund der Nomenklatur (CC für „cellules coelomiques“) vermutet wurde, daß sie Proteine von Elaeocyten anfärben könnten.

Bei der Anwendung der oben angegebenen Antikörper auf Teststreifen mit Coelomzellhomogenat von *Platynereis dumerilii* Weibchen (vereinigte Zellsuspension von 3 Tieren, Oocytengröße 70 μm , 60 μm und 85 μm) wurden trotz einer Entwicklungszeit von 60 Minuten auf dem Blot überhaupt keine Banden sichtbar (ohne Abb.).

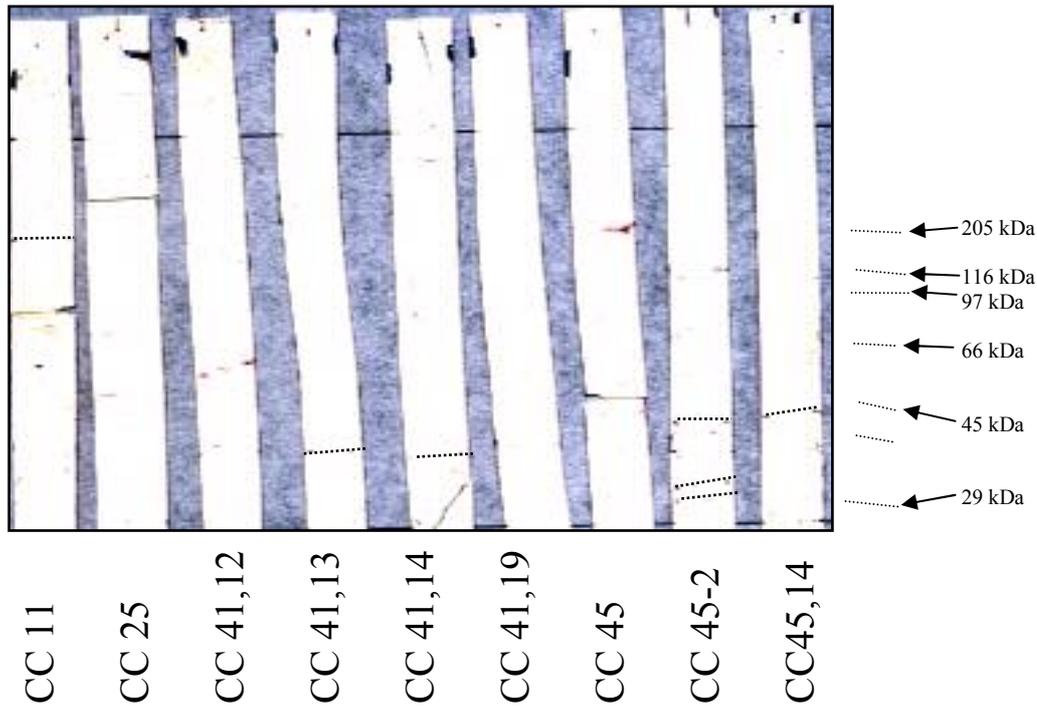


Abb. 31: Westernblot eines Coelomzell-Homogenats von *Platynereis dumerilii* Männchen, vereinigte Zell-suspension von 7 Tieren, Antikörperfärbung, Entwicklungszeit: 35 Minuten. Beim Männchen sind an einigen wenigen Stellen schwache Banden zu erkennen. Aufgrund der schwachen Färbung wurde die Position der Banden markiert.

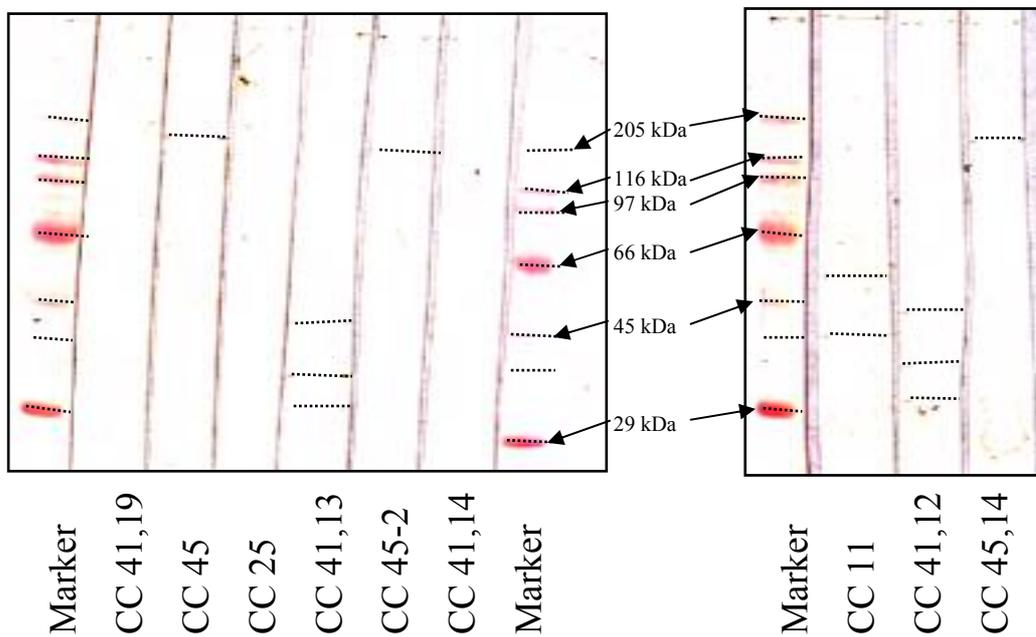


Abb. 32: Westernblots von Coelomzellen von *Nereis diversicolor* mit Coelomzell-spezifischen Antikörpern, Entwicklungszeit: 120 Minuten. Präparat: Weibchen, vereinigte Zellsuspension von 5 Tieren. Aufgrund der schwachen Färbung wurde die Position der Banden markiert.

2. Antikörper: CC 1; CC 10; CC 41; CC 41,1; CC 41,15; CC 59; GT 52.

Getestet wurden nur die Antikörper, die bereits auf dem Dot Blot (siehe Abschnitt 3.4) sichtbare Resultate lieferten.

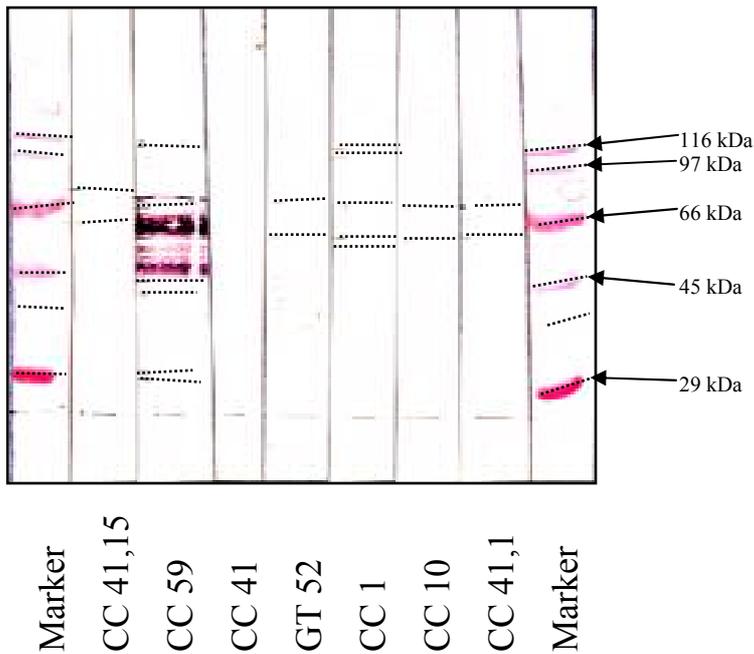


Abb. 33: Westernblot von Coelomzellen-Homogenat, Antikörperfärbung, Entwicklungszeit: 5 Minuten. Präparat: *Platynereis dumerilii* Weibchen, vereinigte Zellsuspension von 4 Tieren, Oocytengröße 70 μm , 60 μm und zweimal Oocytensphären. Auffällig ist hier, daß von allen Antikörpern mit Ausnahme von CC 41 die gleichen Banden im Bereich um den 66 kDa-Marker herum angefärbt wurden. Besonders kräftig sind die von CC 59 gefärbten Banden zu sehen. Der oberste Marker (205 kDa) und die schwereren Probenbanden sind hier nicht zu sehen, da die Blotzeit für die hochmolekularen Proteine zu kurz war. Bei schwacher Färbung wurde die Position der Banden markiert.

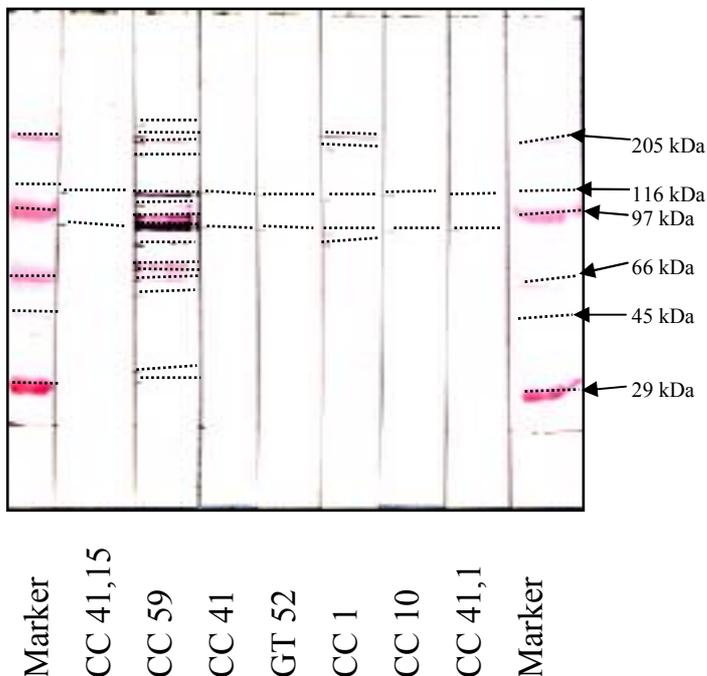


Abb. 34: Westernblot von Coelomzell-Homogenat von *Platynereis dumerilii* Männchen, vereinigte Zellsuspension von 3 Tieren, Antikörperfärbung, Entwicklungszeit: 5 Minuten. Auch bei den Männchen gibt es zwei Banden, die von jedem Antikörper angefärbt werden. Auch hier sorgt CC 59 für eine besonders kräftige Färbung. Die Lage nur schwach markierter Banden ist durch Striche markiert.

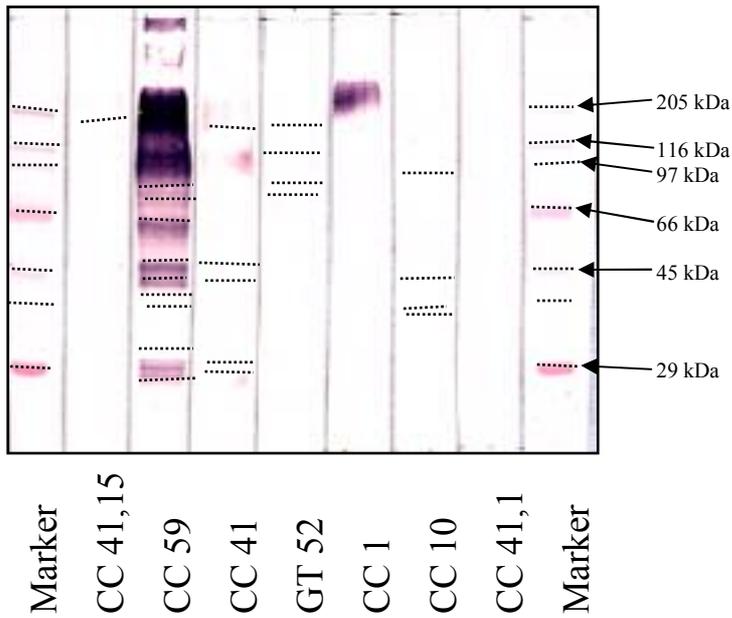


Abb. 35: Westernblot von Coelomzell-Homogenat von *Nereis diversicolor* Weibchen, vereinigte Zellsuspension von 2 Tieren, Antikörperfärbung, Entwicklungszeiten:

CC 59	5 Minuten
CC 1	10 Minuten
CC 41	15 Minuten
CC 41,15	20 Minuten
GT 52	20 Minuten
CC 10	20 Minuten
CC 41,1	20 Minuten.

Bei *Nereis diversicolor* gibt es keine Bande, die von allen Antikörpern erkannt wird. Aber auch hier entsteht mit CC 59 eine besonders starke Färbung. CC 41,1 zeigt überhaupt keine Reaktion.

3.4 Dot Blots mit den Coelomzell-Antikörpern

1. Antikörper: CC 11; CC 25; CC 41,12; CC 41,13; CC 41,14; CC 41,19; CC 45; CC 45-2; CC 45,14.

Auf der Suche nach einer Erklärung für die trotz langer Entwicklungszeiten sehr schwachen Bandenfärbungen im Westernblot-Versuch, wurde ein Dot Blot durchgeführt, und die so in einem Punkt konzentrierten Proteine wurden mit den verschiedenen Antikörpern inkubiert. Zum einen wurde hierbei überprüft, ob vielleicht die Proteinkonzentration nicht ausreichend war. Zum anderen wurden die Auswirkungen des SDS und des Probenpuffers auf die Proteine untersucht.

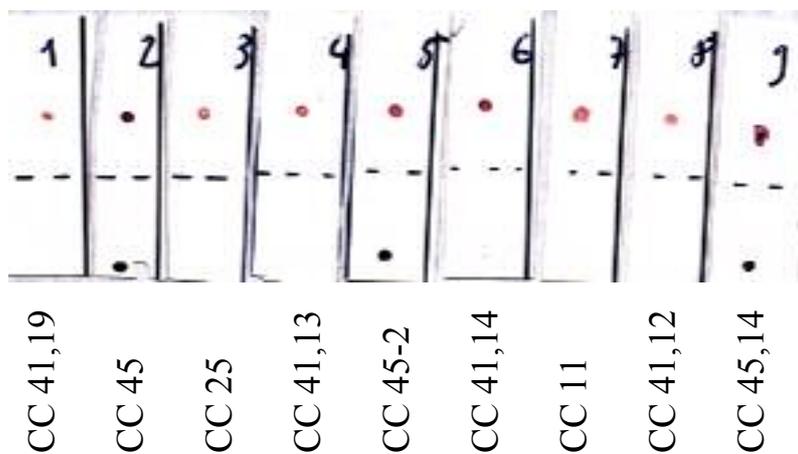


Abb. 36: Dot Blot von Coelomzellen von *Nereis diversicolor* Weibchen, vereinigte Zellsuspension von 5 Tieren, Coelomzellen-Homogenat nativ, oben je 1 μ l, unten je 0,1 μ l aufgetragen, Antikörperfärbung, Entwicklungszeit: 5 Minuten. Bei CC 45, CC 45-2 und CC 45,14 reichen 0,1 μ l des Homogenats aus, um eine Färbung hervorzurufen. 1 μ l Probe zeigt mit jedem der getesteten Antikörper eine Reaktion.

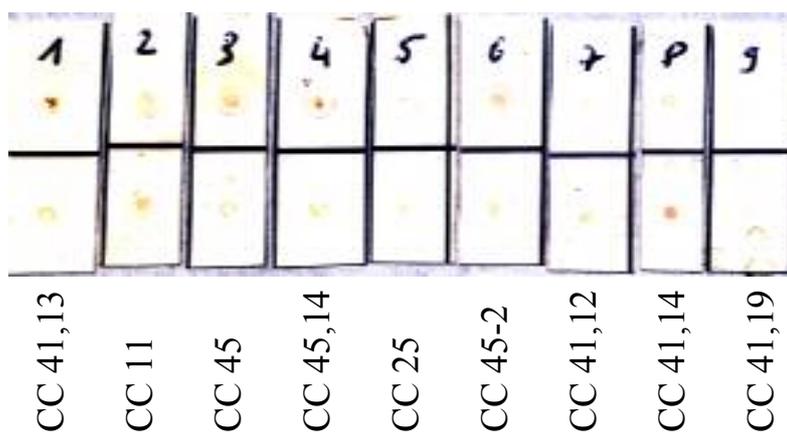


Abb. 37: Dot Blot von *Nereis diversicolor* Weibchen, vereinigte Zellsuspension von 5 Tieren, Coelomzellen-Homogenat oben 1:1 in 4 % SDS-Lösung gemäß Konzentration im Probenpuffer solubilisiert, unten 1:1 mit SDS-PAGE-Probenpuffer (LÄMMLI-Puffer) ohne Bromphenolblau erhitzt, je 1 μ l Homogenat (2 μ l Endvolumen) aufgetragen, Antikörperfärbung, Entwicklungszeit: 5 Minuten. Trotz gleicher aufgetragener Proteinmenge fällt die Färbung nach Behandlung mit SDS bzw. LÄMMLI-Puffer deutlich schwächer aus oder unterbleibt ganz.

2. Antikörper: CC 1; CC 10; CC 13,612; CC 30; CC 41; CC 41,1; CC 41,15; CC 41,20; CC 59; GT 52.

Bei diesen Antikörpern wurde zunächst im Dot Blot getestet, welche für das Westernblot-Experiment geeignet sind. Solche, die nach SDS- bzw. Probenpufferbehandlung der Proteine immer noch eine Färbung hervorriefen wurden dann anschließend mit Westernblot-Teststreifen inkubiert (siehe Abschnitt 3.5).

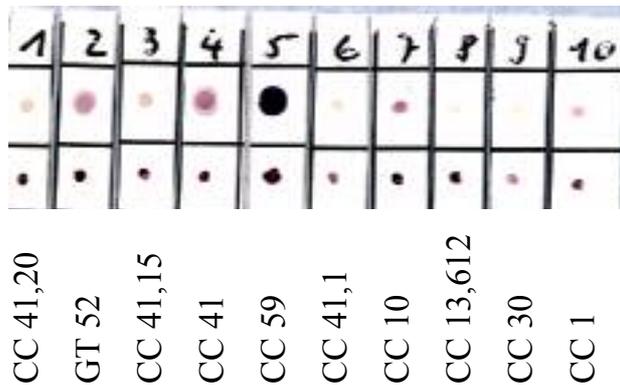


Abb. 38: Dot Blots von Coelomzellen von *Nereis diversicolor* Weibchen, vereinigte Zellsuspension von 5 Tieren, Coelomzellen-Homogenat. Obere Reihe: 1:1 in 4 % SDS-Lösung solubilisiert, je 1 μ l Homogenat (2 μ l Endvolumen) aufgetragen. Untere Reihe: natives Homogenat, je 1 μ l aufgetragen, Entwicklungszeit der Antikörperfärbung: 5 Minuten. Mit Ausnahme von CC 59 zeigen alle Antikörper auf den mit SDS behandelten Proben eine schwächere oder gar keine Reaktion mehr. Die unbehandelte Probe wird hingegen von allen Antikörpern markiert.

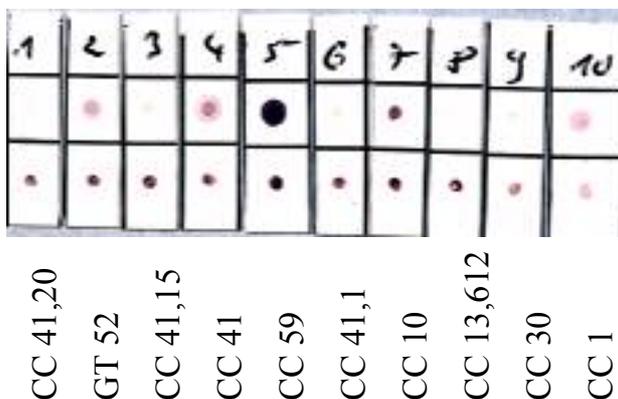


Abb. 39: Dot Blots von Coelomzellen von *Nereis diversicolor* Weibchen, Coelomzell-Homogenat der vereinigten Zellsuspension von 5 Tieren. Oben: 1:1 mit SDS-PAGE-Probenpuffer (LÄMMLI-Puffer) ohne Bromphenolblau erhitzt, je 1 μ l Homogenat (2 μ l Endvolumen) aufgetragen. Unten: natives Homogenat, je 1 μ l aufgetragen, Entwicklungszeit der Antikörperfärbung: 5 Minuten. Das Resultat sieht sehr ähnlich wie das der nur mit SDS behandelten Proben aus.

3.5 Markierung von Oocyten und Elaeocyten mit Vitellin-Antikörpern

Mit dem Vitellin-Antikörper sollten die Dottergranula der Oocyten (Vitellin) und dessen Vorstufe Vitellogenin in den Elaeocyten sichtbar gemacht werden. Es ist bereits bekannt, daß der Vitellin-Antikörper auch Vitellogenin erkennt (FISCHER 1979; BONNIER et al. 1991). Der Nachweis von Vitellogenin in den Elaeocyten gelang jedoch nicht, trotz mehrfacher Variation des Antikörpers (Konzentration, Präadsorption; siehe Abschnitt 2.11.1). Die Vitellingranula der Eizellen hingegen wurden bei relativ kleinen Zellen sichtbar. Ab einem Zelldurchmesser von ca. 50-60 μm war jedoch die Vitellinhülle der Oocyten nicht mehr permeabel für den Antikörper. Nur auf methanolfixierten oder geschnittenen Eizellen ließ er sich auch bei größerem Oocytendurchmesser noch anwenden. Es zeigte sich im Laufe der Versuche, daß der Vitellin-Antikörper eine hohe unspezifische Färbung hervorruft. Deshalb war es nicht möglich, fluoreszierende Strukturen in Elaeocyten eindeutig als Vitellogenin zu identifizieren.

Die folgenden Abbildungen zeigen fixierte Zellen, die mit Anti-Vitellin und Goat-Anti-Rabbit-FITC (grüne Fluoreszenz) behandelt wurden. Außerdem wurden die Zellkerne mit DAPI gefärbt (blaue Fluoreszenz).

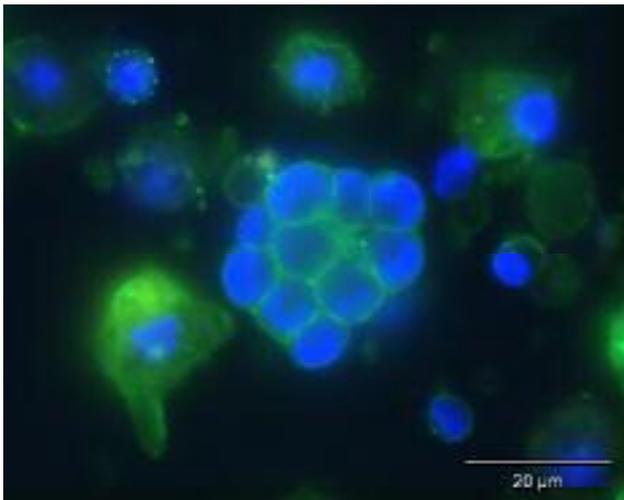


Abb. 40: Markierung einer Coelomzellprobe mit Anti-Vitellin, Kernfärbung mit DAPI, Belichtungszeit: 5s. Oocytenballen zeigen eine schwache Fluoreszenz, vergleichbar mit der der Elaeocyten. Es sind die Membranen der Oocyten markiert. Präparat: *Platynereis dumerilii* Weibchen, Oocytengröße 160 μm .

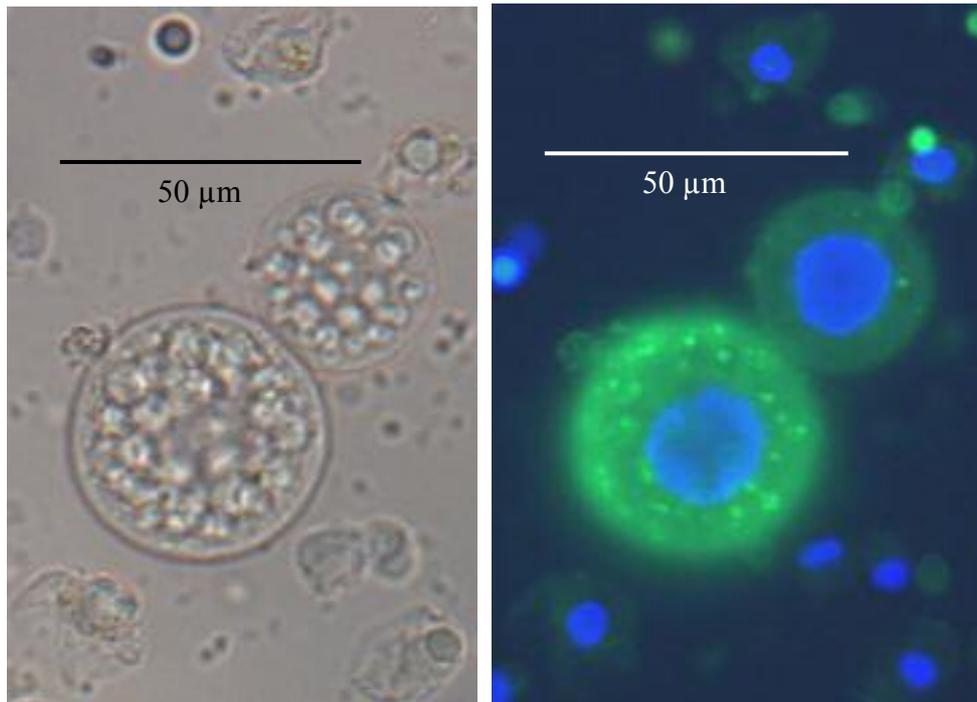


Abb. 41: Markierung von Oocyten mit Anti-Vitellin, Kernfärbung mit DAPI. Die kleine Oocyte rechts im Bild besitzt erst ein Dottergranulum, die etwas größere Oocyte links im Bild hingegen schon einige, so daß sie wesentlich heller fluoresziert. Präparat: *Platynereis dumerilii* Weibchen, Oocytengröße 55 µm. Belichtungszeit der fluoreszenzmikroskopischen Aufnahme: 2s.

Wenn die Eizellen größer werden, verändert sich ihre Permeabilität für Antikörper (mit dem hier angewandten Fixierungsprotokoll: PFA-Fixierung, siehe Abschnitt 2.10.4). Relativ große Oocyten fluoreszieren nicht besonders hell, da die Antikörper nicht bis zu den Dottergranula vordringen können (siehe Abb. 43).

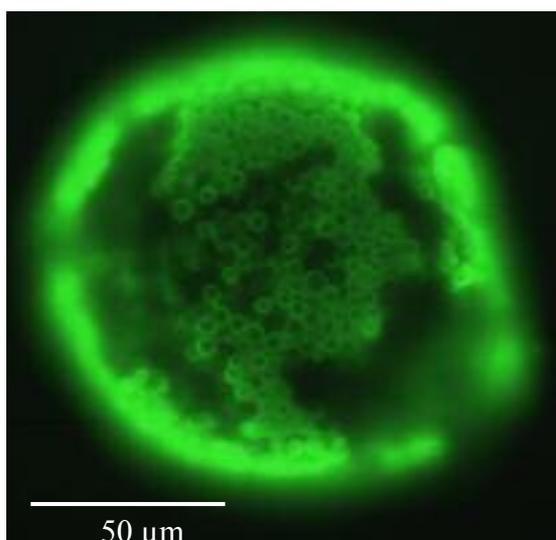


Abb. 42: Markierung einer methanolfixierten Oocyte mit Anti-Vitellin, Belichtungszeit: 49s (aufgenommen mit einer alten Lampe, Zeit daher nicht vergleichbar mit den anderen angegebenen Belichtungszeiten). Bei der Methanolfixierung werden auch die Vitellinhüllen größerer Oocyten so aufgebrochen, daß der Antikörper eindringen und die Vitellingranula anfärben kann. Präparat: *Nereis diversicolor* Weibchen, Oocytengröße 90 µm.

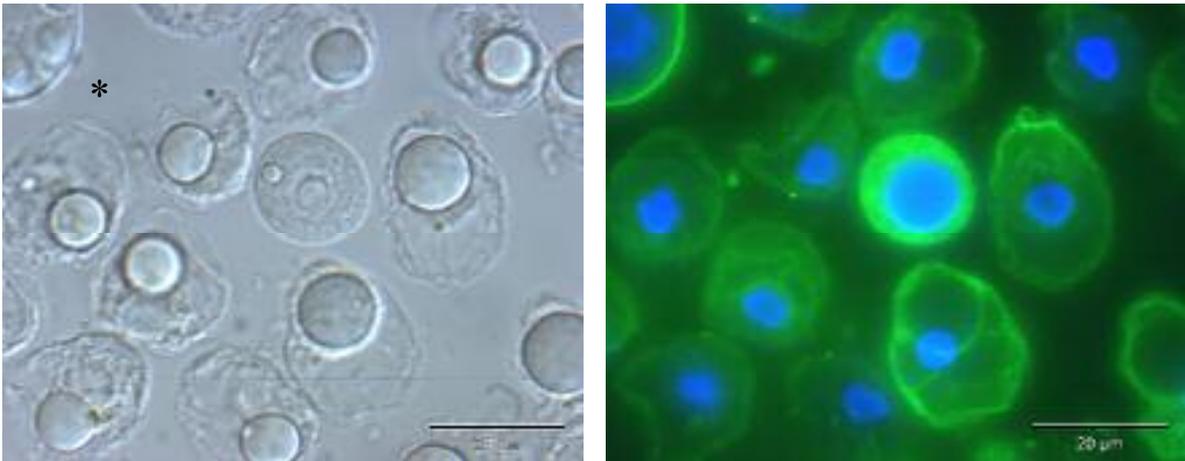


Abb. 43: Markierung einer Coelomzellprobe mit Anti-Vitellin, Kernfärbung mit DAPI. Die kleine Oocyte (Bildmitte) hat ein granuläres, stark fluoreszierendes Cytoplasma. Das Cytoplasma der Elaeocyten sieht ähnlich aus, nur nicht ganz so hell. Die größere Oocyte oben links im Bild (*) hat anscheinend schon eine Antikörper-undurchlässige Hülle ausgebildet. Die Granula im Cytoplasma der Elaeocyten legen das Vorhandensein von Vitellogenin nahe. Die Belichtungszeit ist jedoch länger als bei den Aufnahmen von den Elaeocyten des Männchens (Abb. 44), daher handelt es sich wahrscheinlich auch nur um unspezifische Färbung. Präparat: *Platynereis dumerilii* Weibchen, Oocytengröße 60 µm. Belichtungszeit der fluoreszenzmikroskopischen Aufnahme: 3,5s.

Der primäre Antikörper Anti-Vitellin färbt auch unspezifisch Membranen an. Es werden nicht nur Elaeocyten, sondern auch Sarkolyten markiert (ohne Abb.), bei denen kein Vitell(ogen)in zu erwarten ist. In den Elaeocyten von weiblichen Tieren ist Vitellogenin zu erwarten. Da die Färbung aber nicht wesentlich stärker ist als die der Sarkolyten, handelt es sich hier wohl eher um eine unspezifische Färbung.

Da Vitellin ein weibchenspezifisches Protein ist, wurden Zellen von männlichen Tieren zum Vergleich ebenfalls mit Anti-Vitellin und Goat-Anti-Rabbit-FITC behandelt. Auf diese Weise läßt sich das Ausmaß der unspezifischen Färbung belegen. Es werden nicht nur die Elaeocyten der männlichen Tiere, sondern sogar Spermatocyten angefärbt (Abb. 44).

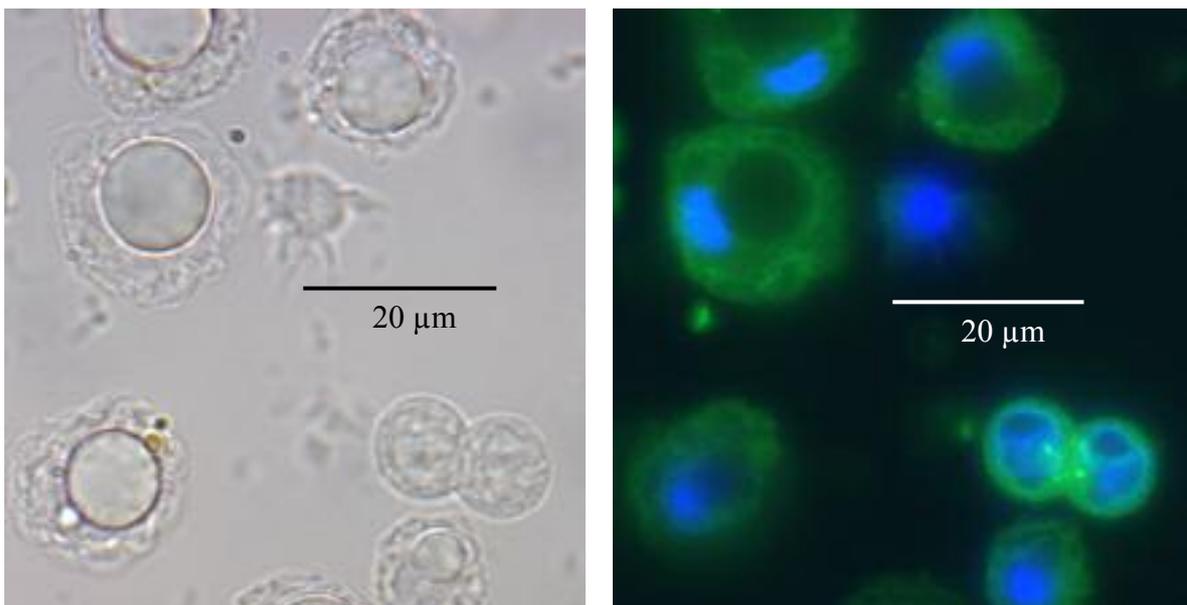


Abb. 44: Markierung einer Coelomzellprobe mit Anti-Vitellin, Kernfärbung mit DAPI. Es sind zwei Spermatocyten zu sehen, die sich gerade teilen, um in das Tetradenstadium überzugehen. Die unspezifische Färbung macht alle Zellen, insbesondere Membranen und Cytoplasma, sichtbar. Präparat: *Platynereis dumerilii* Männchen. Belichtungszeit der fluoreszenzmikroskopischen Aufnahme: 1,5s.

Bei den folgenden Abbildungen (Abb. 45 und Abb. 46) handelt es sich um Aufnahmen von Kryostatschnitten nach Anti-Vitellin/Goat-Anti-Rabbit-FITC-Behandlung. Kryostatschnitte haben gegenüber isolierten Zellen den Vorteil, daß Probleme mit der Permeabilisierung der Zellen entfallen.

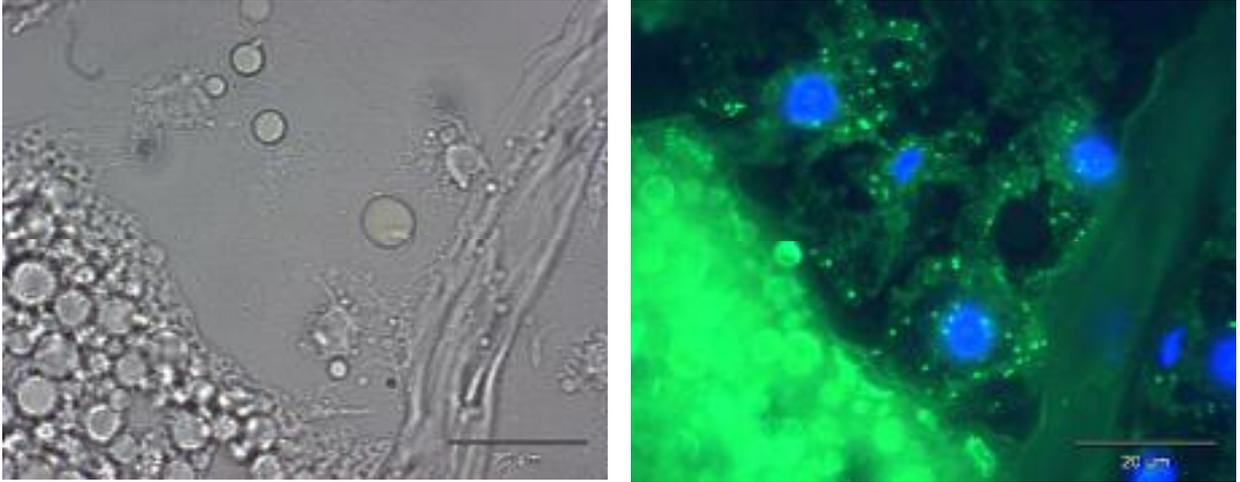


Abb. 45: Kryostatschnitt, Markierung mit Anti-Vitellin, Kernfärbung mit DAPI. Man sieht, daß der Antikörper Anti-Vitellin eine gewisse Spezifität besitzt, denn die Vitellingranula der Oocyten sind deutlich heller angefärbt als das übrige Gewebe. In der Oocyte unten links sind die Vitellingranula sehr schön zu sehen. Die abgebildeten Elaeocyten enthalten ebenfalls stark fluoreszierende kleine Granula, bei denen es sich um Vitellin oder Vitellogenin handeln könnte. Der Muskel (rechts im Bild) enthält keine solchen markierten Partikel. Präparat: *Platynereis dumerilii* Weibchen, Oocytengröße 115 µm. Belichtungszeit des fluoreszenzmikroskopischen Bildes: 3s.

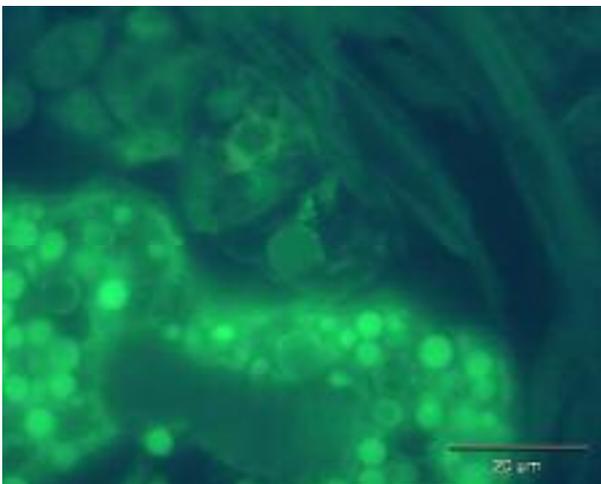


Abb. 46: Kryostatschnitt, Kontrolle *ohne* Anti-Vitellin. Es sollte die unspezifische Färbung durch den sekundären Antikörper sichtbar gemacht werden. Bei kurzer Belichtungszeit (bis 5 Sekunden) war *keine* Fluoreszenz zu sehen, der sekundäre Antikörper scheint also nicht unspezifisch zu binden. Bei längerer Belichtung zeigt sich eine schwach grüne Autofluoreszenz der Vitellingranula. Präparat: *Platynereis dumerilii* Weibchen, Oocytengröße 115 µm. Belichtungszeit: 10s.

3.6 Dot Blot-Versuche mit den Vitellin-Antikörpern

In diesem Versuch sollte getestet werden, welche Vitellin-Konzentration von welchem Antikörper (I-VI, siehe unten) wie stark angefärbt wird und wie stark die unspezifische Färbung des als Kontrollprotein verwendeten BSA im Vergleich dazu ist. Des Weiteren sollte untersucht werden, welche Auswirkungen die Behandlung der Proteine mit PFA-Fixierungsmedium auf die Antikörperfärbung hat. Die folgenden Antikörper-Lösungen wurden hierbei eingesetzt:

- I: Anti-Vitellin 2003: gegen Vitellin, aus Kaninchen, Kaninchenserum 1:5000 verdünnt in PBS, Kaninchen 90 Tage immunisiert, präadsorbiert mit *Nereis virens*-♂-Totalhomogenat
- II: Anti-Vitellin aus Kaninchen, Kaninchenserum 1:50 verdünnt in PBS, Kaninchen 165 Tage immunisiert, präadsorbiert mit *Nereis virens*-♂-Totalhomogenat
- III: Anti-Vitellin wie II, jedoch 1:5000 verdünnt in PBS
- IV: Anti-Vitellin wie II, jedoch nicht präadsorbiert, 1:5000 verdünnt in PBS
- V: Anti-Vitellogenin vom 20.09.1989, nicht präadsorbiert, 1:500 verdünnt in PBS
- VI: Anti-Vitellogenin wie V, jedoch 1:100-1:500 verdünnt in PBS

Es waren folgende Beobachtungen zu verzeichnen (siehe Abb. 47):

Auf der rechten Hälfte der Blotmembran, die mit PFA-Fixierungslösung behandelt wurde, ist bei allen Antikörpern außer bei I eine stärkere Färbung des BSA zu erkennen als auf der unfixierten Blothälfte. Antikörper, von denen das BSA wenig angefärbt wurde, und somit Antikörper mit wenig unspezifischer Bindung sind: I, III und IV. Die größte unspezifische Färbung war bei II zu beobachten. Offensichtlich wird das gereinigte Vitellin auch von den gegen Vitellogenin gerichteten Antikörpern erkannt. PFA hat auf diesem Blot keinen sichtbaren Einfluß auf die Färbung des Vitellins. Das Vitellin ist auf der mit PFA behandelten Hälfte der Blotmembran weder stärker noch schwächer angefärbt als auf der Kontrollhälfte. Nur die unspezifische Färbung wird durch die PFA-Fixierung verstärkt.

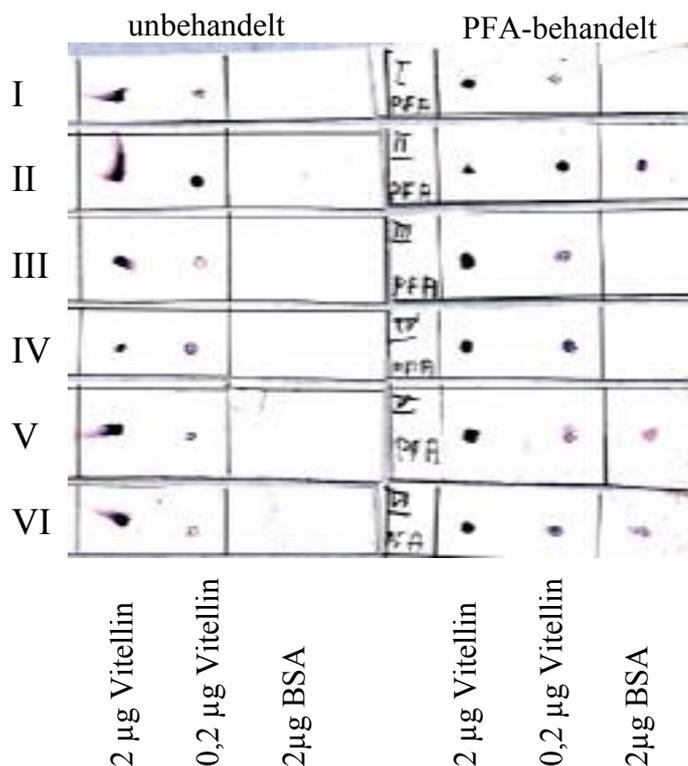


Abb. 47: Dot Blot von gereinigtem *Nereis virens*-Vitellin (jeweils linke Spalte) und zum Vergleich BSA (jeweils rechte Spalte) auf Nitrocellulosemembran nach Inkubation mit verschiedenen Antikörpern (siehe oben). Rechte Hälfte der Membran PFA-fixiert, linke Seite unbehandelt. Entwicklungszeit: 5 Minuten.

3.7 Granuläre Coelomzellen und extrazelluläre Granula

Bei der Untersuchung von Vitellogenin- und Vitellingranula fiel eine Coelomzellpopulation auf, die sich durch einen hohen Gehalt an Granula auszeichnete. Wie sich bei weiterführenden Untersuchungen herausstellte, zeigen diese Granula im Gegensatz zu den Vitellingranula der Oocyten eine starke rote Fluoreszenz. Von daher handelt es sich hierbei mit großer Wahrscheinlichkeit nicht um Vitellogenin- oder Vitellingranula. Trotzdem erschienen mir diese Zellen interessant.

Diese Zellen kommen zwischen den Elaeocyten vor. Sie entsprechen von ihrer Größe und Form den Elaeocyten, besitzen jedoch weder deren charakteristische Vakuole noch einen großen Lipidtropfen. Statt dessen scheinen sie mit granulärem Material gefüllt. Abb. 48 zeigt zum Vergleich eine „normale“ Elaeocyte und eine granuläre Coelomzelle. Derartige Coelomzellen kommen bei Weibchen und Männchen vor, sind jedoch im Vergleich zu den Elaeocyten wesentlich seltener. Sie sind durch ihre Größe und Form auch eindeutig von den Granulocysten zu unterscheiden.



Abb. 48: Beispiele von sogenannten „granulären“ Coelomzellen, die neben den normalen Elaeocyten in der Coelomflüssigkeit von *Platynereis dumerilii* gefunden wurden. a: Weibchen, Oocytengröße 65 µm, Tag 2 nach Dekapitierung hinter dem Pharynx, b: Männchen, Tag 3 nach Dekapitierung hinter dem Pharynx.

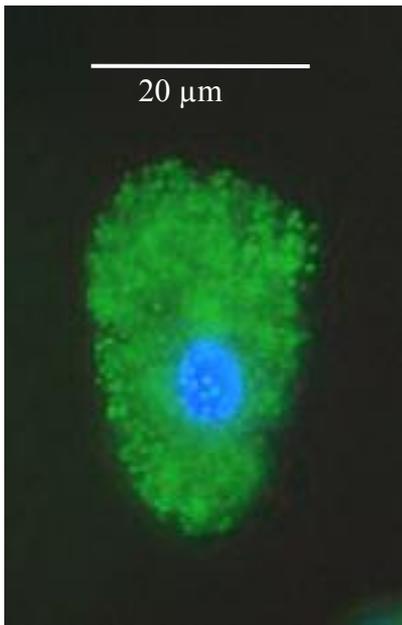


Abb. 49: Markierung einer granulären Coelomzelle mit Anti-Vitellin und Goat-Anti-Rabbit-FITC, Kernfärbung mit DAPI. Diese Zelle von Größe und Gestalt einer Elaeocyte besitzt wie die oben beschriebenen granulären Zellen keine Vakuole und keinen Lipidtropfen. Das gesamte Zellvolumen ist mit kleinen Granula gefüllt, die von Anti-Vitellin erkannt werden. Präparat: *Platynereis dumerilii* Weibchen, Oocytengröße 115 µm. Belichtungszeit: 9s.

Für die folgenden fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen dieser granulären Coelomzellen (Abb. 68 und 69) wurde eine Doppelmarkierung durchgeführt. Als primäre Antikörper wurden Anti-Vitellin aus Kaninchen und CC 41,14 aus Mäusen verwendet. Als sekundäre Antikörper dienen Goat-Anti-Rabbit-FITC (grün) und Goat-Anti-Mouse-Alexa 546 (rot). Die Zellkerne wurden außerdem mit DAPI angefärbt.

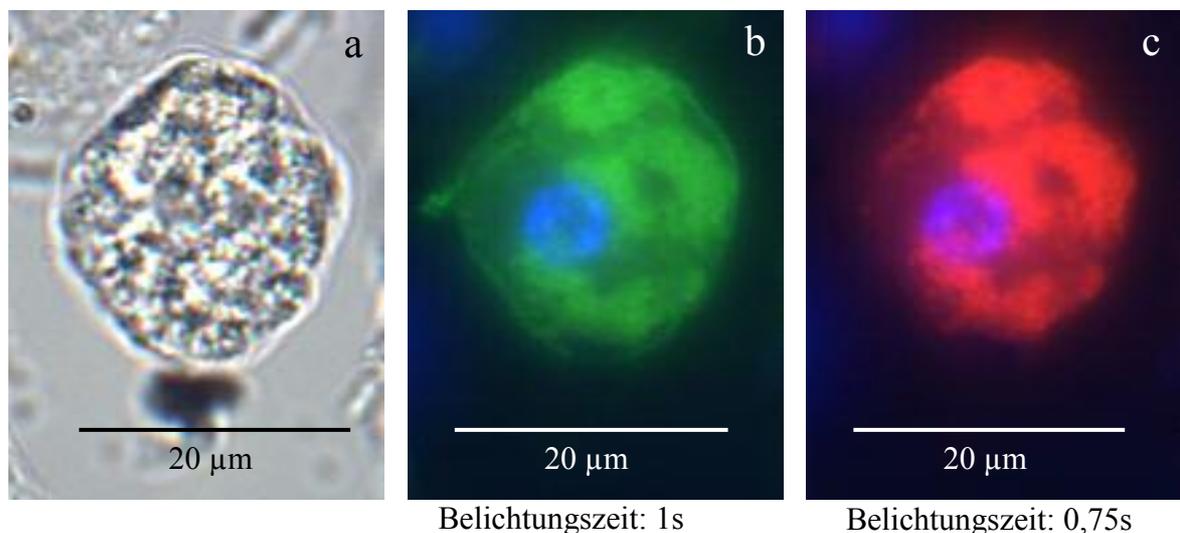


Abb. 50: Markierung granulärer Strukturen in einer granulären Coelomzelle von *Platynereis dumerilii*. Zellkernfärbung mit DAPI. a: im Lichtmikroskop, b: Markierung mit Anti-Vitellin, c: Markierung mit CC41,14. Herkunft der Probe: Weibchen mit Oocytensballen. Die in den Zellen enthaltenen Granula wurden sowohl durch den Vitellin-Antikörper als auch durch den Coelomzell-Antikörper CC 41,14 markiert.

Bei einigen Zellen reichern sich die auffälligen Einschlüsse in einer Aussackung am Rand der Zelle an, im übrigen Cytoplasma kommen sie nur noch vereinzelt vor. Die Belichtungszeit von 5 Sekunden (Abb. 51c und d), bei der fluoreszenzmarkierte Strukturen in Elaeocyten normalerweise gut sichtbar werden, mußte für die akkumulierten Granula, zumindest bei roter Fluoreszenz, auf 1 Sekunde herabgesetzt werden (Abb. 51b), da das Bild sonst überstrahlt wurde. Eine Belichtungszeit von nur 1 Sekunde reicht für eine Fluoreszenzmarkierung „normaler“ Elaeocyten in der Regel nicht aus.

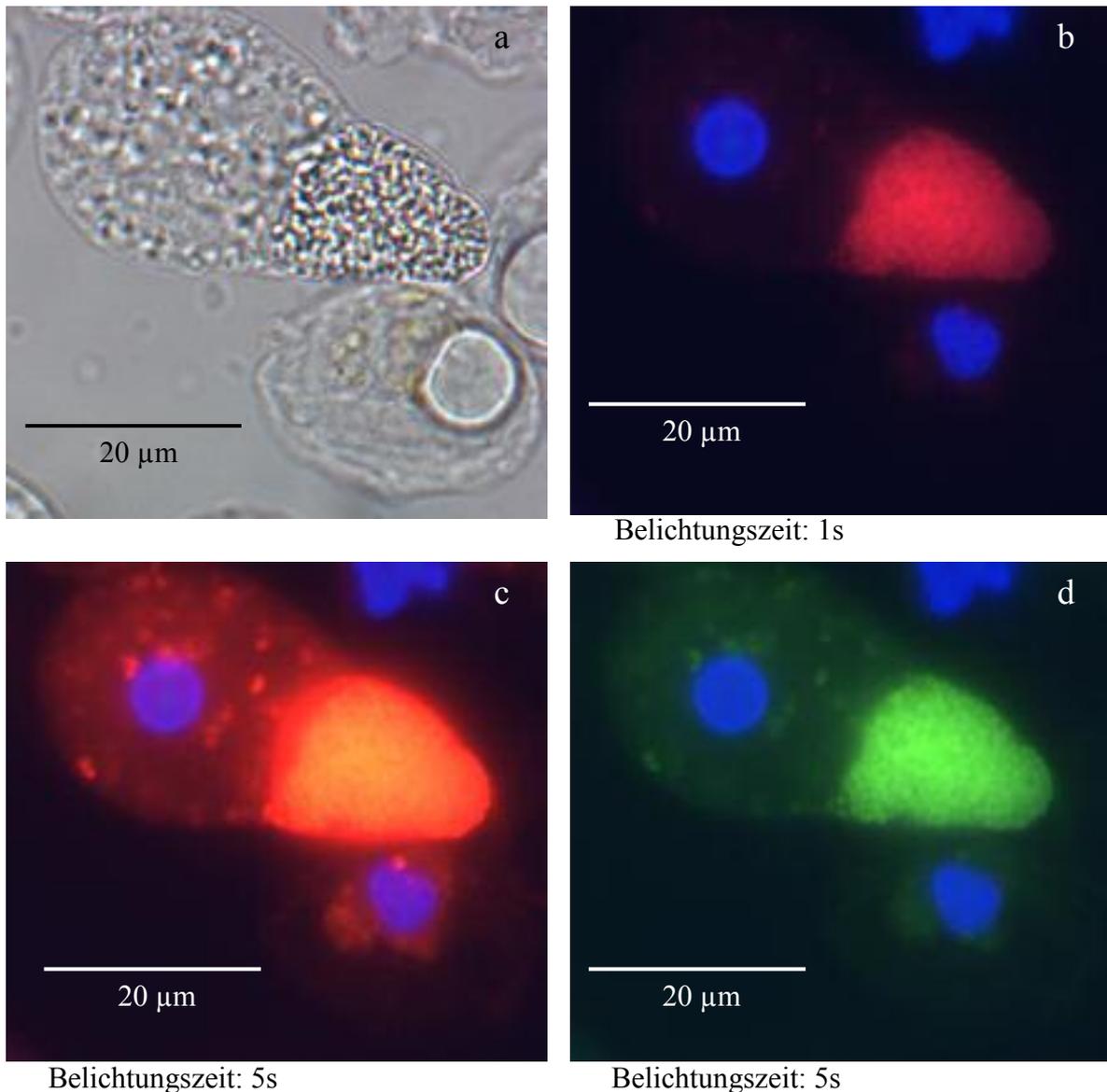


Abb. 51: Markierung granulärer Strukturen in einer granulären Coelomzelle von *Platynereis dumerilii*. Die Coelomprobe stammte aus einem Weibchen mit Oocytengröße 55 µm, Zellkernfärbung mit DAPI. a: im Lichtmikroskop, b und c: Markierung mit CC 41,14, d: Markierung mit Anti-Vitellin

Auch außerhalb von Zellen sind immer wieder einzelne oder auch in Ballen vorkommende stark fluoreszierende, kugelförmige, kernlose Granula zu finden. Möglicherweise handelt es sich um dasselbe Material in anderer Verteilung. Die Behandlung mit Anti-Vitellin und Goat-Anti-Rabbit-FITC sowie CC 41,14 und Goat-Anti-Mouse-Alexa 546 liefert für diese Granula folgende Beobachtungen (ohne Abb.):

- freie Granula, die in der Größe leicht variieren, eine grün fluoreszierende Hülle besitzen und zum Teil mit rot fluoreszierendem Material gefüllt sind, zum Teil aber auch hohl erscheinen. Insgesamt sind sie deutlich größer als die intrazellulären Granula.
- in Ballen vorkommende, in der Größe einheitliche Granula, die ebenfalls extrazellulär vorkommen und sowohl grün als auch rot massiv fluoreszieren. Diese Kügelchen sind ebenfalls deutlich größer als die intrazellulären Granula. Wie bei den intrazellulären Granula muß auch hier die Belichtungszeit stark verkürzt werden, um die Strukturen erkennen zu können.
- herausragend helle Fluoreszenz der Ballen im Vergleich zu den umliegenden Oocyten und Elaeocyten.

3.8 Vergleich der Fixierungsmethoden

Wie sich bei den Zellpräparaten herausstellte, waren die Elaeocyten nach der Methanolfixierung noch nicht ausreichend durchlässig für die verwendeten Antikörper und Fluoreszenzfarbstoffe. Es war daher zusätzlich noch eine Behandlung mit Protease K und/oder einem Detergens nötig. Ein weiterer Nachteil der Methanolfixierung besteht darin, daß die für Elaeocyten charakteristischen Lipidtropfen und teilweise auch intrazelluläre Membrankompartimente aufgelöst werden. Bei Formaldehydfixierung hingegen bleiben Lipidtropfen und Membranen erhalten. Die beste Erhaltung wurde mit Paraformaldehydfixierung erreicht, da diese Fixierungslösung bereits ein Detergens enthält und in ihrer Osmolarität an Seewasser angepaßt ist.

Die Fluoreszenz war bei methanolfixierten Zellen stärker als bei formaldehyd- oder paraformaldehydfixierten Zellen. Am besten war die Fluoreszenz an unfixierten Zellen (in Kryostatschnitten) zu sehen, die allerdings in der Regel sehr schlecht erhalten waren. Da für meine Fragestellung die Strukturerhaltung aber sehr wichtig war, habe ich trotzdem die Paraformaldehydfixierung vorgezogen.

3.9 Elaeocytengrößen bei dekapitierten Tieren und Kontrolltieren

Um eine eventuelle Veränderung in der Größe der Elaeocyten als Reaktion auf die Entfernung des Kopfes (und damit des Gehirns) quantitativ zu bestimmen, wurden dekapitierte und nicht dekapitierte Tiere isoliert über eine längere Zeitspanne gehalten. Täglich wurde eine Probe des Coelominhalts genommen, digital fotografiert, und die Zellen wurden vermessen (siehe Abschnitt 2.5). In den folgenden Grafiken ist jeweils die Häufigkeit von Zellen der verschiedenen Größenklassen (Klassengröße 3 μm) für jeden Stichprobentag aufgetragen. Zur besseren Vergleichbarkeit hat jeder Tag in allen Diagrammen die gleiche Farbe.

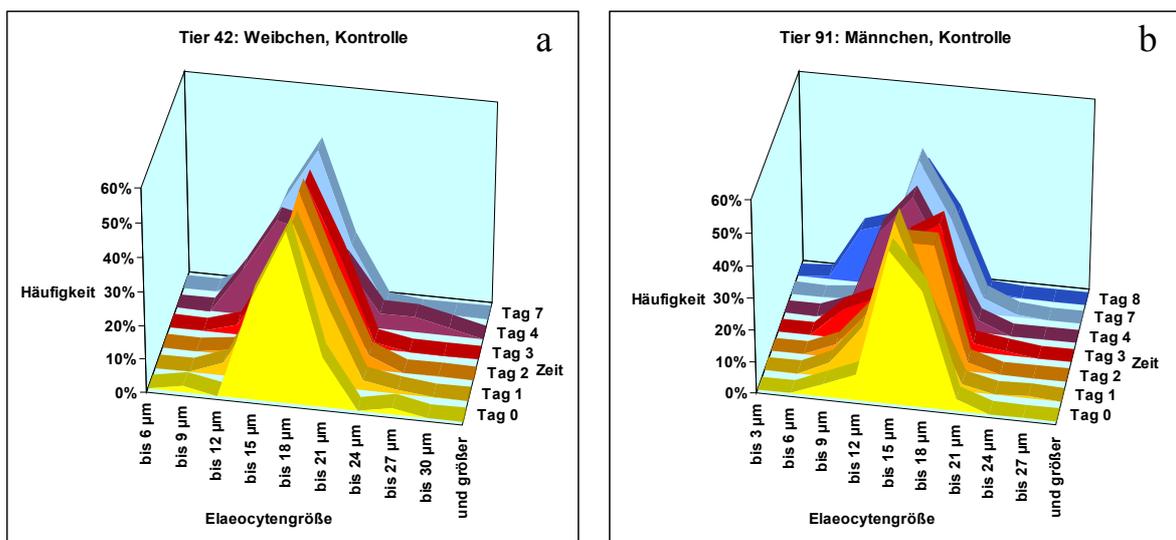


Abb. 52: Elaeocytengrößenverteilung bei nicht dekapitierten Tieren. a: Dieses weibliche Kontrolltier zeigt eine gleichbleibende Größenverteilung der Zellen. b: Dieses männliche Kontrolltier zeigt eine annähernd konstante Zellgrößenverteilung, abgesehen von ein paar Schwankungen

Andere weibliche Kontrolltiere (ohne Abb.) zeigten eine Tendenz hin zu kleineren Zellen, das Maximum lag anfangs bei bis 24 μm bzw. bis 21 μm und am Tag 7 bei bis 15 μm bzw. bis 18 μm . Andere männliche Kontrolltiere (ohne Abb.) verhielten sich ähnlich oder zeigten eine leichte Tendenz zu kleiner werdenden Zellen (von Maximum bei 18 μm auf Maximum bei 15 μm).

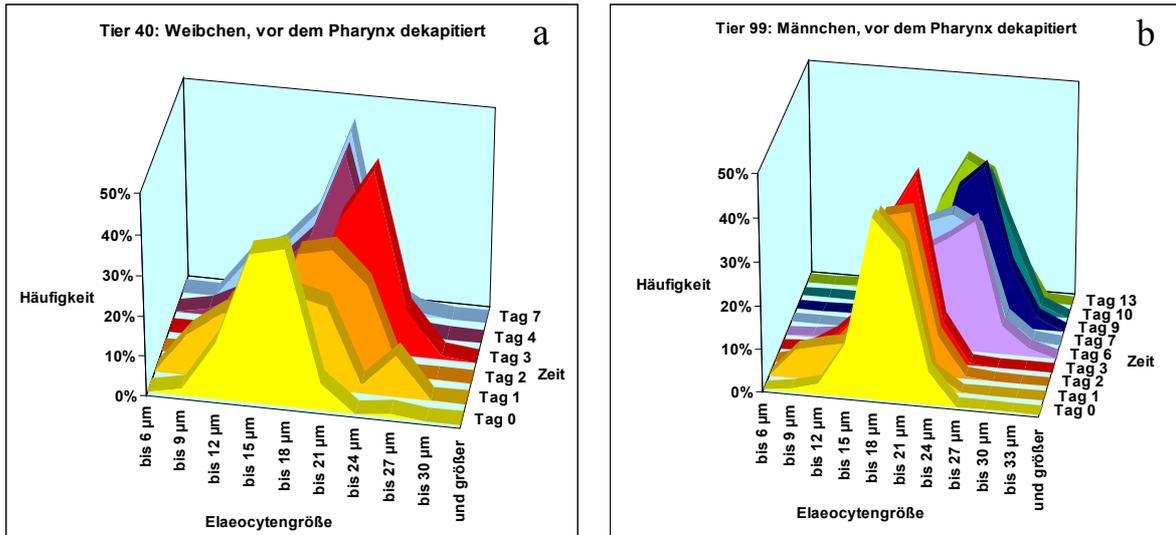


Abb. 53: Elaeocytengrößenverteilung bei *vor* dem Pharynx dekapitierten Tieren. a: Bei diesem Weibchen fällt auf, daß die Zellgröße zunächst kontinuierlich zunimmt, ab Tag 4 wieder etwas abnimmt und bis zum Tag 7 konstant bleibt (keine Probe für Tag 5 und 6). b: Die Elaeocyten von diesem vor dem Pharynx dekapitierten Männchen nehmen mit der Zeit an Größe zu. Vor allem zwischen Tag 3 und Tag 6 ist eine beachtliche Größenzunahme zu verzeichnen.

Bei den anderen gleich behandelten weiblichen Tieren (ohne Abb.), hatte sich die Größenverteilung ebenfalls in den ersten 3 Tagen nach rechts verschoben oder ist zumindest gleich geblieben. Ab Tag 4 war in allen Fällen eine Verschiebung nach links festzustellen, die sich bis Tag 7 fortsetzte oder dann konstant blieb.

Die anderen vor dem Pharynx dekapitierten Männchen (ohne Abb.) zeigten bis Tag 3 noch keine wesentliche Größenzunahme, ab Tag 6 lag das Maximum jedoch auch hier 1-2 Größenklassen höher.

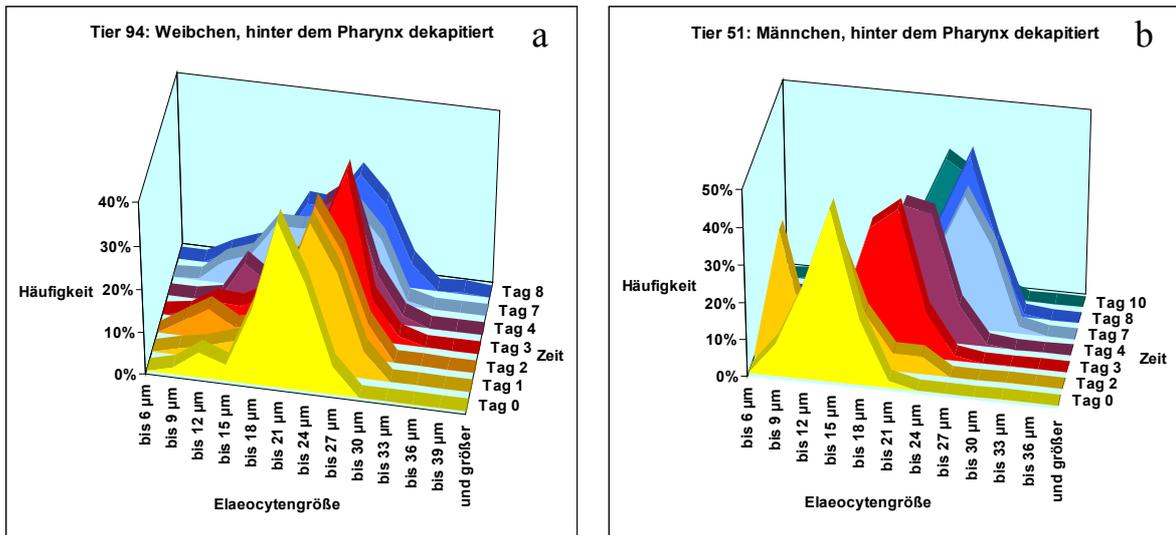


Abb. 54: Elaeocytengrößenverteilung bei *hinter* dem Pharynx dekapitierten Tieren. a: Bei diesem Weibchen, das hinter dem Pharynx dekapitiert wurde, verschiebt sich das Maximum im Laufe der Zeit immer weiter nach rechts. Gleichzeitig entstehen im Bereich der kleinen Zellen neue kleinere Maxima. b: Dieses hinter dem Pharynx dekapitierte Männchen zeigt eine relativ schnelle Größenzunahme der Elaeocyten.

Bei gleich behandelten anderen weiblichen Tieren (ohne Abb.) war auch eine kontinuierliche klare Tendenz zu größer werdenden Zellen zu erkennen. Das Maximum der Verteilung stieg von 18 bzw. 21 μm auf 27 μm .

Auch bei den anderen hinter dem Pharynx dekapitierten Männchen (ohne Abb.) war eine deutliche Zunahme in der Elaeocytengröße zu beobachten. In einem Fall erreichte der Zelldurchmesser ein Häufigkeitsmaximum bei 36 μm , einzelne Zellen erreichten einen Durchmesser von über 42 μm .

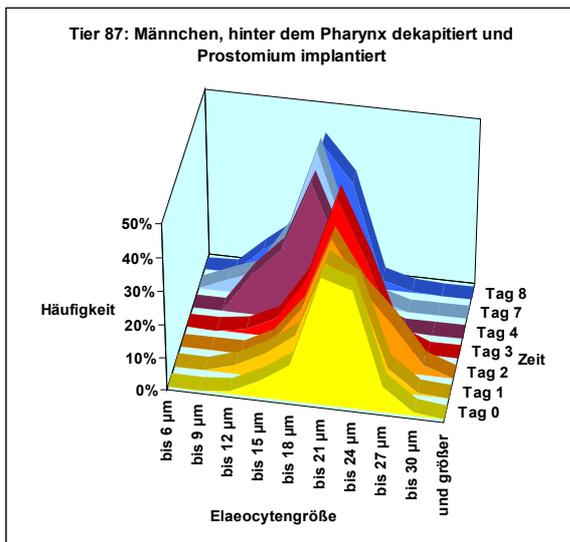


Abb. 55: Elaeocytengrößenverteilung. Dieses Männchen wurde hinter dem Pharynx dekapitiert, zur Kontrolle wurde aber das Prostomium (mit Gehirn) in die Leibeshöhle implantiert, wo es weiterhin seine neuroendokrinen Funktionen ausführen kann. Bis Tag 3 blieb die Elaeocytengröße annähernd konstant, ab Tag 4 war die Verteilung um eine Größenklasse nach links verschoben.

Die anderen ebenso behandelten männliche Tiere (ohne Abb.) zeigten ebenfalls zumindest bis Tag 2 etwa gleich bleibende Größenverteilungen und danach eine eindeutige Verschiebung hin zu kleineren Zellen. In den meisten Fällen war allerdings keine Beobachtung über einen längeren Zeitraum möglich, da die Tiere nach wenigen Tagen starben oder zumindest das Implantat abstießen. Eine Zusammenfassung der Beobachtungen zeigt Tabelle 3.

Geschlecht	Behandlung	Beobachtung an den Elaeocyten
Weibchen	Kontrolle	konstante oder abnehmende Größe
Weibchen	vor dem Pharynx dekapitiert	erst Größenzunahme, ab Tag 4 wieder Abnahme
Weibchen	hinter dem Pharynx dekapitiert	Größenzunahme
Männchen	Kontrolle	konstante oder abnehmende Größe
Männchen	vor dem Pharynx dekapitiert	erst konstante Größe, ab Tag 3-4 (spätestens 6) Größenzunahme
Männchen	hinter dem Pharynx dekapitiert	Größenzunahme
Männchen	hinter dem Pharynx dekapitiert und Prostomium implantiert	erst konstante Größe, ab Tag 3-4 Größenabnahme

Tabelle 3: Übersicht über die Veränderungen in der Elaeocytengrößenverteilung bei dekapitierten Tieren und Kontrolltieren.

3.10 Vergrößerte Elaeocyten („Riesen“elaeocyten)

Vor allem bei Männchen, die hinter dem Pharynx dekapitiert worden sind, aber auch bei Männchen, die vor dem Pharynx dekapitiert wurden und bei Weibchen, die hinter dem Pharynx dekapitiert worden sind, treten nach etwa einer Woche auffallend große Elaeocyten auf (siehe auch Abschnitt 3.11). Zunächst habe ich versucht, im Lichtmikroskop Unterschiede zwischen diesen „Riesen“elaeocyten und normalen Elaeocyten aufzudecken. Dabei habe ich besonders auf die für Elaeocyten typischen, ins Auge fallenden Merkmale Lipidtropfen und Vakuole geachtet. Aber auch alle sonstigen Besonderheiten wurden festgehalten. Die „Riesen“elaeocyten nehmen eine annähernd kugelförmige Gestalt an und besitzen eine Vakuole, die fast das gesamte Zellvolumen einnimmt. Das Cytoplasma ist nur noch als schmaler Rand erkennbar. Neben diesen vergrößerten Elaeocyten kommen jedoch auch weiterhin Elaeocyten von normaler Größe vor. Am Tag 8 bzw. Tag 10 nach Dekapitierung (Abb. 57) hat das Zellvolumen stark zugenommen, so daß der Lipidtropfen im Vergleich zur Gesamtzellgröße klein erscheint. Der Vergleich mit normalen Elaeocyten (Abb. 56) läßt erkennen, daß auch die absolute Größe des Lipidtropfens abgenommen hat.



Abb. 56: lichtmikroskopisches Bild von normalen Elaeocyten. Die runden Lipidtropfen und das etwas körnige Cytoplasma erscheinen grün, die Vakuolen der Zellen sind als blässere Flächen erkennbar. Vor der Dekapitierung des Tieres besitzen die Zellen einen Lipidtropfen, der im Vergleich zur Gesamtzellgröße relativ groß ist. Vakuole und Cytoplasma erscheinen klar und durchsichtig, es sind kaum größere Einschlüsse zu sehen. Präparat: *Platynereis dumerilii* Weibchen, Oocytengröße 95 µm, Tag 0, nicht dekapitiert.

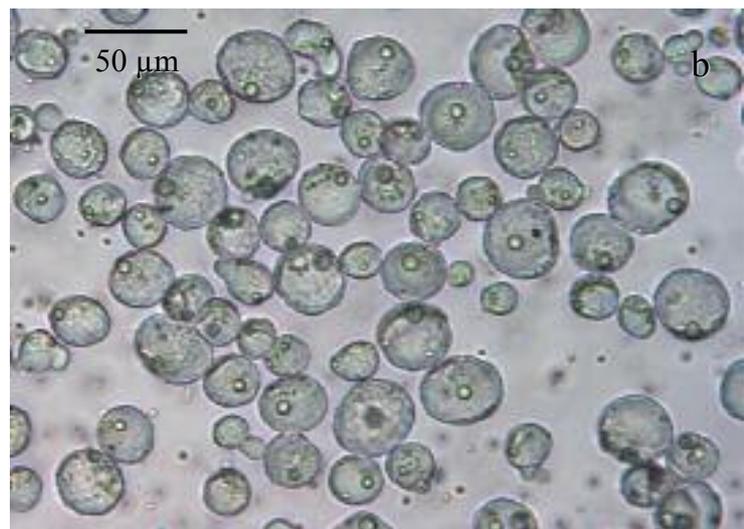
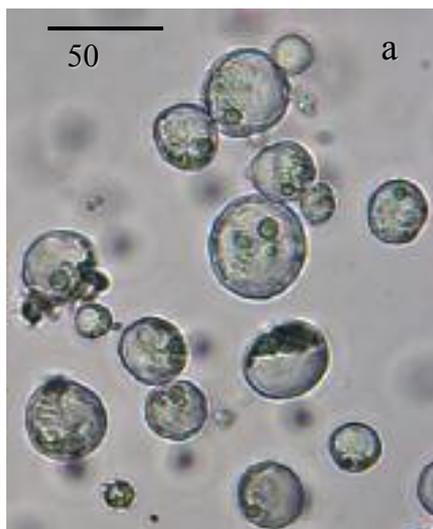


Abb. 57: lichtmikroskopische Aufnahmen von vergrößerten Elaeocyten. a: *Platynereis dumerilii* Männchen, Tag 8 nach Dekapitierung hinter dem Pharynx. Außer vergrößerten Elaeocyten kommen auch solche von normaler Größe vor. b: Elaeocytenprobe von einem *Platynereis dumerilii* Männchen, Tag 10 nach Dekapitierung hinter dem Pharynx, „Riesen“elaeocyten und normal große Elaeocyten. Man beachte die Größe der Lipidtropfen und die Ausmaße der Vakuolen. Hierin unterscheiden sich diese Elaeocyten (auch die von normaler Größe) von denen in Abb. 56.

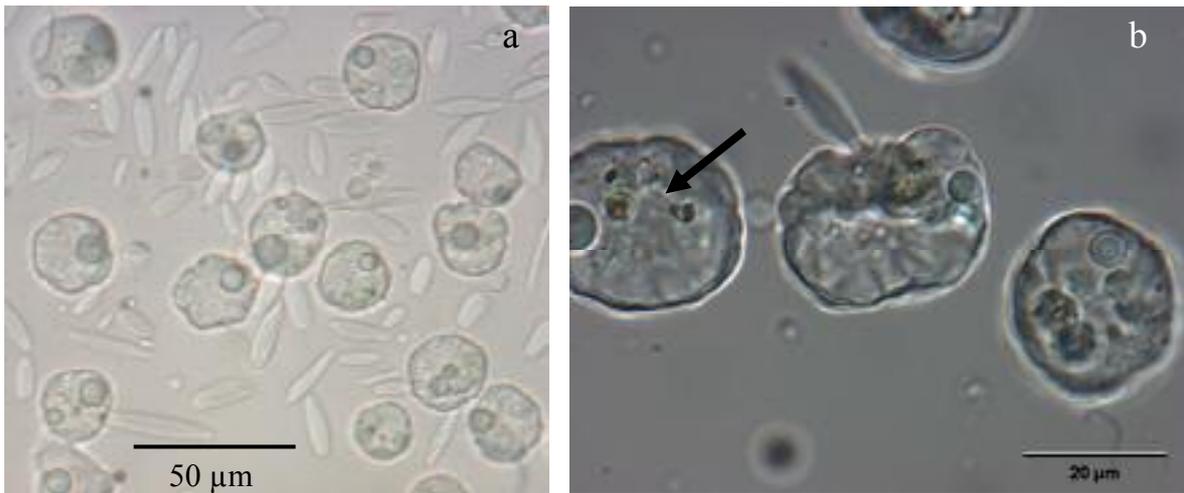


Abb. 58: a: *Platynereis dumerilii* Weibchen, Oocytengröße 65 µm, Tag 5 nach Dekapitierung hinter dem Pharynx, lichtmikroskopische Aufnahme. Auffällig sind viele Sarkolyten, die von den Elaeocyten phagocytiiert werden. Es sind bereits einige Einschlüsse in den Zellen erkennbar. b: *Platynereis dumerilii* Weibchen, Oocytengröße 65 µm, Tag 5 nach Dekapitierung hinter dem Pharynx, lichtmikroskopische Aufnahme mit Interferenzkontrast. Um den Kern herum angeordnete Einschlüsse (Pfeil); Elaeocyte, die gerade einen Sarkolyten phagocytiiert (Bildmitte).



Abb. 59: a und b: *Platynereis dumerilii* Weibchen, Oocytengröße 65 µm, Tag 5 nach Dekapitierung hinter dem Pharynx, lichtmikroskopische Aufnahmen mit Interferenzkontrast. Im Cytoplasma sind viele Einschlüsse zu erkennen, die bei normalen Elaeocyten nicht auftreten. Teilweise handelt es sich eindeutig um Sarkolyten, die von der Zelle inkorporiert worden sind und in Nahrungsvakuolen verdaut werden. Eine weitere Auffälligkeit bilden kreisförmig um den Zellkern angeordnete mehr oder weniger kugelförmige Strukturen (siehe Pfeile).

3.11 Färbung von *Elaeocyten* mit Acridinorange und MDY-64

Um weitere Unterschiede zwischen „Riesen“elaeocyten und normalen *Elaeocyten* festzustellen, wurden die Zellen mit Acridinorange und dem Membranfarbstoff MDY-64 gefärbt und sowohl unter dem Fluoreszenzmikroskop als auch am konfokalen Mikroskop betrachtet. Besondere Beachtung galt dabei der Vakuole und den schon im Lichtmikroskop sichtbaren intrazellulären Einschlüssen.

Die Zellkerne werden durch Acridinorange grün angefärbt, da es sich um einen DNA-interkalierenden Farbstoff handelt. Saure Vakuolen färben sich orange bis rot, bei anderen pH-Werten können auch Gelb- oder Grüntöne auftreten. Die Färbung beruht dabei auf der (pH-abhängigen) Bildung von Farbstoffmolekül-Komplexen (LEE und EPEL 1983). Membranen werden durch MDY-64 grün sichtbar. Die Lipidtropfen erscheinen bei Verwenden von Filtersatz 1 (UV-Anregung, siehe Abschnitt 2.13) blau. Eventuell sind darin lipophile Pigmente enthalten, die durch die energiereiche Strahlung (UV-Licht) angeregt werden.

1. normale *Elaeocyten*

Die meisten *Elaeocyten* besitzen eine große, saure Vakuole. Bei den Zellen, in denen kein rot gefärbtes Kompartiment zu sehen ist, hat die Vakuole entweder keinen sauren pH-Wert, oder aber sie ist ganz verloren gegangen, was bei lebenden, isolierten Zellen häufiger vorkommt.

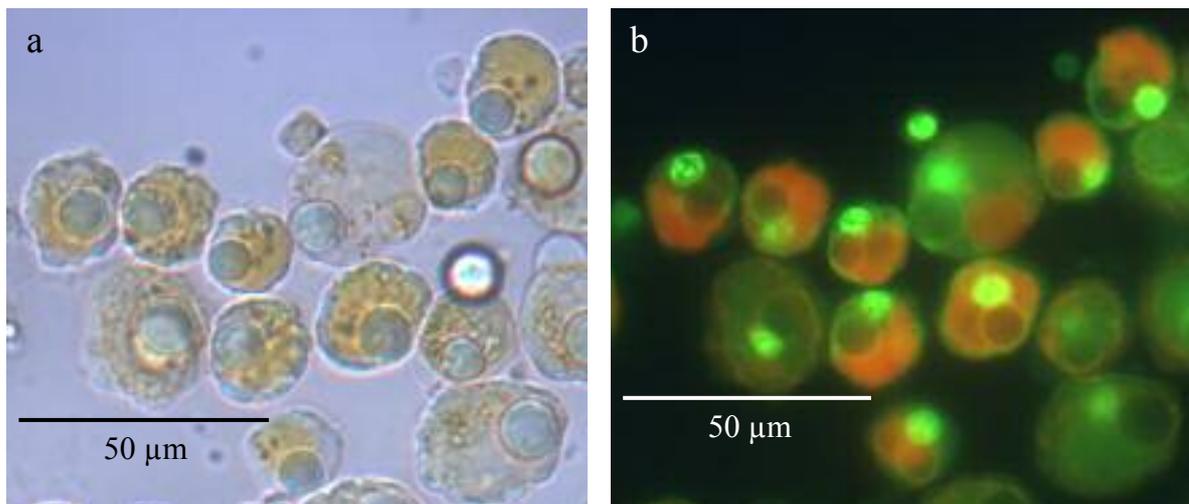


Abb. 60: normale *Elaeocyten*, Färbung mit Acridinorange und MDY-64. a: lichtmikroskopische Aufnahme, b: Aufnahme mit Filtersatz 2 (siehe Abschnitt 2.13). Präparat: *Platynereis dumerilii* Weibchen, Oocytengröße 80 µm.

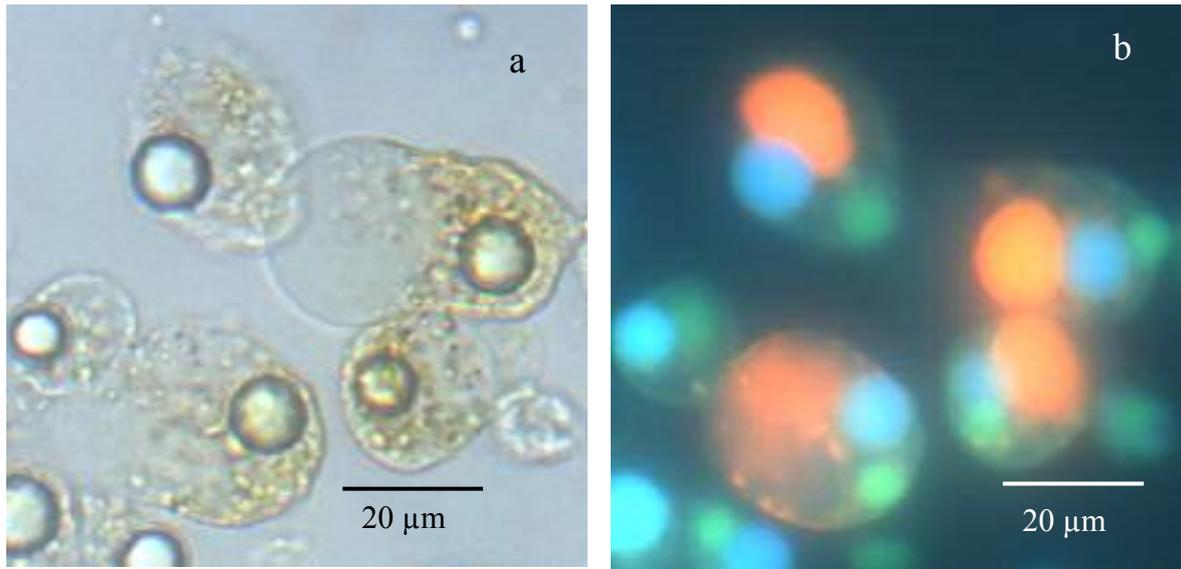


Abb. 61: normale Elaeocyten, Färbung mit Acridinorange und MDY-64. a: lichtmikroskopische Aufnahme, b: Aufnahme mit Filtersatz 1 (siehe Abschnitt 2.13), Präparat: *Platynereis dumerilii* Weibchen, Oocytengröße 80 µm.

2. „Riesen“elaeocyten:

Bei den vergrößerten Elaeocyten ist 8 Tage nach der Dekapitierung meistens keine große mit Acridinorange rot anfärbbare Vakuole mehr zu sehen. Deren pH-Wert hat sich also verändert, und/oder die Vakuole ist verloren gegangen. Es sind aber kleinere Nahrungsvakuolen in verschiedenen Farbtönen von grün über gelb und orange bis hin zu rot zu sehen. Teilweise ist eindeutig die Form und Struktur von phagozytierten Sarkolyten zu erkennen (s. Abb. 63d).

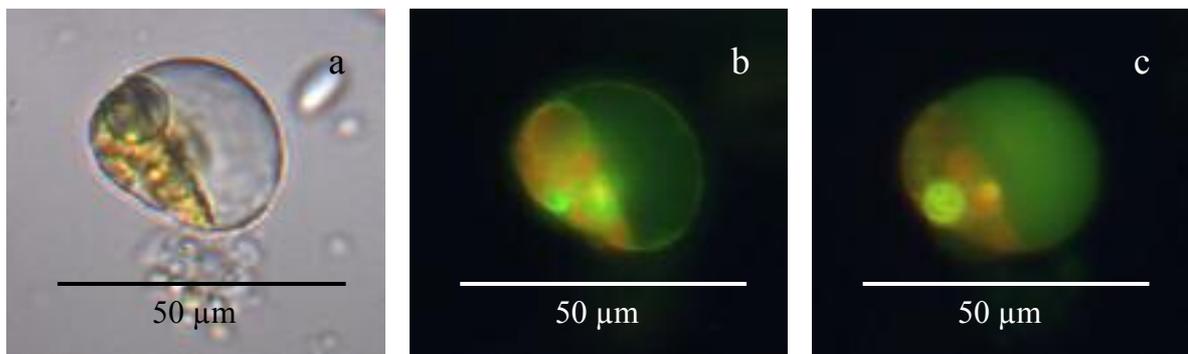


Abb. 62: vergrößerte Elaeocyte, Färbung mit Acridinorange und MDY-64. a: lichtmikroskopische Aufnahme, b und c: Aufnahme mit Filtersatz 2 (siehe Abschnitt 2.13). Auf der rechten Seite der Zelle liegt eine große Vakuole, die jedoch nicht durch Acridinorange rot angefärbt wird. Bild b und c sind in verschiedenen Ebenen aufgenommen, bei c ist der Zellkern zu sehen, bei b der Lipidtropfen. Einschlüsse und Nahrungsvakuolen aufgrund unterschiedlicher pH-Werte in den verschiedensten Farben. Präparat: *Platynereis dumerilii* Weibchen, Oocytengröße 50 µm, Tag 8 nach Dekapitierung hinter dem Pharynx.

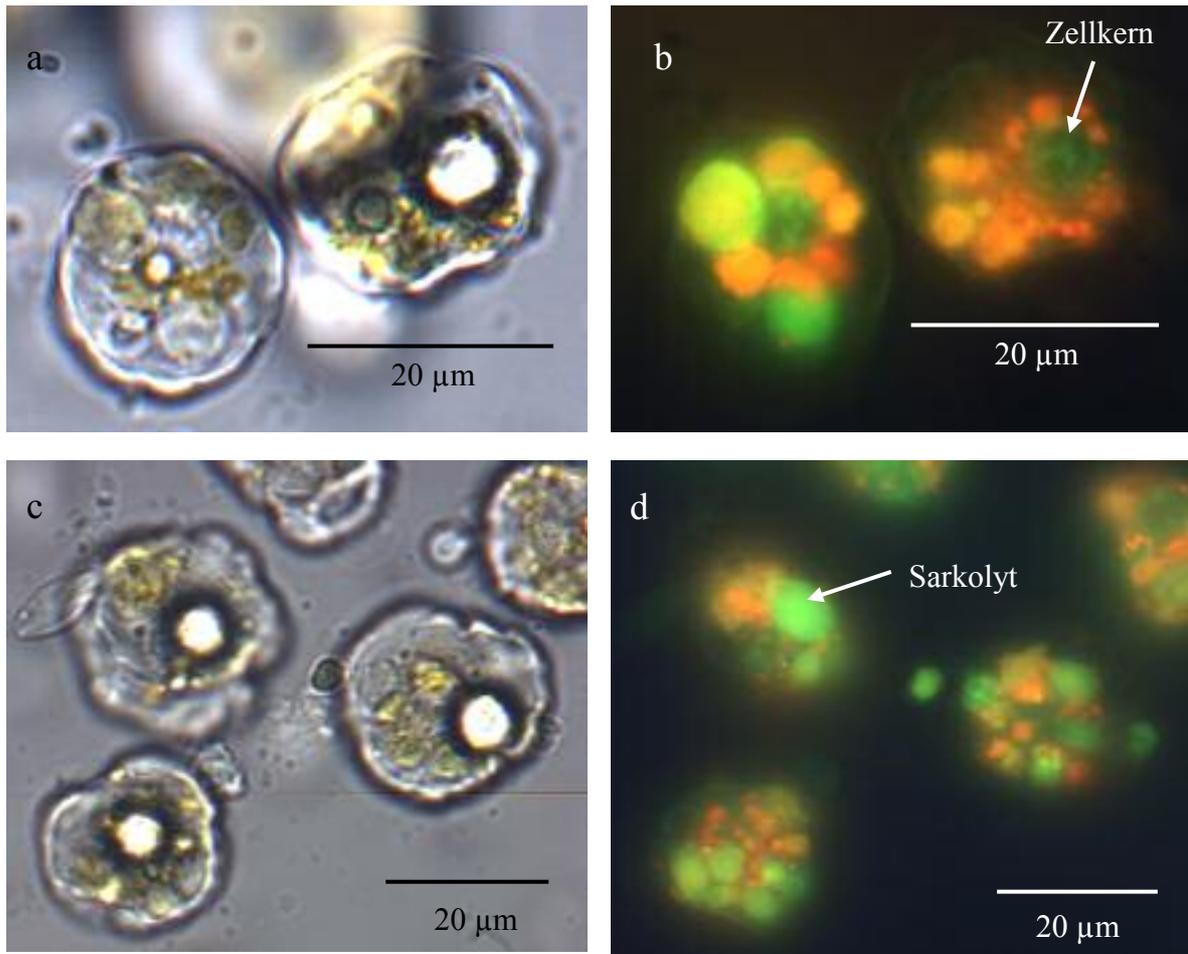


Abb. 63: vergrößerte Elaeocyten, Färbung mit Acridinorange und MDY-64. a: lichtmikroskopische Aufnahme, b: Aufnahme mit Filtersatz 2 (siehe Abschnitt 2.13), c: lichtmikroskopische Aufnahme, d: Aufnahme mit Filtersatz 2. Die Struktur der Sarkolyten ist besonders gut zu sehen. Präparat: *Platynereis dumerilii* Weibchen, Oocytengröße 50 µm, Tag 8 nach Dekapitierung hinter dem Pharynx.

Laserscanmikroskopie

Bei den mit Laserscanmikroskop betrachteten Elaeocyten war zum Teil noch eine große, saure Vakuole zu finden. Dieses orange bis hellrot gefärbte Kompartiment verschwand aber oft noch während der Scanaufnahmen. Innerhalb von Sekundenbruchteilen verlor die Vakuole zunächst ihre Farbe und wurde dann von der Zelle ausgestoßen. Teilweise ist noch der ehemalige Platz der Vakuole als Umriß zu sehen, oder diese ist noch vorhanden, nur nicht mehr gefärbt. Außerdem sind isolierte Vakuolen zwischen den Zellen zu finden. Die betrachteten vergrößerten Elaeocyten enthalten oft viele Nahrungsvakuolen, die hier meist in dunkelrot zu sehen sind. Der Zellkern hingegen ist grün gefärbt.

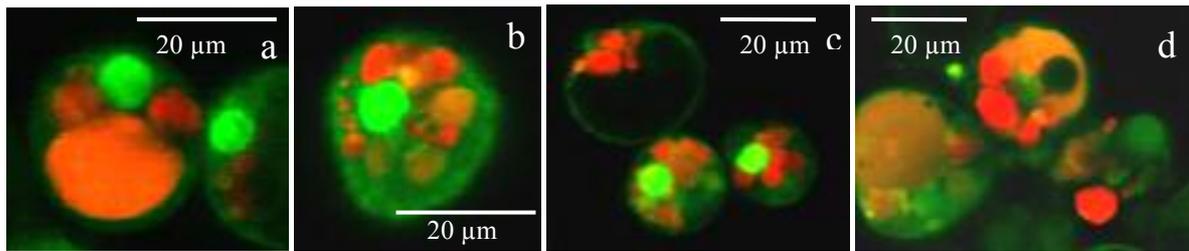


Abb. 64: vergrößerte Elaeocyten, Färbung mit Acridinorange und MDY-64, Aufnahmen am Laserscanmikroskop. a: Die Zellkerne von zwei nebeneinander liegenden Elaeocyten treten jeweils grün hervor, in der linken Zelle ist eine große, saure Vakuole in hellrot zu sehen. Die beiden dunkelroten Kompartimente sind Nahrungsvakuolen. b: Nahrungsvakuolen mit unterschiedlichem pH-Wert (gelb, orange und rot) rund um den Kern herum, c: dunkelrote Nahrungsvakuolen in der Nähe des Kernes, große Vakuole farblos, d: große Vakuole orange, Nahrungsvakuolen rot. Präparat: Elaeocyten von *Platynereis dumerilii* Weibchen, Oocytengröße 50 µm, Tag 9 nach Dekapitierung hinter dem Pharynx.

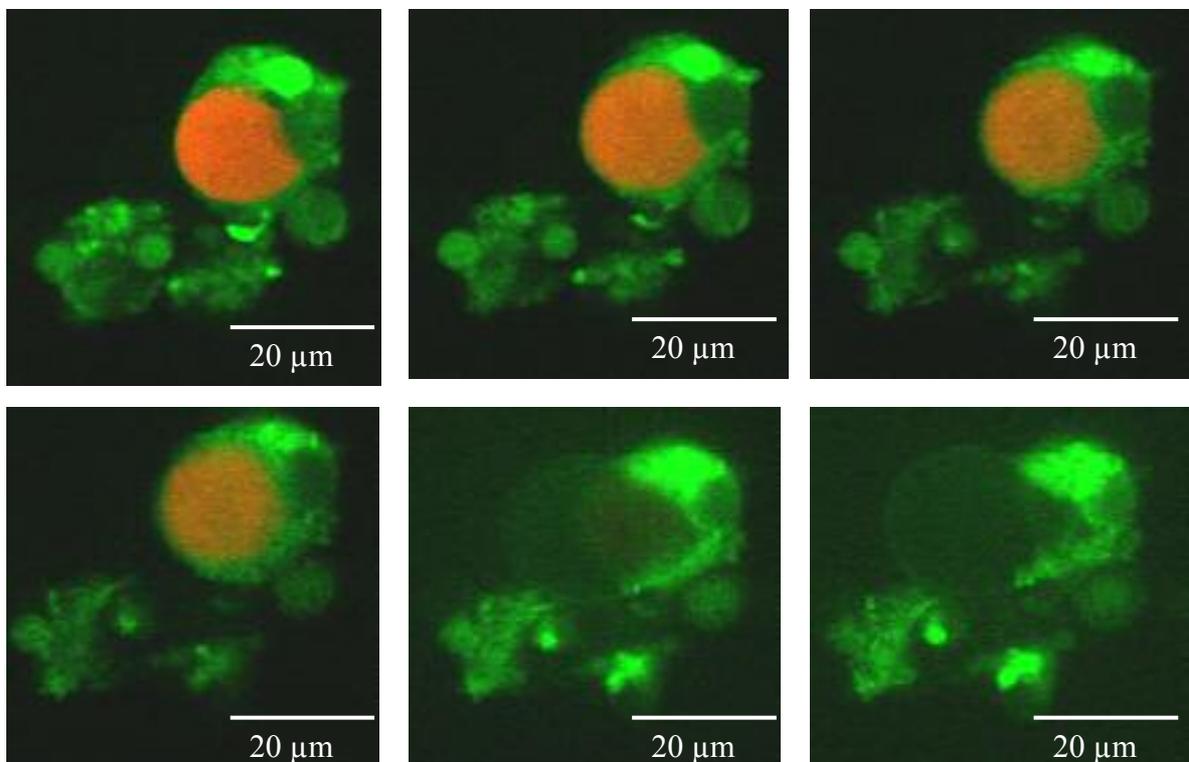


Abb. 65: vergrößerte Elaeocyten, Färbung mit Acridinorange und MDY-64, Serie von Aufnahmen am Laserscanmikroskop. Die Aufnahmen sind zeitlich nacheinander (im Abstand von ca. 4s) und räumlich in aufeinanderfolgenden Ebenen (Ebenendicke 2µm) aufgenommen worden. Man sieht, daß die Vakuole zunächst verblaßt und dann die Zelle verläßt. Präparat: Elaeocyten von *Platynereis dumerilii* Weibchen, Oocytengröße 50 µm, Tag 9 nach Dekapitierung hinter dem Pharynx.

3.12 Autofluoreszenz bei *Platynereis dumerilii* Elaeocyten

Abb. 66 wurde am konfokalen Mikroskop aufgenommen. Die fixierten Zellen wurden mit Anti-Vitellin und CC 41,14 inkubiert sowie mit entsprechenden sekundären Antikörpern, so daß die von Anti-Vitellin angefärbten Strukturen grün (FITC) und die mit CC 41,14 markierten Strukturen rot (Alexa 546) fluoreszieren. Die unspezifischen Färbereigenschaften von Anti-Vitellin wurden zur Membranmarkierung genutzt. Deutlich heller als die Membranen sind jedoch die Vitellingranula in der Oocyte gefärbt. Als dunkle Aussparung sind in der Oocyte der Kern und einige Lipidtropfen zu erkennen. In den Elaeocyten sind rot fluoreszierende Strukturen rund um den Zellkern herum anzutreffen. Hierbei handelt es sich um eine Autofluoreszenz, denn der Fluoreszenzfarbstoff Alexa 546 ist bei Bestrahlung mit Laserlicht sehr instabil und bleicht innerhalb von Sekunden aus. Die hier sichtbare rote Fluoreszenz ist jedoch bei Laserbelichtung stabil, es ist über mehrere Minuten hinweg keine Abschwächung der Fluoreszenz zu beobachten. Zellen, die mit CC 41,14 und einem sekundären Antikörper mit grünem Fluoreszenzfarbstoff behandelt wurden, zeigten keine grüne Fluoreszenz in der Region um den Kern herum. Wie sich später herausstellte, sind die rot fluoreszierenden Strukturen auch bei Zellen zu sehen, die nicht mit CC 41,14 behandelt worden sind (nur mit sekundärem Antikörper als Kontrolle) und sogar auch bei solchen, die nicht fluoreszenzfarbstoffmarkiert waren. Die Autofluoreszenz ist bei Weibchen und Männchen zu beobachten.

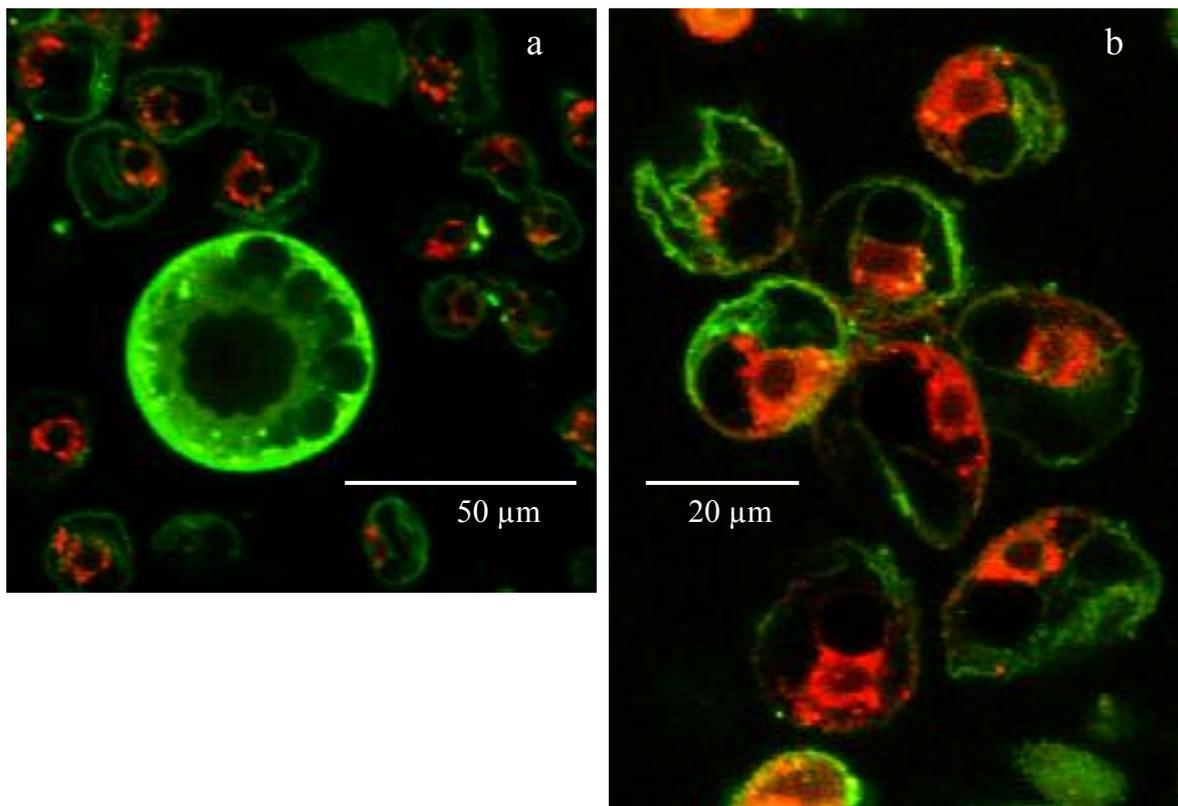


Abb. 66: Oocyte und Elaeocyten, Markierung mit Anti-Vitellin und CC 41,14; Aufnahmen am konfokalen Mikroskop. a: Oocyte mit Vitellingranula und Elaeocyten mit roter Autofluoreszenz, b: Elaeocyten mit roter Autofluoreszenz. Die Rotfluoreszenz des sekundären Antikörpers gegen CC41,14 ist bereits ausgebleicht. Präparat: *Platynereis dumerilii* Weibchen, Oocytengröße 55 µm.

Auch im normalen Fluoreszenzmikroskop kann man bei entsprechend langer Belichtungszeit (5-10 Sekunden) die rote Autofluoreszenz beobachten. Hier wurden die Kerne mit einer DAPI-Färbung sichtbar gemacht, und es bestätigt sich, daß die rot fluoreszierenden Strukturen um den Kern herum lokalisiert sind. Auch hier wurde Anti-Vitellin (und Goat-Anti-Rabbit-FITC) verwendet, um mit Hilfe der unspezifischen Färbung die Zellgrenzen sichtbar zu machen. Die Zellen sind außerdem mit CC 41,14 und Goat-Anti-Mouse-Alexa 546 behandelt worden. Wie oben erläutert, ist jedoch anzunehmen, daß die rote Fluoreszenz nicht vom Farbstoff Alexa 546 stammt, sondern daß es sich um eine Autofluoreszenz handelt.

4 Diskussion

4.1 *Elaeocytenproliferation*

MAHLEIN (1991) hatte in seiner Arbeit unter Anwendung der Bromdesoxyuridinmethode festgestellt, daß bei dekapitierten *Platynereis dumerilii* auffällig viele Mitosen beiderseits des dorsalen Blutgefäßes auftreten. Da mit der Dekapitierung auch eine drastische Erhöhung der Elaeocytenzahl einhergeht, lag die Vermutung nahe, daß es sich bei den Zellteilungen um eine Proliferation von Elaeocyten handelt. Ich habe Längsschnitte von dekapitierten und nicht dekapitierten *Platynereis dumerilii* angefertigt und vor allem die Region des dorsalen Blutgefäßes nach Zellproliferationszonen abgesucht. Dabei stellte sich heraus, daß auf den hier untersuchten Schnitten das Dorsalgefäß nur selten überhaupt in Kontakt mit Elaeocyten zu sehen ist. Es waren hier keine Hinweise auf eine Proliferationszone zu finden. Auffällig war lediglich ein dichter Besatz von Elaeocyten rund um die segmental beidseitig in das dorsale Blutgefäß einmündenden Dorsoparapodialgefäße (Abb. 7).

In der Arbeit von DHAINAUT (1970) wurde schon einmal die Entstehung von Elaeocyten bei *Nereis pelagica* näher beschrieben. Demnach befindet sich die Bildungszone an den parapodialen Blutgefäßen. Die Blutgefäße der Polychaeten werden vom Coelothel gebildet, das Lumen wird dabei von der Basalmembran der Coelothelzellen und einer darunterliegenden Faserschicht begrenzt und nicht von einem Endothel ausgekleidet. Laut DHAINAUT (1970) befinden sich die entstehenden Elaeocyten eingestreut zwischen den die Gefäßwand bildenden Peritonealzellen und berühren mit ihrer Basalmembran direkt die das Gefäßlumen begrenzenden Fasern. Die heranwachsenden Elaeocyten sind zunächst massiv und strecken sich zylinderförmig immer mehr in die Länge. Nachdem sie Glycogengranula, Lipidtröpfchen und eine Vakuole gebildet haben, lösen sie sich schließlich vom Blutgefäß ab, um sich freischwimmend in der Coelomflüssigkeit weiterzuentwickeln. Diese Beobachtungen stimmen im Wesentlichen mit denen von DEHORNE und DEFRETIN (1933) überein, abgesehen von der Tatsache, daß die Elaeocyten nicht wie von den letzteren Autoren beschrieben mittels langer Stiele am Gefäß verankert bleiben, sondern als freie Zellen im Coelom flottieren.

In Querschnitten durch dekapitierte und nicht dekapitierte *Platynereis dumerilii* fand ich bei mehreren Tieren in der Region des dorsalen Parapodienansatzes eine Zone, die ganz zu der Beschreibung von DHAINAUT (1970) bzw. DEHORNE und DEFRETIN (1933) paßt (Abb. 16). Es waren massive, noch relativ flache, dicht nebeneinander und direkt dem Blutgefäß aufliegende Zellen zu finden (Abb. 17a). Des weiteren waren oft zylinderförmige, mit homogenem Cytoplasma gefüllte Zellen zu beobachten (Abb. 17b), die oft schon eine kleine Vakuole gebildet hatten. Diese befand sich bei der Mehrzahl der in diesem Stadium befindlichen Zellen proximal zum Blutgefäß, während der Kern sich im distalen Zellbereich aufhielt (Abb. 17b, Abb. 18, Abb. 19). In einigen Fällen war aber auch bei mehreren benachbarten Zellen jeweils distal die Vakuole und proximal der Kern anzutreffen (Abb. 12).

Es wäre vorstellbar, daß die Vakuole zunächst proximal zum Gefäß entsteht, mit der Zeit immer mehr an Volumen zunimmt und dann durch den Druck der benachbarten Zellen in den distalen Teil gedrängt wird. Dort ist dann eine weitere Größenzunahme möglich. Das Ablösen vom Blutgefäß könnte durch zwei zusammenwirkende Mechanismen geschehen: Zum einen steigt der Druck, den die benachbarten, ebenfalls wachsenden Zellen ausüben. Zum anderen zieht die sich enorm vergrößernde Vakuole die Zelle aus dem Verband heraus. An manchen Stellen scheint sich gerade ein solcher Ablösevorgang zu vollziehen. In diesen Fällen sieht es tatsächlich so aus, als sei die Elaeocyte mit einem Stiel am Blutgefäß verankert (Abb. 19).

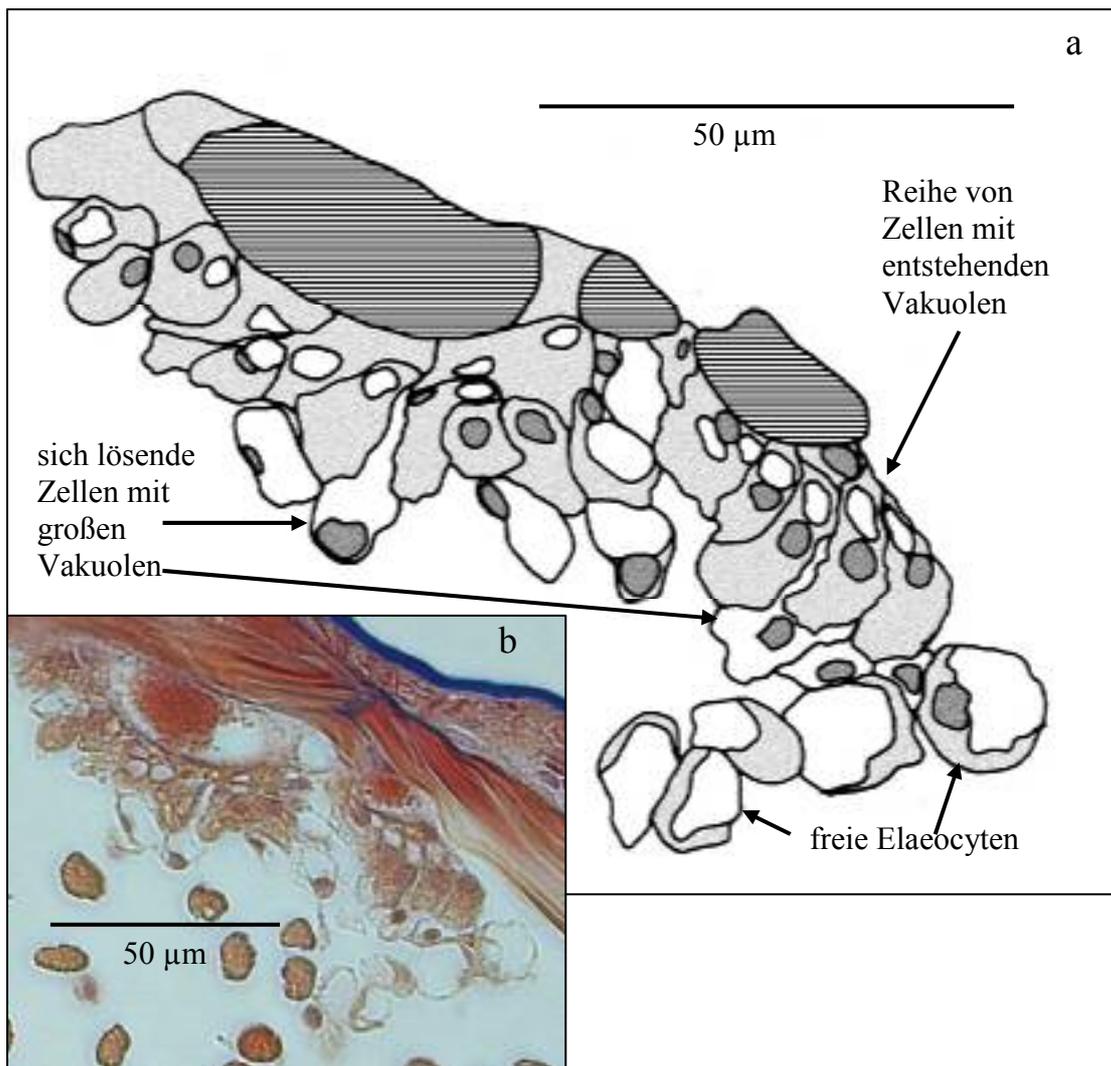


Abb. 67: a: Schemazeichnung von der Proliferationszone am dorsalen Parapodienansatz; waagrecht schraffiert: Lumen des Blutgefäßes, dunkelgrau: Zellkerne, hellgrau: Cytoplasma, Vakuole weiß. Besonders schön zu sehen sind die bei benachbarten Zellen parallel entstehenden kleinen Vakuolen proximal zum Blutgefäß (rechts im Bild). Der Kern liegt distal vom Blutgefäß, und die Zellen bilden eine langgestreckte, zylinderähnliche Form aus. b: Originalaufnahme derselben Stelle, Methacrylat-Dünnschnitt, Azanfärbung nach Heidenhain, Präparat: *Platynereis dumerilii* Männchen, 2 Tage vor der Fixierung dekapitiert.

Man kann nicht unbedingt davon ausgehen, daß die Proliferation der Elaeocyten bei anderen Polychaeten auf dieselbe Art und Weise und an derselben Stelle erfolgt. Bei *Nicolea zostericola* (Polychaeta: Terebellidae) (ECKELBARGER 1976) beispielsweise entstehen die mit Elaeocyten vergleichbaren agranulären Amöbocyten an zwei spezifischen Stellen im lateralen somatischen Coelothel eines jeden Segments des vorderen Körperbereichs (thorakale Segmente und wenige abdominale Segmente). Ähnlich wie bei den Elaeocyten der untersuchten Nereididen bilden sich traubenförmige Zellkonfigurationen, aus denen sich die Zellen herauslösen und zu frei flottierenden Coelomzellen werden. Auch bei *Platynereis dumerilii* fiel mir auf, daß die Elaeocytenproduktion wohl hauptsächlich im vordersten Drittel des Tieres abläuft. Bei dekapitierten Tieren, bei denen die Proliferation stark ange-regt war, konnte man schon mit dem bloßen Auge regelrechte Klumpen von leicht grünlichen Elaeocyten in den vorderen Segmenten erkennen. Bei *Nereis virens* konnte MAHLEIN (1991) in histologischen Schnitten proliferierende Elaeocyten direkt am dorsalen Blutgefäß nachweisen. Dieser Befund steht im Gegensatz zu meinen Ergebnissen an *Platynereis dumerilii* und weist auf artspezifische Unterschiede in der Proliferation hin.

Bei den von mir angefertigten Querschnitten waren außer an den parapodialen Blutgefäßen auch noch an den Dorsoparapodialgefäßen ansitzende Elaeocyten zu beobachten (Abb. 7, Abb. 14, Abb. 15). Diese unterschieden sich allerdings nicht wesentlich von den frei vorkommenden Zellen, weder in der Größe noch in der Cytoplasmastruktur, Vakuolengröße oder ähnlichem. Die Zellen saßen lückenlos nebeneinander auf der Gefäßwand, wobei sich die Vakuole proximal zum Gefäß und der Kern mit dem größten Teil des Cytoplasmas inklusive Nahrungsvakuolen distal befand (Abb. 15). Die Zellen hatten viele Sarkolyten phagocytiert, die sich in verschiedenen Verdauungsstadien jeweils in Nahrungsvakuolen befanden (Abb. 15b). Auch in frei flottierenden Elaeocyten waren Sarkolyten zu finden. Dagegen enthielten Proliferationsstadien von Elaeocyten in meinen Präparaten niemals phagocytierte Sarkolyten. Die Fähigkeit zur Phagocytose wird demnach erst im fertig differenzierten Zustand -erkennbar an der großen Vakuole- erreicht.

Es ist nicht geklärt, warum sich die Zellen an die Wandung des Blutgefäßes heften. Daß sie dort entstehen erscheint jedoch unwahrscheinlich, denn es waren keine charakteristischen frühen Stadien aufzufinden. Über den Grund der Anheftung lassen sich nur Vermutungen anstellen. Möglicherweise geben die Elaeocyten beim Verdau der Sarkolyten gewonnene Nährstoffe in das Blut ab, das sie durch die Zirkulation verteilt. Die Coelomflüssigkeit wäre jedoch auch ein geeignetes Medium hierfür, da sie sich mit der Bewegung des Tieres in der Körperhöhle bewegt und so enthaltene gelöste Stoffe gleichmäßig verbreitet. Das in den Dorsoparapodialgefäßen enthaltene Blut befindet sich auf dem Weg vom Rete dorsale und Rete parapodiale dorsale zum Dorsalgefäß. In den beiden Oberflächennahen Kapillarnetzen nimmt das Blut Sauerstoff aus dem umgebenden Medium (Seewasser) auf, daher enthält das Dorsoparapodialgefäß oxygeniertes Blut. Eventuell ist das ein Grund für die Elaeocyten, die Nähe des Gefäßes „aufzusuchen“.

An den Ventroparapodialgefäßen von *Platynereis dumerilii* waren oft auffällige Kernanhäufungen zu finden (Abb. 10). An einer Stelle war auch eine Traube von Zellen zu sehen, die proliferierenden Elaeocyten glichen (Abb. 11). Möglicherweise ist also die Proliferationszone im dorsalen Bereich des Parapodiums nicht die einzige Stelle, an der Elaeocyten entstehen. Auch an feineren Gefäßverästelungen innerhalb des Parapodiums waren Kernvermehrungen und am Blutgefäß ansitzende kleine und größere Zellen zu beobachten (Abb. 8 und Abb. 9), allerdings nicht in so geordneter Art und Weise wie in der oben beschriebenen Proliferationszone.

4.2 Coelomzell-Antikörper

In einer vorhergehenden Diplomarbeit (MAHLEIN 1991) war es gelungen, mit Hilfe eines elaeocytenspezifischen Antikörpers (GT 52 ♂) aus der Arbeitsgruppe von Prof. PORCHET-HENNERÉ diese bei *Nereis virens* auf Kunstharzdünnschnitten spezifisch zu markieren. An den traubenförmigen Zellformationen des dorsalen Blutgefäßes, die wahrscheinlich Elaeocytenproliferationszonen darstellen, zeigte sich, daß nur die distal vom Blutgefäß befindlichen Zellen, nicht aber die noch undifferenzierten proximal liegenden markiert wurden. Im Coelomepithel, das auch die Wandung der Blutgefäße bildet, könnten Stammzellen vorhanden sein, die durch Teilung neue Zellen bilden können, welche sich dann zu Elaeocyten differenzieren. Ein weiterführender Ansatz wäre, die Stammzellen sichtbar zu machen, wie das beispielsweise bei *Sipunculus nudus* (Sipuncula) mit Hilfe des Antikörpers CD34 (gegen hämopoietische Zellen von Säugetieren entwickelt) schon durchgeführt worden ist (MATOZZO et al. 2001). Alternativ wäre es auch denkbar, daß Epithelzellen der Coelomwand ihren bisherigen Differenzierungsstatus aufgeben, sich dedifferenzieren und zu einem neuen Zelltyp, den Elaeocyten, umwandeln.

Ein Aspekt meiner Arbeit war es, mit Hilfe der vorhandenen coelomzellspezifischen Antikörper Elaeocytenmarker für *Platynereis dumerilii* auffindig zu machen, um eventuell den Mechanismus der Proliferation und Zelldifferenzierung näher charakterisieren zu können, indem der Antikörper ähnlich wie bei *Nereis virens* auf Schnittpräparaten angewendet wird.

Eine weitere Intention war, eventuell bestehende Unterschiede innerhalb einer Elaeocytenpopulation oder zwischen den Populationen verschiedener Tiere aufzudecken. Denkbar wären zum Beispiel Unterschiede zwischen Elaeocyten männlicher und weiblicher Tiere, wie das bei den epitoken Tieren von *Nereis pelagica* der Fall ist (DHAINAUT 1966). Hier geht bei den Weibchen mit der heteronereiden Metamorphose eine erhebliche Vergrößerung des Endoplasmatischen Retikulums einher, was bei männlichen Individuen hingegen nicht zu beobachten ist.

Des Weiteren lassen sich die Elaeocyten atoker Tiere von denjenigen epitoker Tiere unterscheiden (DHAINAUT 1966). Bei *Nereis pelagica* enthalten die Elaeocyten im atoken Zustand große Mengen an Reservesubstanzen (Lipidtropfen und Glycogenrosetten). Mit dem Einsetzen der Metamorphose vermindert sich der Glycogengehalt, die Lipidtropfen werden kleiner und verschwinden schließlich. Dafür treten zunächst Proteingranula mit kristallinem Inhalt auf, kurz vor Erreichen der Reife wird deren Inhalt aber ins Cytoplasma entlassen, und die Granula lösen sich komplett auf. Bei anderen Polychaeten verändern sich die Elaeocyten nicht kontinuierlich, sondern es gibt zwei getrennte Generationen dieser Coelomzellen. Das ist beispielsweise bei den sogenannten agranulären Amoebocyten von *Nicolea zostericola* (Polychaeta: Terebellidae) der Fall (ECKELBARGER 1976). Die erste Generation hat auch hier die Aufgabe, im jungen Wurm Glycogen und Lipid zu akkumulieren. Zu Beginn der Vitellogenese verschwindet diese Zellgeneration vollständig, und die zweite Generation wird an derselben Stelle des somatischen Coelothels neu gebildet. Sie unterscheidet sich von der ersten darin, daß sie viel Endoplasmatisches Retikulum, Golgiapparate und freie Ribosomen enthält.

Beim Test der Antikörper aus Lille auf Coelomzellpräparaten stellte sich heraus, daß tatsächlich einige geeignet waren, die Elaeocyten von *Platynereis dumerilii* zu markieren: CC 41,14 (Abb. 28, Abb. 29, Abb. 30); CC 41 (Abb. 22); CC 41,1 (Abb. 23); CC 41,15 (Abb. 24); CC 59 (Abb. 25) und GT 52 (Abb. 26, Abb. 27). Darunter waren allerdings solche, die nicht ausschließlich Elaeocyten, sondern auch Oocytenballen (CC 41,15; ohne Abb.) oder Hüllzellen von Oocytenballen (GT 52; Abb. 26) mit anfärben. Andere wiederum markierten nicht alle Elaeocyten, sondern nur eine Subpopulation: CC 41 (Abb. 22);

CC 41,1 (Abb. 23); CC 41,15; CC 59. An dieser Stelle würde es sich eventuell lohnen, genauer zu untersuchen, worin der Unterschied zwischen den markierten und nicht markierten Elaeocyten besteht.

Um zu untersuchen, ob die Antikörper abgesehen von Coelomzellen auch noch an andere Gewebe und Strukturen binden, wurde ein Teil von ihnen (CC 41,14; CC 59; GT 52) auf Paraffindünnschnitten getestet. Dabei stellte sich jedoch heraus, daß die Antikörper nicht „paraffingängig“ sind. Die von den Antikörpern zu erkennenden Epitope werden während der Einbettungsprozedur des Präparates offenbar zerstört oder zumindest so verändert, daß die Antikörper sie nicht mehr erkennen. Lediglich CC 59 zeigte bei wenigen Elaeocyten eine leichte Markierung.

Anschließend wurden die gleichen Antikörper noch einmal auf Kryostatschnitten ausprobiert, denen eine wesentlich schonendere Einbettungsprozedur vorausgeht. Hier stellte sich heraus, daß CC 41,14 nicht nur Elaeocyten (wegen ihres Lipidtropfens) erkennt, sondern auch die Lipidtropfen der Oocyten bzw. deren Peripherie anfärbt (Abb. 30). Die Ränder der Lipidtropfen werden allerdings sehr spezifisch markiert. Die oft kappenförmige Markierung des Lipidtropfens (Abb. 29a, Abb. 30) spricht dabei nicht für eine unspezifische Adsorption des primären oder sekundären Antikörpers an die Lipidphase, die auch bei anderen Antikörpern nicht beobachtet wurde. Es ist eher davon auszugehen, daß die durch diesen Antikörper markierten Strukturen (Proteine) hydrophobe Bereiche besitzen, mit denen sie an den Lipidtropfen „andocken“. GT 52 erwies sich als „Universal“-marker. Dieser Antikörper färbte alle Gewebe an und ist dementsprechend nicht für die selektive Färbung von Elaeocyten geeignet. CC 59 markierte ebenfalls außer Elaeocyten auch noch teilweise Muskulatur, Darm und ähnliches, ist also nur unter Vorbehalt zur Verwendung geeignet.

Da bei den Kryostatschnitten die Strukturhaltung sehr schlecht war und die verwendeten Antikörper auf den Paraffinschnitten nicht binden konnten, war keine genauere Betrachtung der Elaeocyten-Proliferationszone möglich.

Um Hinweise darauf zu erhalten, wie viele und welche Proteine von den Antikörpern markiert werden, wurden die in Coelomzellen enthaltenen Proteine (eines Homogenats) in einer Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt, anschließend per Westernblot auf eine Membran transferiert und mit den Antikörpern inkubiert (Abb. 31 bis Abb. 35). Die dabei zu Tage tretenden Banden waren oft trotz langer Entwicklungszeiten nur sehr schwach zu sehen.

Eine Erklärung dafür lieferten die zusätzlich durchgeführten Dot Blots (Abb. 36 bis Abb. 39). Hierbei stellte sich heraus, daß sich die für die PAGE notwendige Behandlung der Probe mit SDS bzw. Probenpuffer negativ auf die Antikörperbindung auswirkte. In den allermeisten Fällen (Ausnahme: CC 59) fiel die Färbung der Dots bei den behandelten Proben deutlich schwächer aus als bei den nativen Proben. Anscheinend wurden mit der Auflösung von Sekundär- und Tertiärstruktur der Proteine in den meisten Fällen auch die Epitope zerstört.

Über die relative Laufstrecke der gefärbten Proteinbanden im Vergleich zu den Marker-substanzen wurde das Molekulargewicht bestimmt (siehe Tabelle 4, im Anhang), was zur Charakterisierung der Proteine bzw. deren Untereinheiten genutzt werden kann. Beispielsweise werden von CC 1 Polypeptide mit einem Molekulargewicht von 231 kDa (*Nereis diversicolor* Weibchen, Abb. 35) bzw. 194 kDa (*Platynereis dumerilii* Männchen, Abb. 34) markiert. Bei dem Blot des *Platynereis dumerilii* Weibchens war die Blotzeit zu kurz, so daß die Polypeptide mit hohem Molekulargewicht nicht auf die Nitrocellulosemembran transferiert wurden (daran erkennbar, daß auch der oberste Marker fehlte). Die Größe dieser Proteine liegt in der Nähe des obersten Markers (205 kDa), der aus Myosin besteht. Es könnte sich also um Myosin handeln. Diese Annahme wird auch dadurch unterstützt, daß in den fluoreszenzmikroskopischen Beobachtungen die Sarkolyten gefärbt waren

(Abb. 20), welche als Muskelfragmente hauptsächlich aus Myosin- und Aktinfilamenten bestehen.

Der CC 59-Antikörper zeigte auf den Westernblots sowohl bei *Nereis virens* als auch bei *Platynereis dumerilii* beiderlei Geschlechts sehr viele auffällig stark gefärbte Banden (Abb. 33 bis Abb. 35). Er markiert also viele unterschiedliche Proteine der Coelomzellen und ist damit relativ unspezifisch. Die Wahrscheinlichkeit ist somit hoch, daß er auch Proteine anfärbt, die nicht von Coelomzellen stammen. Diese Tatsache bestätigte sich bei der Anwendung auf den Kryostatschnitten, wo außer Elaeocyten auch Gewebe wie Muskulatur und Darm teilweise angefärbt wurden. Dagegen wurden durch andere Antikörper wie z.B. CC 10 oder GT 52 auf den Westernblots nur wenige Polypeptide markiert (Abb. 35). Es zeigte sich außerdem, daß bei *Platynereis dumerilii* Weibchen und Männchen mehrere Antikörper Polypeptide ein und desselben Molekulargewichtes markierten (Abb. 33 und Abb. 34), was auf eine zumindest teilweise übergreifende Spezifität schließen läßt.

4.3 Nachweis von Vitellogenin und Vitellin

Lange Zeit war man der Ansicht, daß die Oocyten von Nereididen das Vitellin für ihre Dottergranula selbst synthetisieren (DHAINAUT et al. 1980). Es gab jedoch in nachfolgenden Arbeiten bald Hinweise dafür, daß die Eizellen nicht zur Autosynthese befähigt sind, sondern auf die Syntheseaktivität anderer Zellen, nämlich der Elaeocyten, angewiesen sind (BÜSCHER 1982; BAERT und SLOMIANNY 1987; CURGY et al. 1987). Mittlerweile ist die Heterosynthese des Vitellogenins allgemein anerkannt. Ähnlich wie bei einigen Vertebraten und Insekten wird ein Vorläufermolekül des Dotterproteins von somatischen Zellen des mütterlichen Organismus' gebildet. Im Falle der Vertebraten ist die Leber der Ort der Entstehung, bei den Insekten übernimmt der Fettkörper diese Aufgabe, und bei den Nereididen wird das sogenannte Vitellogenin von den Elaeocyten gebildet. Diese entlassen das Protein dann in die Coelomflüssigkeit, die ja ihr Umgebungsmedium darstellt. Auch die Oocyten flottieren frei im Coelom und kommen so in Kontakt mit dem gelösten Vitellogenin. Sie nehmen es selektiv durch Endocytose auf (FISCHER et al. 1991; HAFER et al. 1992) und wandeln es intrazellulär zu Vitellin um, welches sich vom Vitellogenin in Molekulargewicht und Zusammensetzung der Untereinheiten unterscheidet.

Bei *Perinereis cultrifera* sind in der Anfangsphase des Oocytenwachstums Vitellogenin, reifes Vitellin und drei intermediäre Produkte gleichzeitig zu finden. Zu Beginn der Corticogenese (ab einem Oocytendurchmesser von etwa 130 µm) ist fast nur noch reifes Vitellin zu finden. Die Inkorporation von Vitellogenin wird weiter fortgesetzt, dessen intrazelluläre Transformation läuft aber deutlich schneller ab (BAERT 1986). Bei *Nereis diversicolor* hingegen ist in jungen Eizellen überhaupt kein Vitellin zu finden. Erst mit Einsetzen der Corticogenese bei einem Oocytendurchmesser von ca. 150 µm beginnt der Vitellogeningehalt zu sinken, und das Vitellin reichert sich an. Das Vitellin wird innerhalb der Oocyten in Granula gespeichert, die zunächst in der Peripherie entstehen und dann bis zu einer bestimmten einheitlichen Größe heranwachsen, bevor neue Granula angelegt werden (BÜSCHER 1982).

Der von mir verwendete Antikörper wurde gegen gereinigtes *Nereis virens*-Vitellin hergestellt. Bei vor meiner Diplomarbeit durchgeführten Polyacrylamid-Gelelektrophorese- und Westernblotexperimenten (HOEGER, unpubl.) stellte sich heraus, daß dieser Antikörper auch Vitellin von *Nereis diversicolor* und *Platynereis dumerilii* erkennt. In vergleichenden Versuchen mit Zellextrakten von Oocyten, Elaeocyten weiblicher Tiere und Elaeocyten männlicher Tiere (als Negativ-Kontrolle) zeigte sich außerdem, daß nicht nur Vitellin, sondern auch Vitellogenin markiert wird. Das Vitellogeninmolekül verschiedener Nereididen ist im nativen Zustand größer (465-530 kDa) als das Vitellinmolekül (390-415 kDa, BAERT 1986; JUGERT 1986; BONNIER und BAERT 1992) und wird durch Spaltung zum Vitellin transformiert. Dabei verringert sich bei *Perinereis cultrifera* und *Nereis virens* auch das Molekulargewicht der Hauptuntereinheiten (Vitellogenin >150 kDa, Vitellin ca. 100 kDa, BAERT 1986, HOEGER, unpubl.).

Daß der Antikörper bei den fixierten Zellen Vitellin markiert hat, wird an den relativ jungen Oocyten deutlich, bei denen die enthaltenen Dottergranula stark gefärbt sind (Abb. 41). Die Fluoreszenz der Eizellen nimmt mit zunehmender Größe und damit auch zunehmender Anzahl von Dottergranula zu (Abb. 41). Bei ca. 50-60 µm Durchmesser erreichen sie jedoch ein Stadium, in dem ihre Hülle mit der hier angewendeten, für Elaeocyten optimierten Fixierungsmethode nicht mehr ausreichend permeabel für den Antikörper ist (Abb. 43). Verwendet man dagegen Methanol zur Fixierung, so wird die Vitellinhülle durchlässig, und die Vitellingranula sind wieder markierbar (Abb. 42). Auch bei den gefärbten Kryostatschnitten, bei denen das Problem des Eindringens der Antikörper in die Zellen nicht besteht, werden die Vitellingranula erkannt (Abb. 45).

Abgesehen von den Vitellinggranula in den Eizellen werden aber auch noch viele andere Strukturen von dem Anti-Vitellin-Antikörper angefärbt. So sind Membranen von jungen Oocyten (noch ohne Vitellinggranula), Membranen von Elaeocyten (sowohl von Weibchen als auch von Männchen), Membranen von Granulocyten, Sarkolyten, Spermatoocyten und -ballen und zum Teil auch das Cytoplasma von Elaeocyten beider Geschlechter unspezifisch angefärbt (Abb. 40, Abb. 43, Abb. 44). Daß diese unspezifische Färbung nicht auf den sekundären Antikörper zurückzuführen ist, wurde durch Kontrollexperimente, bei denen Zellen bzw. Schnitte ausschließlich mit dem sekundären Antikörper inkubiert wurden, nachgewiesen. Bei diesen Präparaten war *keine* Fluoreszenz zu beobachten. Lediglich bei sehr langer Belichtungszeit trat die schwache Autofluoreszenz der Vitellinggranula zu Tage, die auch benachbarte Strukturen anstrahlte (Abb. 46).

Anscheinend war also das zur Immunisierung des antikörperproduzierenden Kaninchens verwendete Vitellin nicht ausreichend gereinigt worden und enthielt noch vereinzelt andere Proteine (z.B. Membranbestandteile). Oder aber das Vitellin besitzt Epitope, die häufig vorkommenden anderen Proteinen sehr ähneln, so daß der Antikörper auch daran bindet.

Wegen der hohen Unspezifität des Antikörpers war es nicht möglich, angefärbte Strukturen in Elaeocyten eindeutig als Produktions- oder Speicherorte von Vitellogenin zu identifizieren. Meist kam ich beim Vergleich weiblicher und männlicher Elaeocyten zu dem Schluß, daß es sich nur um unspezifische Färbung oder Artefakte (Markierung von Schmutzpartikeln) handelte. Lediglich bei den Kryostatschnitten fand ich stark fluoreszierende Granula im Cytoplasma von weiblichen Elaeocyten, die man als Vitellogeningranula interpretieren könnte (Abb. 45). Dafür spricht, daß umliegende andere Gewebe (z.B. Muskeln) keine solchen Granula enthalten. Allerdings fehlt mir an dieser Stelle der Vergleich mit Elaeocyten männlicher Tiere.

Eine Erklärung dafür, daß in den Elaeocyten keine Vitellogeningranula zu sehen waren, wäre die, daß der gegen Vitellin hergestellte Antikörper eben wirklich nur an Vitellin bindet und nicht an Vitellogenin. Dagegen spricht allerdings, daß der Antikörper auf den Westernblots auch Vitellogenin erkannt hatte. Eine andere Erklärungsmöglichkeit besteht darin, daß das Vitellogenin eventuell gar nicht in den Elaeocyten gespeichert wird, sondern sofort bei der Produktion sezerniert wird und in gelöster Form in der Coelomflüssigkeit vorliegt. Dies würde dann allerdings nur für den hier untersuchten *Platynereis dumerilii* zutreffen, da durch Untersuchungen an den Elaeocyten von *Nereis virens* gezeigt wurde (HEIL 1995), daß diese auch intrazelluläre Vitellogenin-Speicher anlegen können.

Der ebenfalls auf Elaeocyten und Oocyten angewendete Vitellogenin-Antikörper brachte ähnliche Resultate wie der Vitellin-Antikörper. Er markierte ebenfalls das Vitellin der Eizellen und hatte die gleiche Eigenschaft, die Membranen aller Zellen unspezifisch anzufärben. Da das Antigen Vitellogenin, gegen das dieser Antikörper gerichtet ist, aus Kulturüberständen von Elaeocytenkulturen stammt, ist eine mögliche Kontaminationen mit anderen Proteinen weniger zu erwarten als bei dem verwendeten Vitellin-Antikörper. Dieser war gegen gereinigtes Vitellin gerichtet, welches aus Oocytenhomogenaten gewonnen wurde, wobei eher eine Kontamination durch andere adsorbierte Proteine zu erwarten ist. Insofern sprechen die vorliegenden Befunde für das Vorhandensein von anderen, vitellin-ähnlichen Epitopen in den markierten Zellen.

Um zu überprüfen, ob die Fixierung der Zellen durch Paraformaldehyd einen Einfluß auf die Antikörperfärbung hat, wurde ein Dot Blot durchgeführt, bei dem *Nereis virens*-Vitellin und zum Vergleich BSA jeweils einmal nativ und einmal mit Paraformaldehyd behandelt mit verschiedenen Anti-Vitellin- und Anti-Vitellogenin-Antikörpern inkubiert wurden (Abb. 47). Es zeigte sich, daß das Vitellin im unfixierten und fixierten Zustand gleich stark angefärbt wird, die Struktur des Vitellins durch die Fixierung also nicht wesentlich verändert wird. Zumindest die Epitope, gegen die sich der Antikörper richtet,

werden nicht beeinflußt. Auffallend war jedoch die deutlich stärkere unspezifische Färbung des BSA im Paraformaldehyd-fixierten Teil des Blots im Vergleich zu der unfixierten Kontrolle. Anscheinend wird das Protein durch die Fixierung so modifiziert, daß es nun Bindungsstellen für die Vitellin- bzw. Vitellogenin-Antikörper aufweist. Ähnliches geschieht vermutlich auch mit den Membranproteinen der Elaeocyten, Sarkolyten und Gameten während der Fixierung. Die Antikörperreaktion auf unfixierte Zellen habe ich nicht untersucht, da die Zellen nur sehr begrenzt haltbar sind und die Inkubationsprozedur wahrscheinlich nicht überstanden hätten.

4.4 Granuläre Coelomzellen und extrazelluläre Granula

Beim Betrachten von mit Anti-Vitellin (und FITC-markiertem sekundären Antikörper) behandelten Coelomzellproben fielen immer einzelne Zellen auf, die wesentlich heller fluoreszierten als die übrigen. Bei genauerem Hinsehen zeigte sich, daß sie voll von fluoreszierenden Granula waren (Abb. 49).

Da diese vom Vitellin-Antikörper markiert worden waren, lag natürlich der Schluß nahe, daß es sich um Elaeocyten mit Vitellogeningranula handelt. Dagegen spricht allerdings, daß die Granula auch von CC 41,14 (und dem sekundären Antikörper Anti-Mouse-Alexa 546) angefärbt wurden (Abb. 50 und Abb. 51). Die Vitellingranula von Eizellen hingegen zeigten ebenfalls FITC-Fluoreszenz, aber keinerlei Alexa 546-Markierung (ohne Abb.). Es könnte höchstens sein, daß in den Granula der Elaeocyten bzw. granulären Coelomzellen das Vitellin mit einer anderen Substanz colokalisiert ist, die dann nicht von den Eizellen mit aufgenommen wird.

Ein weiteres Gegenargument liefern Coelomzellproben von männlichen Tieren, die ähnlich aussehende granuläre Coelomzellen enthalten (Abb. 48). Diese wurden allerdings nur in lichtmikroskopischen Beobachtungen entdeckt und nicht auf ihre Antikörperbinde- und Fluoreszenzeigenschaften hin untersucht. Es müßte auch noch geklärt werden, ob die intrazellulären Granula wirklich von Anti-Vitellin und CC 41,14 erkannt wurden, oder ob es sich um eine unspezifische Färbung des sekundären Antikörpers handelt. Auch eine Autofluoreszenz ist nicht auszuschließen.

Ebenso hell fluoreszieren nämlich auch getroffene Borsten auf Kryostatschnitten. Dabei handelt es sich eindeutig um Autofluoreszenz, denn die Fluoreszenz ist auch bei Kontrollpräparaten ohne Antikörperbehandlung zu beobachten. Möglicherweise ist das stark fluoreszierende Material in den granulären Coelomzellen am Aufbau von Borsten beteiligt. Für diese Hypothese spricht außerdem, daß an der Basis von Borsten granuläre Zellen zu finden sind, wie man in Abb. 8a rechts unten erkennen kann. Es wäre denkbar, daß bei der Präparation der Würmer solche Zellen losgerissen und zusammen mit den Coelomzellen abgesaugt wurden, oder aber daß sie tatsächlich auch frei in der Leibeshöhle vorkommen.

Bei den von mir beschriebenen granulären Coelomzellen handelt es sich mit großer Wahrscheinlichkeit nicht um Granulocyten, da diese in der Regel kleiner sind. Außerdem bilden sie während der Anheftung an das Deckgläschen meist einen unregelmäßigen Parapodiensaum und eine körnig strukturierte, faltige Oberfläche aus (Abb. 1). Die von mir beschriebenen Zellen hingegen stimmen in Größe, Form und Oberflächenbeschaffenheit mit den Elaeocyten überein. Die einzigen Unterschiede sind die enthaltenen Granula und das Fehlen von Lipidtropfen und Vakuole, beides Charakteristika der Elaeocyten.

Innerhalb der sogenannten granulären Coelomzellen gibt es auch noch Unterschiede. Außer den oben diskutierten Zellen, die etwas größere Granula enthalten, welche nicht gleichmäßig in der Zelle verteilt sind, sondern Akkumulationen, oft in Ausstülpungen am Rand der Zelle, bilden (Abb. 50 und Abb. 51), kommen solche vor, deren gesamtes Zellvolumen von sehr feinen Granula erfüllt ist (Abb. 49). Diese Zellen wurden von mir nicht mit CC 41,14 und Anti-Mouse-Alexa 546 behandelt und auch nicht auf rote Autofluoreszenz hin untersucht. Es könnte also sein, daß es sich hier noch um einen weiteren Zelltyp handelt, der Granula anderer Zusammensetzung enthält.

Ein weiteres Rätsel geben stark fluoreszierende, oft in Ballen vorkommende Granula auf, die in ihrer Größe die intrazellulären Granula übersteigen und sich außerhalb von Zellen in der Coelomflüssigkeit befinden (ohne Abb.). Bei der hellen grünen und roten Fluoreszenz könnte es sich um Autofluoreszenz oder unspezifische Färbung handeln, denn diese Ballen waren des öfteren bei Behandlung mit den verschiedensten primären Antikörpern aufgefallen. Um Vitellingranula von beschädigten Eizellen handelt es sich wohl nicht,

da die Granula von ihren Ausmaßen her zu groß sind und außerdem im Gegensatz zu den Vitellinggranula der Oocyten auch noch rot fluoreszieren. Denkbar wäre, daß es sich um dasselbe Material handelt, welches auch als Granula in den oben beschriebenen Zellen zu finden ist. Bei der Präparation, insbesondere beim Aufzentrifugieren auf die Deckgläschen, könnten labile Zellen beschädigt worden sein, so daß die enthaltenen Granula freigesetzt wurden und zu größeren fusionierten. Ob diese Granulaballen tatsächlich im Coelom von *Platynereis dumerilii* vorkommen, ist allerdings noch nicht klar. Sie könnten auch Teile des Darminhaltes sein, wenn der Darm bei der Präparation beschädigt wurde, oder aber es könnte sich um Verunreinigungen des Seewassers handeln, mit dem die Zellen aus der Leibeshöhle gespült werden. Beispielsweise wäre denkbar, daß es sich um Stoffwechselprodukte von Algen handelt.

4.5 Elaeocytengrößen bei dekapitierten Tieren und Kontrolltieren

Die Feststellung von HAUENSCHILD (1965), daß die Entfernung des Prostomiums bei *Platynereis dumerilii* zu einer Vermehrung von Elaeocyten führt, wurde bereits in der Diplomarbeit von MAHLEIN (1991) genauer untersucht. Dabei zeigte sich, daß der Anstieg der Elaeocytenzahl in der Coelomflüssigkeit von dekapitierten Tieren größer ist als bei Kontrolltieren mit Prostomium. Mit meinen Beobachtungen kann ich ebenfalls bestätigen, daß die prostomiumslosen Würmer auffallend viele Elaeocyten enthielten. Diese Tatsache habe ich allerdings nicht näher quantifiziert. Meine Beobachtungen konzentrierten sich vielmehr auf eventuelle Veränderungen an den einzelnen Zellen. In diesem Zusammenhang stellte ich fest, daß das Zellvolumen bzw. der Durchmesser der Elaeocyten bei dekapitierten Tieren ansteigt. In mehreren Versuchsreihen mit jeweils mindestens drei gleich behandelten Würmern nahm ich Daten zur Zellgrößenverteilung auf.

Sowohl weibliche als auch männliche Kontrolltiere zeigten eine konstante Zellgrößenverteilung oder eine leichte Tendenz hin zu kleineren Elaeocyten (Abb. 52). Dies läßt sich damit erklären, daß den Tieren täglich kleine Verletzungen zugefügt wurden, was zur Coelomzellentnahme unumgänglich ist. Durch den Regenerationsprozeß wurde vermutlich die Elaeocytenproliferation leicht angeregt. Da neu entstehende Elaeocyten zunächst relativ klein sind und die bereits bestehenden ihre Größe beibehalten, verschiebt sich die Verteilung insgesamt leicht in Richtung der kleineren Zellen, die neu hinzukommen.

Ebenfalls bei Männchen und Weibchen übereinstimmend nahm die Zellgröße kontinuierlich zu, wenn die Würmer hinter dem Pharynx dekapitiert worden waren (Abb. 54). Die Zellvolumina nahmen zum Teil, vor allem bei den männlichen Vertretern, enorme Ausmaße an (bis über 42 µm Durchmesser). Was sich in den Zellen vergrößerte und mögliche Gründe hierfür werden im Abschnitt 4.6 behandelt. Auf jeden Fall scheint der Wegfall des Gehirns und damit auch seiner neuroendokrinen Sekrete direkt oder indirekt einen Einfluß auf die Elaeocyten zu haben. Nur ohne Prostomium kommt es zur Bildung von solchen besonders großen Elaeocyten. Durch die Entfernung des Gehirns wird eine schnellere Geschlechtsreife herbeigeführt. Diese bedingt aber nicht das Wachstum der Elaeocyten, denn vergleichsweise vermessene Elaeocyten von reifen Tieren mit Gehirn hatten eine Zellgrößenverteilung, die etwa der der unreifen Kontrolltiere entsprach.

Bei den Weibchen war ein Unterschied in der Zellgröße zwischen vor bzw. hinter dem Pharynx dekapitierten Tieren festzustellen. In den ersten drei Tagen nahm die Zellgröße in beiden Fällen zu, ab Tag vier war jedoch bei den Tieren, die noch im Besitz ihres Pharynx waren, ein Rückgang zu verzeichnen (Abb. 53a). Unklar ist hierbei, ob bereits existierende Zellen ihre Größe wieder verringern, oder ob die Verschiebung der Verteilung durch neu gebildete kleine Zellen und ein Absterben der vergrößerten Zellen verursacht wird. Auch bei den Männchen unterscheiden sich die Elaeocytengrößen der vor bzw. hinter dem Pharynx dekapitierten Tiere. Beim Fehlen nur des Prostomiums zeigen sich in den ersten drei Tagen nach dem Eingriff kaum Veränderungen in der Zellgrößenverteilung, die Tiere verhalten sich also eher wie die Kontrolltiere. Etwa ab Tag vier kommt es dann aber wie bei den von Prostomium und Pharynx befreiten Exemplaren zu einer starken Größenzunahme (Abb. 53b).

Der Pharynx bzw. das in diesem Abschnitt enthaltene Unterschlundganglion scheint also einen gewissen Einfluß auf die Elaeocyten zu haben. Bei Oligochaeten werden Neurosekrete im Ober- und Unterschlundganglion sowie im vorderen Teil des Bauchmarks gebildet (HUBL 1956). Auch von anderen Polychaeten, z.B. *Typosyllis pulchra* (Polychaeta: Syllidae) (HEACOX und SCHROEDER 1982), ist bekannt, daß nicht nur das Prostomium, sondern auch die Pharynxregion (der Proventrikel) bei der hormonellen Regulation eine Rolle spielt. Hier scheint es so zu sein, daß das Gehirn die quantitative Aktivität des Pro-

ventrikels steuert. FRANKE (1980) postuliert, daß die Hormonsekretion des Proventrikels zyklisch abläuft, wobei zu Beginn des Stolonisationsprozesses viel Hormon sezerniert wird, um die Regeneration zu fördern und die Reifung zu hemmen. Wird in diesem Stadium das Prostomium entfernt, so findet keine Reifung statt, die Aktivität des Proventrikels hält also an. Die Rolle des Gehirns beschränkt sich folglich darauf, die Hormonproduktion des Proventrikels herabzusetzen oder ganz auszuschalten. Zu einem späteren Zeitpunkt des Zyklusses, wenn die Produktion des hemmenden Hormons bereits eingestellt ist, wird die Reifung auch bei Entfernung des Prostomiums ungehindert fortgesetzt. Bei Nereididen ist jedoch bisher nichts über eine hormonezernierende Funktion des Pharynx und seiner Ganglien bekannt. Bei meinen Beobachtungen scheint im Falle von männlichen Tieren ein möglicher Hormonspiegel in den ersten drei Tagen nach Dekapitierung aufrechterhalten zu werden, erst ab ca. Tag 4 verhalten sich die Elaeocyten nicht mehr wie die der Kontrolltiere, sondern ebenso wie die von pharynx- und prostomiumslosen Tieren. Im Gegensatz dazu scheint bei den Weibchen in den ersten drei Tagen kein Unterschied zu hinter dem Pharynx dekapitierten Tieren zu bestehen, erst ab ca. Tag vier sieht es so aus, als „übernahme“ der Pharynx die Funktion des Gehirns und „hielte“ die Elaeocyten wieder klein. Ein Hinweis darauf, daß dem vierten Tag eine besondere Bedeutung zukommt, findet sich bei CLARK und RUSTON (1963). In Schwanzamputationsversuchen an *Nereis diversicolor* zeigte sich hier, daß das Gehirn in den ersten drei Tagen nach der Amputation vermehrt Inkrete bildet und dieselben am vierten Tag in den Körper abgibt.

Zur Kontrolle wurde in meiner Arbeit noch ein Implantationsexperiment durchgeführt. Bei männlichen Tieren wurde das Prostomium zuerst entfernt und dann in die Leibeshöhle implantiert, wo es weiterhin seine neuroendokrinen Funktionen ausüben kann. Zu erwarten war, daß sich die Zellgrößenverteilungen wie die der männlichen Kontrolltiere verhalten. Dies war auch tatsächlich der Fall (Abb. 55); die etwas deutlicher als bei den Kontrolltieren ausfallende Verschiebung in Richtung kleinerer Zellen ist wohl auf den nicht unerheblichen operativen Eingriff und die sich daran anschließenden Regenerationsprozesse zurückzuführen.

4.6 Extrem vergrößerte Elaeocyten („Riesen“elaeocyten)

Besonders große Elaeocyten treten bei Würmern auf, denen Prostomium und Pharynx entfernt wurden, sowie auch bei Männchen, denen nur das Prostomium fehlt. Die Zellgröße wächst kontinuierlich an und erreicht bis über 42 μm (bei hinter dem Pharynx dekapitierten Männchen), wobei man bemerken muß, daß keineswegs alle Elaeocyten des Tieres so an Größe zunehmen. Gleichzeitig kommen immer auch kleine und mittelgroße Zellen vor (Abb. 57). Die Zellgrößenbeobachtung konnte nur maximal 13 Tage lang durchgeführt werden, da die Dekapitierung eine beschleunigte Reifung des Tieres zur Folge hat und dieses so spätestens nach zwei Wochen schwämbereit war und starb.

Bei den vergrößerten Zellen scheint die Vakuole einen besonders großen Teil des Zellvolumens einzunehmen, wenn man die lichtmikroskopischen Bilder betrachtet. Von *Nereis pelagica* ist bekannt, daß die Elaeocyten der männlichen Vertreter während der Entwicklung zum epitoken Tier zu einem großen Teil degenerieren. Diejenigen, die erhalten bleiben, sind durch eine enorm vergrößerte Vakuole charakterisiert (DHAINAUT 1970). Die Lipidtropfen sind bei diesen Zellen verschwunden. Bei den von mir beobachteten „Riesen“elaeocyten sind noch Lipidtropfen erhalten, diese sind jedoch nicht nur relativ zur Zellgröße, sondern auch absolut kleiner als die der „normalen“ Elaeocyten (Abb. 57 im Vergleich zu Abb. 56), es ist also ein Nettoverlust an Lipid zu verzeichnen. Besonders die normal großen Elaeocyten, die gleichzeitig mit stark vergrößerten vorkommen, zeichnen sich durch einen auffallend kleinen Lipidtropfen aus. Auch hier ist die Vakuole stets sehr voluminös. Die Verkleinerung des Lipidtropfens stimmt mit den Beobachtungen von DHAINAUT (1970) bei *Nereis diversicolor* überein, wo die Lipidreserven beim reifen Tier schrumpfen, aber nicht vollständig verschwinden.

Die oben erwähnten Veränderungen an Elaeocyten von *Nereis pelagica* und *Nereis diversicolor* sind allerdings bei der normalen Entwicklung zum epitoken Tier zu beobachten und sind keine Folge der Dekapitierung. Bei *Platynereis dumerilii* konnte ich hingegen beim Vergleich der Elaeocyten schwämbereiter und unreifer Kontrolltiere keine Unterschiede in Zellgröße, Größe der Vakuole oder des Lipidtropfens feststellen. Hier ist der verkleinerte Lipidtropfen offenbar eine indirekte Folge der Dekapitierung. Möglicherweise wird das Lipid zugunsten der Regenerations- und beschleunigten Reifungsprozesse abgebaut. Da die Würmer während der Beobachtungen nicht mehr gefüttert wurden, müssen sie die Körperreserven heranziehen. Auch bei manchen Kontrolltieren waren nach zwei Wochen Hungerzeit Elaeocyten mit relativ kleinen Lipidtropfen zu beobachten. Daß vor allem die kleineren, wahrscheinlich neu gebildeten Zellen nur wenig Lipid besitzen, ließe sich mit der erhöhten Proliferationsrate erklären. Die Lipidreserven werden auf eine größere Zahl von Zellen verteilt, so daß jede einzelne weniger erhält. Die Lipidproduktion kann mit der Proliferation nicht mehr Schritt halten.

Die Vergrößerung der Vakuole könnte auf osmotischen Effekten beruhen. Eine Möglichkeit wäre, daß das Umgebungsmedium der Zellen, also die Coelomflüssigkeit, an Osmolarität abnimmt, was sich aber wohl kaum mit der eingestellten Produktion von neuroendokrinen Sekreten erklären läßt, da diese vermutlich nicht in osmotisch relevanten Konzentrationen vorkommen. Eine andere Erklärung für das Anschwellen der Vakuole wäre eine erhöhte Molekülkonzentration in ihrem Inneren. Diese könnte aus der erhöhten Phagozytoseaktivität der Zellen (siehe unten) resultieren. Da es sich bei der Vakuolenmembran und der Zellmembran nicht um unbegrenzt dehnbare Strukturen handelt, muß die Vergrößerung mit einer erhöhten Produktion und dem Einbau von Membranlipiden einhergehen.

Der Inhalt der Vakuole von „Riesen“elaeocyten unterscheidet sich von dem normaler Elaeocyten, wie bei der Färbung mit Acridinorange deutlich wird. Hier ist die Vakuole normaler Zellen orange gefärbt (Abb. 60 und Abb. 61), was auf einen sauren pH-Wert

schließen läßt. In den vergrößerten Elaeocyten nimmt die Vakuole jedoch meist überhaupt keine Farbe an und ist deshalb in fluoreszenzmikroskopischen Beobachtungen überhaupt nicht zu sehen (Abb. 63). Wie in Abb. 62 dargestellt, ist die große Vakuole durchaus noch vorhanden, besitzt lediglich keinen sauren pH-Wert mehr.

Während der Laserscanmikroskopie war zu beobachten, wie sich große, leuchtend rot gefärbte Vakuolen bei anhaltender Laserbestrahlung plötzlich entfärbten (Abb. 65). Manchmal wurden sie außerdem aus der Zelle ausgestoßen (Abb. 65). Möglicherweise werden diese Prozesse durch die entstehende Wärme bei der Laserbestrahlung ausgelöst. Wenn durch die Wärme Reaktionen in der Vakuole beschleunigt werden, könnte dadurch der plötzliche Farbverlust ähnlich wie das Umschlagen eines Indikators erklärt werden. Das Freisetzen der Vakuole aus der Zelle ist eine häufige Erscheinung bei lebenden isolierten Zellen, wenn man sie zu lange aufbewahrt, die ebenfalls durch Wärme gefördert wird. Dieses Phänomen ist auch bei normalen Elaeocyten zu beobachten. Beim Betrachten der fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen fällt auf, daß auch die extrazellulären Vakuolen ihre orange-rote Farbe eingebüßt haben. Daß die außerhalb von Zellen befindlichen Vakuolen ihre sauren Eigenschaften verlieren, hängt vermutlich damit zusammen, daß die V-ATPase, die für den gerichteten Protonentransport in die Vakuole zuständig ist, kein ATP mehr geliefert bekommt. Ohne diesen aktiven Transport kann der Gradient nicht aufrechterhalten werden, da die Protonen langsam aus der Vakuole herausdiffundieren.

Durch Färbung mit Acridinorange werden die größten Unterschiede zwischen gewöhnlichen Elaeocyten und „Riesen“elaeocyten deutlich. Die großen Zellen besitzen zahlreiche verschieden gefärbte Nahrungsvakuolen, in denen sich vor allem Sarkolyten und deren Abbauprodukte befinden (Abb. 63). Die verschiedenen Stadien der Verdauung sind mit unterschiedlichen pH-Werten in den Nahrungsvakuolen verbunden, so daß die unterschiedlichsten Gelb-, Grün-, Rot- und Orangetöne zustande kommen. Oft sieht man auch kleine, runde, kräftig rot gefärbte Vesikel (Abb. 63b), vermutlich Lysosomen, die saure Verdauungsenzyme enthalten und mit den Nahrungsvakuolen verschmelzen. Da die große (ungefärbte) Vakuole das Volumen der Zelle hauptsächlich einnimmt, wird das Cytoplasma an den Rand gedrängt und reichert sich rund um den Zellkern an, der als relativ großes Zellorganell die Zellmembran etwas von der Vakuolenmembran abhebt. So kommt es auch, daß die Nahrungsvakuolen und Lysosomen rund um den Kern herum zu finden sind. Dies wird auch in lichtmikroskopischen Aufnahmen deutlich (siehe Abb. 58b und Abb. 59), wo Einschlüsse verschiedener Größe ein rundes Zellorganell umgeben.

Warum die Elaeocyten der dekapitierten Tiere vermehrt Sarkolyten phagocytieren, läßt sich am einfachsten damit erklären, daß diese in erhöhter Zahl anfallen, zum Einen bedingt durch die bei der Dekapitierung entstandene Verletzung, zum Anderen durch die beschleunigte Metamorphose zum epitoken Tier, die von einer Umstrukturierung der Muskulatur begleitet wird. In welchen enormen Mengen Sarkolyten zeitweise auftreten, läßt sich anhand von Abb. 58a erahnen.

4.7 Autofluoreszenz bei *Platynereis dumerilii* Elaeocyten

Sowohl bei der Laserscanmikroskopie (Anregung mit Kryptonlaser) als auch bei der „normalen“ Fluoreszenzmikroskopie (Anregungsart Grün H 546, Erregerfilter BP 546/12, Farbteiler FT 580, Sperrfilter LP 590) war eine rote Autofluoreszenz der Elaeocyten zu beobachten. Dieses Phänomen ist gleichermaßen bei den Zellen weiblicher und männlicher Tiere aufgetaucht. Es sind mehr oder weniger runde Granula unterschiedlicher Größe zu erkennen, die den Kern umgeben (Abb. 66). Die Frage ist nun, welche Zellorganellen diese Autofluoreszenz aussenden.

In Frage kämen Mitochondrien oder der Golgi-Apparat, denn diese Organellen sind um den Kern herum lokalisiert (DHAINAUT und PORCHET-HENNERÉ 1988). Die äußere Membran der Kernhülle ist mit Ribosomen besetzt (DHAINAUT 1966), diese kommen jedoch als Verursacher der Fluoreszenz nicht in Frage, da sie wesentlich kleiner sind als die beobachteten Granula. Laut DHAINAUT (1970) befindet sich nicht nur der größte Teil der Mitochondrien und des Golgi-Apparates in der Nähe des Kerns, sondern auch Zisternen des Endoplasmatischen Retikulums sind am häufigsten in der perinuklearen Zone zu finden, auch wenn sie sich manchmal in der corticalen Zone des Cytoplasmas aufhalten.

Bei unreifen Tieren (z.B. Weibchen mit Oocytengröße 55 µm, Abb. 66) sind kleinere und bei reifen Tieren (z.B. Weibchen mit Oocytengröße 160 µm, ohne Abb.) größere fluoreszierende Organellen zu finden, bei den reifen Tieren nehmen sie zudem einen größeren Raum in der Zelle ein, während sie bei den jüngeren Tieren nur einen Saum um den Kern herum bilden. Diese Beobachtungen sprechen für die Mitochondrien als fluoreszierende Strukturen, denn zumindest bei *Nereis pelagica* tritt während des Übergangs vom atoken zum epitoken Tier eine Steigerung in Anzahl und Größe der Mitochondrien auf (DHAINAUT 1966), was möglicherweise auch bei *Platynereis dumerilii* der Fall ist.

Ähnliche den Kern umgebende runde Strukturen sind auch in den „Riesen“ elaeocyten dekapitierter Tiere zu beobachten (Abb. 58b, Abb. 59, Abb. 62 bis Abb. 64). Hier handelt es sich jedoch eher um Nahrungsvakuolen mit Resten verdauter Sarkolyten und eventuell Lysosomen, die Verdauungsenzyme enthalten und mit Nahrungsvakuolen verschmelzen (siehe Abschnitt 4.6).

Bei der Antikörperfärbung mit CC 41,15, CC 59 und CC 41,14 fiel auf, daß intrazelluläre Vesikel rund um den Kern herum angefärbt wurden (Abb. 24, Abb. 25, Abb. 29b). Vielleicht wird mit einem dieser Antikörper die Membran der fluoreszierenden Organellen markiert. Abgesehen von der Lokalisierung in der Nähe des Kerns habe ich aber noch keine Hinweise darauf gefunden.

5 Zusammenfassung

Die freien Coelomzellen des Polychaeten *Platynereis dumerilii* wurden hinsichtlich ihres Entstehungsortes und anhand von verschiedenen coelomzellspezifischen Antikörpern charakterisiert.

An den Blutgefäßen, die in das Rete parapodiale dorsale führen und/oder von dort zum Dorsoparapodialgefäß verlaufen, wurde anhand von Dünnschnitten eine Elaeocyten-Proliferationszone lokalisiert und morphologisch charakterisiert. Möglicherweise gibt es noch weitere Bildungszonen für Elaeocyten an den Blutgefäßen, z.B. am Ventroparapodialgefäß. Am dorsalen und am ventralen Blutgefäß waren hingegen keine Proliferationsaktivitäten festzustellen.

An einem Blutgefäß entstehende Zellen sind zunächst flach und liegen direkt dem Gefäß auf. Sie bilden dann eine zylinderähnliche Form aus, während proximal zum Blutgefäß eine Vakuole entsteht. Wenn die Vakuole größer wird, lösen sich die Zellen aus dem Verband und werden zu frei flottierenden Elaeocyten.

Die Proliferation von Elaeocyten wurde durch Entfernen des Prostomiums und der sich daran anschließenden Pharynxregion künstlich induziert. Hierbei war ein Einfluß sowohl des Prostomiums als auch des Pharynx' nicht nur auf die Proliferation, sondern auch auf die Größe der Elaeocyten zu erkennen.

Hinter dem Pharynx dekapitierte Tiere zeigten über mehrere Tage hinweg eine kontinuierliche Vergrößerung der Elaeocyten. Bei vor dem Pharynx dekapitierten Weibchen waren in den ersten drei Tagen zunehmende, ab Tag vier wieder abnehmende Elaeocytengrößen zu beobachten. Bei Männchen hingegen blieb die Größe in den ersten drei Tagen etwa konstant und begann ab Tag vier anzusteigen.

Die extrem vergrößerten Elaeocyten der dekapitierten Tiere zeichneten sich durch einen verringerten Lipidgehalt und eine vergrößerte Vakuole aus. Diese besaß im Gegensatz zu normalen Elaeocyten keinen sauren pH-Wert. Die „Riesen“elaeocyten enthielten aufgrund ihrer intensiven Phagocytose von Muskelzell-Fragmenten (sog. Sarkolyten) zahlreiche Nahrungsvakuolen.

Zur Charakterisierung der Coelomzellen wurden gegen Coelomzellen der verwandten Art *Nereis diversicolor* entwickelte Antikörper getestet, die zum Teil auch zur Markierung der Coelomzellen von *Platynereis dumerilii* verwendet werden konnten.

Einer dieser Antikörper erkannte spezifisch die Peripherie von Lipidtropfen bei Elaeocyten und Oocyten. Andere Coelomzellantikörper markierten Membranstrukturen und intrazelluläre Kompartimente der Elaeocyten von *Platynereis dumerilii*, allerdings auch bei anderen Zelltypen (z.B. Oocyten, Spermatozyten).

Ein Teil der Antikörper färbte trotz übergreifender Zelltypspezifität nur Strukturen von Subpopulationen der Elaeocyten an. Unterschiede zwischen den Subpopulationen und die Art der markierten Strukturen konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt werden.

Aufgrund von Vorversuchen anhand von Westernblots sollte mit Hilfe eines gegen Dotterprotein (Vitellin) entwickelten Antikörpers die Dottervorstufe Vitellogenin in Elaeocyten nachgewiesen werden.

Der eingesetzte Antikörper gegen Vitellin markierte erwartungsgemäß Dottergranula in jungen Oocyten. Bei Elaeocyten beiderlei Geschlechts, bei Sarkolyten, Oocytenballen, Spermatozytenballen sowie freien Spermatozyten wurden von diesem Antikörper jedoch auch die Membranen und das Cytoplasma angefärbt.

Vitellogenin ließ sich aus diesem Grund mit dem Anti-Vitellin-Antikörper und auch mit einem weiteren, gegen Vitellogenin selbst entwickelten Antikörper nicht eindeutig in Elaeocyten nachweisen.

Bei den fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen mehrerer Coelomzellproben waren auffällig fluoreszierende, in Größe und Form Elaeocyten entsprechende Zellen zu finden, die keine Vakuole und keinen Lipidtropfen besaßen, dafür aber zahlreiche Granula unbekannter Zusammensetzung enthielten.

Die Elaeocyten von *Platynereis dumerilii* zeigten sowohl am konfokalen Mikroskop als auch bei der normalen Fluoreszenzmikroskopie eine um den Kern herum lokalisierte rote Autofluoreszenz. Möglicherweise stammt diese von den dort anzutreffenden Mitochondrien.

6 Literatur

- BAERT, J. L. (1986) Evidence for vitellin maturation within the oocytes of *Perinereis cultrifera* (Polychaete Annelid). *Comp. Biochem. Physiol.* 83B: 847-853.
- BAERT, J. L., SLOMIANNY, M. C. (1987) Heterosynthetic origin of the major yolk protein, vitellin, in a nereid, *Perinereis cultrifera* (Polychaete annelid). *Comp. Biochem. Physiol.* 88B: 1191-1199.
- BONNIER, P., BAERT, J. L. (1992) Vitellogenesis in the sandworm, *Nereis diversicolor*. *Comp. Biochem. Physiol.* 102B: 785-790.
- BONNIER, P., PORCHET-HENNERÉ, E., Baert, J. L. (1991) Identification of eleocytes as the vitellogenin producing cells in nereids. *Biol Cell* 73: 179-181.
- BÜSCHER, L. (1982) Der Einbau und die Lokalisation von Dotterprotein in Oocyten von *Nereis virens*. Diplomarbeit. Zoolog. Inst., Univ. Köln, 68 pp.
- CLAPAREDE, E. (1886) Les Annélides Chétopodes du Golfe de Naples. *Mém. Soc. Phys. Hist. Nat. Genève* 19: 313-584.
- CLARK, R. B., RUSTON, R. J. G. (1963) Time of release and action of a hormone influencing regeneration in the Polychaete *Nereis diversicolor*. *Gen Comp Endocrinol* 3: 542-553.
- CURGY, J. J., VENNIN, M., BAERT, J. L. (1987) The extra-oocyte synthesis of the egg yolk precursor, vitellogenin, in *Perinereis cultrifera* (Annelida, Polychaeta): evidence from cell-free translation of mRNA. *Biol Cell* 59: 187-192.
- DALES, R. P., DIXON, R. J. (1981) Polychaetes. In: Ratcliffe NA, Rowley AF (eds) *Invertebrate Blood Cells*. Academic Press, New York, pp 35-74.
- DEHORNE, A., DEFRETIN, R. (1933) Phagocytose active des sarcolytes amphioxes chez *Heteronereis pelagica*. *C.R. de l' Acad. des Sc.* 113: 677-680.
- DHAINAUT, A. (1966) Étude ultrastructurale de l'évolution des éléocytes chez *Nereis pelagica* L. (Annélide Polychète) à l'approche de la maturité sexuelle. *C.R. de l' Acad. des Sc.* 262: 2740-2743.
- DHAINAUT, A. (1970) Contribution à l'étude de la gamétogenèse des Néréidiens (Annélides Polychètes) dans les conditions naturelles et en l'absence d'hormone cérébrale. Thèse. Faculté des sciences, Université de Lille,
- DHAINAUT, A., PORCHET, M., FONTAINE, F. (1980) Identité immunologique et métabolique entre le liquide coelomique, les coelomocytes et les ovocytes de *Perinereis cultrifera* (Annélide Polychète). *Int. J. Invert. Reprod.* 2: 285-296.
- DHAINAUT, A., PORCHET-HENNERÉ, E. (1988) Haemocytes and coelomocytes. In: Westheide W, Hermans CO (eds) *Microfauna marina*. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, pp 216-230.
- ECKELBARGER, K. J. (1976) Origin and development of the amoebocytes of *Nicolea zostericola* (Polychaeta: Terebellidae) with a discussion of their possible role in oogenesis. *Mar. Biol* 36: 169-182.
- FISCHER, A. (1979) A vitellin-like antigen in the coelomic fluid of maturing *Nereis virens* females. *Naturwiss.* 66: 316-317.
- FISCHER, A., HOEGER, U. (1993) Metabolic links between somatic sexual maturation and oogenesis in nereid annelids - a brief review. *Adv. Invertebr. Reprod.* 23: 131-138.
- FISCHER, A., RABIEN, H., HEACOX, A. E. (1991) Specific, concentration-dependent uptake of vitellin by the oocytes of *Nereis virens* (Annelida, Polychaeta) in vitro. *J. Exp. Zool.* 260: 106-115.
- FISCHER, A., SCHMITZ, K. (1981) Preparation, properties, and composition of *Nereis* vitellin, the yolk protein of the annelid, *Nereis virens*. *Differentiation* 19: 103-108.

- FRANKE, H. D. (1980) Zur Determination der zeitlichen Verteilung von Fortpflanzungsprozessen in Laborkulturen des Polychaeten *Typosyllis prolifera*. Helgol. Meeresunters. 34: 61-84.
- HAFER, J., FISCHER, A., FERENZ, H. J. (1992) Identification of the yolk receptor protein in oocytes of *Nereis virens* (Annelida, Polychaeta) and comparison with the locust vitellogenin receptor. J. Comp. Physiol. B 162: 148-152.
- HAUENSCHILD, C. (1965) Der hormonale Einfluss des Gehirns auf die sexuelle Entwicklung bei dem Polychaeten *Platynereis dumerilii*. Gen Comp Endocrinol 6: 26-73.
- HAUENSCHILD, C. (1966) Der hormonelle Einfluß des Gehirns auf die sexuelle Entwicklung bei dem Polychaeten *Platynereis dumerilii*. Gen. Comp. Endocrinol. 6: 26-73.
- HAUENSCHILD, C., FISCHER, A. (1969) *Platynereis dumerilii*. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart
- HEACOX, A. E., SCHROEDER, P. C. (1982) The Effects of Prostomium and Proventriculus Removal on Sex Determination and Gametogenesis in *Typosyllis pulchra* (Polychaeta: Syllidae). Wilh. Roux's Arch. 191: 84-90.
- HEIL, P. (1995) Die Bereitstellung von Vitellogenin durch die Elaeozyten im Wachstumsverlauf der Oozyten bei *Nereis virens*. PhD thesis. Institut für Zoologie, University of Mainz, 120 pp.
- HOEGER, U., KUNZ, I. (1993) Metabolic enzymes in coelomic cells (eleocytes) of the polychaete *Nereis virens*: sex specific changes during sexual maturation. Mar. Biol 115: 653-660.
- HUBL, H. (1956) Über die Beziehungen der Neurosekretion zum Regenerationsgeschehen bei Lumbriciden nebst Beschreibung eines neuartigen neurosekretorischen Zelltyps im Unterschlundganglion. Wilh. Roux's Arch. 149: 73-87.
- JUGERT, F. (1986) Vergleich zwischen natürlichem Vitellin und durch Zellkulturen synthetisiertem Vitellogenin bei *Nereis virens*. Diplomarbeit. Zoolog. Inst., Univ. Köln, 112 pp.
- KAUSHAL, V., BARNES, L. D. (1986) Effect of zwitterionic buffers on measurement of small masses of protein with bicinchoninic acid. Anal Biochem 157: 291-294.
- KÖHLER, G., HOME, S. C., MILSTEIN, C. (1976) Fusion between immunoglobulin secreting and nonsecreting myeloma cell line. Eur. J. Immunol. G.: 292-295.
- KÖHLER, G., MILSTEIN, C. (1975) Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. Nature 256: 495-497.
- KYHSE-ANDERSEN, J. (1984) Electrophoretic transfer of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. J Biochem Biophys Methods 10: 203-209.
- LÄMMLI, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227: 680-685.
- LEE, H. C., EPEL, D. (1983) Changes in intracellular acidic compartments in sea urchin eggs after activation. Dev Biol 98: 446-454.
- MAHLEIN, F. (1991) Die Proliferation der Elaeocyten bei *Platynereis dumerilii* und *Nereis virens* (Annelida, Polychaeta). Diplomarbeit. Institut für Zoologie, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, 79 pp.
- MATOZZO, V., CIMA, F., PERIN, L., BALLARIN, L. (2001) Phagocytic and enzymatic activities of cells and urn cell complexes in the coelomic fluid of the marine worm *Sipunculus nudus* (Sipuncula). Italian Journal of Zoology 68: 273-280.
- O'GRADY, B. (1990) Experimentelle, immuno- und histochemische Untersuchung zur Entstehung der Gewebsspezifität in embryonalen Zell-Linien bei *Platynereis dumerilii* (Annelida, Polychaeta). Diplomarbeit. Institut für Zoologie, Johannes-Gutenberg-Universität, 58 pp.

- PORCHET, M. (1989) *Compte rendu d'activité scientifique. Endocrinologie comparée des Invertébrés*. Université des Sciences et Techniques de Lille Flandres Artois, Lille
- ROMEIS, B. (1989) *Mikroskopische Technik*. Urban & Schwarzenberg-Verlag, München-Wien-Baltimore

Die Zeichnung auf der Titelseite stammt von Frau Käthe REHBINDER.

Anhang

Tabelle 4: Übersicht über die Ergebnisse des Antikörpertests. Die mono- oder polyklonale Herkunft der Antikörper sowie die Spezifität der Antikörper bei *Nereis diversicolor* ist nur angegeben, wenn dies aus früheren Arbeiten, in denen sie verwendet wurden, hervorging (PORCHET 1989; O'GRADY 1990; MAHLEIN 1991). Die Angaben über die Spezifität bei *Platynereis dumerilii* basiert auf meinen mikroskopischen Beobachtungen (siehe Abschnitt 3.2). Die Dot Blots (siehe Abschnitt 3.4) wertete ich aus, indem ich jedem Probenpunkt ein bis vier Sterne zuteilte, je nach Stärke der Färbung im Vergleich untereinander. Dabei erhielten die am kräftigsten gefärbten Dots vier Sterne und die am schwächsten gefärbten einen Stern. Das Molekulargewicht der im Westernblot (siehe Abschnitt 3.3) aufgetretenen Banden wurde über die relative Laufstrecke mit Hilfe einer Eichgeraden errechnet. n.f. steht für nicht durchgeführte Versuche. *Ne di* steht für *Nereis diversicolor*, *Pla du* steht für *Platynereis dumerilii*.

Antikörper (Bezeichnung)	Spezifität bei <i>Nereis diversic.</i>	gefundene Spezifität bei <i>Platynereis dumerilii</i>	Dot Blot unbeh. <i>Ne di</i> ♀	Dot Blot nur SDS <i>Ne di</i> ♀	Dot Blot SDS+ Redukt. <i>Ne di</i> ♀	Banden Westernblot <i>Ne di</i> ♀	Banden Westernblot <i>Pla du</i> ♀	Banden Westernblot <i>Pla du</i> ♂
CC 11 polyklonal	Elaeocyten, Oocyten	/	***	*	*	50 kDa 38 kDa	/	193 kDa
CC 25	unbekannt	/	**	*	*	/	/	/
CC 41,12	unbekannt	Oberfläche von Oocyten	**	*	*	44 kDa 30-34 kDa (2)	/	/
CC 41,13	unbekannt	Dottergranula der Oocyten	**	*	*	44 kDa 30-34 kDa (2)	/	38 kDa
CC 41,14	unbekannt	Peripherie der Lipid- tropfen von Elaeocyten und Oocyten	***	*	*	/	/	38 kDa
CC 41,19	unbekannt	/	**	*	*	/	/	/
CC 45 polyklonal	unbekannt	/	****	**	*	166 kDa	/	/
CC 45-2	unbekannt	/	****	**	*	166 kDa	/	43 kDa 31-33 kDa (2)
CC 45,14 monoklonal	unbekannt	/	****	**	*	166 kDa	/	43 kDa
CC 1 polyklonal	Sarkolyten	Sarkolyten	**	**	**	231 kDa	110 kDa 99 kDa 68 kDa 53-57 kDa (2)	194 kDa 168 kDa 98 kDa 69-75 kDa (2)
CC 10 monoklonal	Membranen aller Coelom- zellen	Oberfläche von Oocyten	***	**	***	87 kDa 41 kDa 37 kDa 35 kDa	68 kDa 57 kDa	102 kDa 77 kDa
CC 13,612 monoklonal	Strukturen im Zellinneren von Granulocyten 3	/	***	*	*	n.f.	n.f.	n.f.
CC 30 monoklonal	Teile der Membranen aller Coelomzellen	/	**	*	*	n.f.	n.f.	n.f.
CC 41 polyklonal	unbekannt	Elaeocyten Subpopula- tion, Strukturen im Zellinneren	**	***	***	204 kDa 104 kDa 28 kDa 27-28 kDa (2)	/	102 kDa 77 kDa
CC 41,1	unbekannt	Elaeocyten Subpopu- lation, Strukturen in Zell- kernnähe	**	*	*	/	68 kDa 57 kDa	102 kDa 77 kDa
CC 41,15	unbekannt	Elaeocyten Subpopula- tion, Strukturen in Zellkernnähe, Oberfläche von Oocytenballen	**	*	*	204 kDa	68 kDa 57 kDa	102 kDa 77 kDa
CC 41,20	unbekannt	/	**	*	*	n.f.	n.f.	n.f.
CC 59 monoklonal	Mikrofilamente von Granulo- cyten 1	Elaeocyten Subpopula- tion, Strukturen in Zell- kernnähe	****	****	****	204 kDa 163 kDa 113 kDa 101 kDa 79 kDa 72 kDa 58-61 kDa (3) 37-47 kDa (5) 27-30 kDa (5)	114 kDa 106 kDa 72 kDa 70 kDa 41-67 kDa (13) 29-30 kDa (2)	215 kDa 185 kDa 176 kDa 147 kDa 102 kDa 79-92 kDa (3) 77 kDa 49-67 kDa (5) 33-34 kDa (2)
GT 52	unbekannt	Zellmembranen (u.a. Elaeocytenmembranen, Hüllzellen von Oocyten- ballen)	***	**	**	204 kDa 104 kDa 87 kDa 77 kDa	68 kDa 57 kDa	102 kDa 77 kDa

Mein Dank geht an:

- Uli Hoeger für die Bereitstellung des Themas, seine intensive persönliche Betreuung und Hilfe bei allen aufkommenden Problemen.
- Herrn Fischer für die Übernahme der Zweitkorrektur, seine wertvollen Tips zur Mikroskopiertechnik und seine Hilfe bei der Literatursuche.
- Katja Lotz für die Einweisung, Betreuung und tatkräftige Unterstützung bei allen histologischen Methoden sowie der Laserscanmikroskopie.
- Alex Heinen für die Einweisung, Betreuung und Durchführung der Gelelektrophorese- und Blot-Experimente.
- Alle Mitglieder der Arbeitsgruppe für die angenehme Atmosphäre und ihre ständige Hilfsbereitschaft.
- Meine Eltern, meine Freunde und mein Pferd für ihre Unterstützung und die nötige Ablenkung.

Hiermit erkläre ich, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt habe und nur die angegebenen Hilfsmittel verwendet habe.

Mainz, Juni 2004

Mareike Schröer