

Differentielle Zellzykluskontrolle bei Spiraliern und ihre  
Bedeutung für die Determination der Blastomeren

Dissertation zur Erlangung des Grades  
„Doktor der Naturwissenschaften“

am Fachbereich Biologie der  
Johannes Gutenberg-Universität in Mainz

Christian Heimann  
geboren in Celle  
Mainz, 2000

Jahr der mündlichen Prüfung: 2000

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b> .....	<b>6</b>
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODE</b> .....	<b>10</b>
<b>2.1</b>	<b>Chemikalien, Verbrauchsmaterialien, Lösungen und Geräte</b> .....	<b>10</b>
2.1.1	Chemikalien und Verbrauchsmaterialien.....	10
2.1.2	Lösungen und Puffer:.....	10
2.1.3	Medien für Bakterien-Zellkultur.....	11
2.1.4	Geräte .....	12
<b>2.2</b>	<b>Vermessung der Zell- und Dottervolumina früher Furchungsstadien von <i>Aplysia californica</i></b> <b>13</b>	
2.2.1	Herkunft der <i>Aplysia californica</i> - Gelege, Vereinzelung der Keime .....	13
2.2.2	Vorbereitung lebender Keime zur DIK-mikroskopischen Analyse .....	13
2.2.3	DIK-mikroskopische Analyse lebender und fixierter Keime .....	13
2.2.4	Fixierung der Keime mit Zenker-Lösung .....	14
2.2.5	Kernfärbung mit dem DNA-spezifischen Fluoreszenzfarbstoff Hoechst 33258 .....	14
2.2.6	Herstellung und Digitalisierung von Semidünnschnitten.....	14
2.2.7	Quantitative Vermessung der Semidünnschnitte, Morphometrische Berechnungen .....	14
<b>2.3</b>	<b>Bestimmung der Histon H1-Kinaseaktivität im Keim von <i>Nereis virens</i></b> .....	<b>15</b>
2.3.1	Herkunft von <i>Nereis virens</i> .....	15
2.3.2	Gewinnung und Besamung der Gameten, Fixierung der Keime.....	15
2.3.3	Herstellung von Zellhomogenaten.....	16
2.3.4	Affinitätschromatographische Aufreinigung der Cdc2/Cyclin-Kinasen .....	16
2.3.5	Bestimmung des Gesamtproteingehaltes der Zellhomogenate .....	17
2.3.6	Histon H1-Kinase Assay.....	17
<b>2.4</b>	<b>Blockierung früher Furchungsteilungen von <i>Platynereis dumerilii</i> durch Hemmung der Cdc2/Cyclin-Kinasen mit dem Cdc2-spezifischen Inhibitor Olomoucine</b> .....	<b>18</b>
2.4.1	Hälterung von <i>Platynereis dumerilii</i> in Laborkultur.....	18
2.4.2	Inkubation von Furchungsstadien mit Olomoucine.....	18
2.4.3	Kernfärbung mit dem DNA-spezifischen Fluoreszenzfarbstoff Hoechst 33258 .....	19
2.4.4	Mikroskopische Analyse der Morphologie und des Verhaltens behandelter Keime .....	19
2.4.5	Analyse der Expression des neuronalen Markers Acetylcholinesterase (AChE).....	19
<b>2.5</b>	<b>Test der Kreuzreaktivität von Antikörpern gegen zellzyklusregulierende Proteine verschiedener Organismen mit <i>Platynereis dumerilii</i>-Proteinen</b> .....	<b>19</b>
2.5.1	Fixierung von Entwicklungsstadien.....	19
2.5.2	Herstellung von Zellhomogenaten.....	20
2.5.3	Affinitätschromatographische Aufreinigung der Cdc2/Cyclin-Kinasen .....	20
2.5.4	Nachweis zellzyklusregulierender Proteine über DISC-SDS-PAGE und Immunoblotting .....	21
<b>2.6</b>	<b>Molekularbiologische Standardtechniken</b> .....	<b>21</b>
2.6.1	Alkoholische Fällung von Nukleinsäuren.....	21
2.6.2	Entfernung von Proteinresten aus Nukleinsäure-Lösungen .....	22
2.6.3	Quantifizierung von RNA- und DNA-Präparationen .....	22
2.6.4	Horizontale Agarosegelelektrophorese zur Auftrennung von Nukleinsäuren.....	22
2.6.5	Präparation von Nukleinsäuren aus Agarosegelen oder proteinhaltigen Lösungen.....	23
2.6.6	Sequenzspezifisches Schneiden von DNA mit Restriktionsendonukleasen .....	23
2.6.7	Kultivieren von <i>Escherichia coli</i> -Bakterien .....	24
2.6.8	Transformation von <i>Escherichia coli</i> -Bakterien mit Plasmiden .....	25
2.6.9	Präparation von Plasmiden aus transformierten <i>Escherichia coli</i> -Bakterien .....	26
<b>2.7</b>	<b>Techniken zur Isolierung, Aufreinigung und Verarbeitung von RNA</b> .....	<b>26</b>
2.7.1	Herstellung RNase-freier Lösungen, Materialien und Geräte.....	26
2.7.2	Präparation von <i>Platynereis</i> -Gelegen zur Extraktion der Gesamt-RNA.....	26
2.7.3	Gesamt-RNA Extraktion aus <i>Platynereis dumerilii</i> -Embryonen.....	27
2.7.4	Aufreinigung von poly(A)-RNA aus Gesamt-RNA von <i>Platynereis dumerilii</i> .....	27
2.7.5	Reverse Transkription von <i>Platynereis dumerilii</i> poly(A)-RNA in cDNA.....	28

<b>2.8</b>	<b>Nukleinsäureamplifikation mit der Polymerase-Kettenreaktion (PCR)</b> .....	<b>29</b>
2.8.1	Allgemeine Angaben zur Durchführung der PCR .....	29
2.8.2	Herkunft und Design der degenerierten und spezifischen PCR-Primer .....	30
2.8.3	RT-PCR Amplifizierung von <i>Platynereis dumerilii</i> -Genfragmenten aus mRNA .....	32
2.8.4	Amplifizierung von Genfragmenten aus $\lambda$ -ZAP-cDNA-Banken .....	33
2.8.5	Amplifizierung von Genfragmenten aus Bakteriensuspensionen .....	33
2.8.6	Amplifizierung von Genfragmenten aus Plasmidpräparationen .....	33
<b>2.9</b>	<b>Klonierung und Sequenzierung von <i>Platynereis</i>-PCR-Fragmenten</b> .....	<b>33</b>
2.9.1	Klonierung des <i>Platynereis dumerilii</i> wee1-PCR-Fragments .....	33
2.9.2	Klonierung des <i>Platynereis dumerilii</i> Cyclin 1-PCR-Fragments .....	37
2.9.3	Amplifizierung eines Cyclin B und eines Cdc25-Fragmentes .....	39
<b>2.10</b>	<b>Isolation des <i>Platynereis dumerilii</i> wee1-Gens aus embryonalen cDNA-Banken</b> .....	<b>40</b>
2.10.1	Konstruktion embryonaler cDNA-Banken von <i>Platynereis dumerilii</i> .....	40
2.10.2	Digoxigeninmarkierung des wee1-PCR-Fragmentes zur Verwendung als Sonde .....	41
2.10.3	Isolierung des <i>Platynereis dumerilii</i> wee1-Gens aus der 45min $\lambda$ -ZAP™ II cDNA-Bank mit dem Digoxigenin-markierten wee1 <sup>328</sup> -Fragment .....	41
2.10.4	“ <i>in vivo</i> Excision” des Plasmids pBluescript aus den isolierten $\lambda$ -ZAP-Klonen .....	42
<b>2.11</b>	<b>Sequenzierung und Sequenzanalyse der <i>Platynereis</i> Gene</b> .....	<b>44</b>
2.11.1	Sequenzierung der klonierten PCR-Fragmente .....	44
2.11.2	Sequenzierung der isolierten wee1-positiven pBluescript-Plasmide .....	45
2.11.3	Sequenzanalyse .....	45
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE</b> .....	<b>47</b>
<b>3.1</b>	<b>Volumetrische Vermessung und fluoreszenzmikroskopische Analyse früher Furchungsstadien von <i>Aplysia californica</i></b> .....	<b>47</b>
3.1.1	Volumetrische Vermessung der frühen Furchungsstadien .....	47
3.1.2	Analyse der frühen Furchungsteilungen von <i>Aplysia californica</i> .....	50
<b>3.2</b>	<b>Molekulare Komponenten des G2/M-Kontrollpunktes in Embryonen von <i>Platynereis dumerilii</i> und <i>Nereis virens</i></b> .....	<b>56</b>
3.2.1	Nachweis eines mitotischen Cyclins und zweier Cdc2-Isoformen in Furchungsstadien von <i>Platynereis dumerilii</i> .....	57
	- <i>Cyclin-Antikörper</i> .....	58
	- <i>Cdc25-Antikörper</i> .....	64
	- <i>PSTAIR- (Cdc2-) Antikörper</i> .....	65
	- <i>Verwendbarkeit der getesteten Antikörper</i> .....	66
3.2.2	Die Histon H1-Kinaseaktivität der Cdc2/Cyclin-Kinasen im Keim von <i>Nereis virens</i> wird zellzyklusabhängig moduliert .....	68
3.2.3	Der Cdc2-spezifische Hemmstoff Olomoucine blockiert reversibel die Furchungsteilungen im <i>Platynereis</i> -Embryo .....	70
<b>3.3</b>	<b>Klonierung und Sequenzierung von zellzyklusregulierenden Genen von <i>Platynereis dumerilii</i></b> .....	<b>78</b>
3.3.1	Herstellung embryonaler cDNA-Banken .....	78
	- <i>Auswahl der Stadien</i> .....	78
	- <i>Die Qualität der hergestellten cDNA-Banken</i> .....	80
3.3.2	Klonierung eines PCR-Fragmentes und des vollständigen Gens der <i>Platynereis</i> Wee1-Proteinkinase .....	84
	- <i>Klonierung und Amplifizierung eines wee1-PCR-Fragmentes</i> .....	84
	- <i>Isolierung des vollständigen wee1-Gens aus einer embryonalen cDNA-Bank</i> .....	84
3.3.3	Amplifizierung und Klonierung eines PCR-Fragmentes des <i>Platynereis</i> Cyclin 1- (Cyclin E-) Gens .....	92
3.3.4	Amplifizierung eines PCR-Fragmentes des <i>Platynereis</i> Cyclin B-Gens .....	94
3.3.5	Amplifizierung eines PCR-Fragmentes des <i>Platynereis</i> cdc25- (string-) Gens .....	97

<b>4</b>	<b>DISKUSSION</b> .....	<b>98</b>
<b>4.1</b>	<b>Determination des D-Quadranten und der dorsoventralen Körperachse bei <i>Aplysia californica</i></b> .....	<b>98</b>
4.1.1	Autonome versus induktive Determination .....	98
4.1.2	Zellzyklusregulatoren als mögliche Determinanten.....	103
<b>4.2</b>	<b>Mögliche Bedeutung der differentiellen Zellzyklusregulation bei der Evolution der Spiraliere</b> .....	<b>106</b>
4.2.1	Zellzyklusasynchronien und D-Quadrant Determination bei äqual furchenden Spiraliern.....	107
4.2.2	Zellzyklusasynchronien und D-Quadrant Determination bei inäqual furchenden Spiraliern .....	110
4.2.3	Künftige Experimente zur Überprüfung der Rolle der Zellzyklusregulation bei der Determination der Blastomeren .....	115
<b>4.3</b>	<b>Die molekulare Regulation der embryonalen Furchungsteilungen von <i>Platynereis dumerilii</i></b> .....	<b>117</b>
4.3.1	Änderungen in der Teilungsabfolge der Blastomeren führen zu schweren Störungen des Determinationsprozesses .....	118
4.3.2	MPF ( <i>m-phase promoting factor</i> ).....	121
4.3.3	Cdc2 .....	122
4.3.4	Cyclin B .....	124
4.3.5	Cdc25 .....	128
4.3.6	Wee1 .....	129
4.3.7	Cyclin E .....	131
<b>4.4</b>	<b>Schlußbetrachtung</b> .....	<b>132</b>
<b>5</b>	<b>LITERATUR</b> .....	<b>133</b>
<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	<b>144</b>
<b>7</b>	<b>ANHÄNGE</b> .....	<b>146</b>
7.1	Bezeichnung der Gene, Genfragmente, Plasmide und ?-ZAP-Klone.....	146
7.2	Einbuchstabencode für die Aminosäuren.....	147
7.3	Tagungsbeiträge .....	148
7.4	Veröffentlichungen .....	149
<b>8</b>	<b>DANKSAGUNG</b> .....	<b>153</b>

# 1 Einleitung

Die ersten zwei Furchungsteilungen zerteilen das Ei von Spiraliern<sup>1</sup> in vier Blastomeren (A, B, C und D), deren Nachkommen jeweils einen embryonalen Quadranten ausbilden. Die embryonalen Quadranten haben eine feste Lagebeziehung zur dorsoventralen Körperachse. Bei Mollusken und Anneliden gibt es einen dorsalen (D), einen ventralen (B) und zwei laterale Quadranten (A und C). Bei den anschließenden Furchungsteilungen schnüren die vier Gründerzellen der embryonalen Quadranten in einem festgelegten zeitlichen und geometrischen Muster jeweils eine neue Generation von Mikromeren zum animalen Pol hin ab. Diese Mikromerenquartette werden je nach Generationszeitpunkt als 1a-1d, 2a-2d, 3a-3d etc. bezeichnet. Aufgrund der hohen Präzision, mit der dieses Furchungsmuster bei jedem Keim einer Art eingehalten wird, sowie den immer gleichen, vorhersagbaren Entwicklungsschicksalen der Blastomeren wurden Spiraliierkeime früher als "Mosaikkeime" beschrieben (Wilson 1928, Schleip 1929). Es wurde also angenommen, daß das Entwicklungsschicksal der Blastomeren allein aufgrund ihrer Herkunft vorherbestimmt sei und daß Zell-Zell-Interaktionen bei der Determination der Zellen keine bzw. nur eine untergeordnete Rolle spielen. Inzwischen gibt es jedoch zahlreiche experimentelle Befunde, die belegen, daß Spiraliierkeime ein hohes regulatives Potential aufweisen (Dorresteyn *et al.* 1987, Dorresteyn und Eich 1991 für einen Polychaeten, Luetjens und Dorresteyn 1995 für einen Mollusken). In der Tat wird das Entwicklungsschicksal sehr vieler Blastomeren nicht oder zumindest nicht allein aufgrund ihrer Herkunft, sondern vielmehr aufgrund ihrer Position im Keim bestimmt oder modifiziert. Dabei wirken insbesondere zwei Zellen aus dem D-Quadranten (3D, 4d) als Organisatoren, die über Zell-Zell-Kontakte das Schicksal benachbarter Blastomeren bestimmen und ein dorsoventral polarisiertes und bilateralsymmetrisches Muster der Organanlagen entstehen lassen (Clement 1962, Cather und Verdonk 1979, Martindale 1986, Damen und Dictus 1996). Die Position des D-Quadranten legt also die dorsoventrale Körperachse fest, weil dieser Quadrant das Koordinatensystem liefert, anhand dessen die anderen Blastomeren positionsgerecht spezifiziert werden. Die Determination des D-Quadranten ist also das initiale Ereignis, sowohl für die Etablierung der dorsoventralen Körperachse, als auch in der Folge für die positionsgerechte Determination und Differenzierung der Blastomeren.

---

<sup>1</sup> Mit der Ausnahme der Duettfurchung der acoelen Plathelminthen

Bei Mollusken und Anneliden sind zwei Mechanismen zur Determination des D-Quadranten nachgewiesen (van den Biggelaar und Guerrier 1983, Dorresteijs und Fischer 1988). Bei äqual furchenden Keimen sind die vier embryonalen Quadranten gleich groß und ihre Entwicklungspotenz ist zunächst gleichwertig. Die Zellteilungen homologer Blastomeren in den vier Quadranten verlaufen außerdem synchron. Nach der fünften Furchungsteilung verlängern sich die Zellzyklen aller Blastomeren dramatisch, so daß über einen längeren Zeitraum hinweg keine weiteren Furchungen stattfinden. Diese sogenannte Ruhephase (*resting stage*) ist aber in Wirklichkeit eine Phase der zellulären Dynamik. Während dieser Phase nimmt eine der Makromeren am vegetalen Pol eine zentrale Position im Embryo ein und wird über eine induktive Interaktion mit den darüberliegenden animalen Mikromeren als Mesentoblast-Mutterzelle 3D determiniert<sup>2</sup>. Als Ausdruck dieser Determination schnürt die 3D-Makromere bei der anschließenden, nun asynchronen sechsten Furchungsteilung die mesodermale Stammzelle 4d (=Mesentoblast) ab (van den Biggelaar und Guerrier 1979, Arnolds *et al.* 1983, Boring 1989).

Bei inäqual furchenden Spiraliern hingegen entstehen durch die ersten beiden inäqualen Furchungsteilungen von vorne herein vier unterschiedlich große Blastomeren. Die Asymmetrie der Furchungsteilungen kommt dabei entweder als Folge einer Spindelverschiebung aus der Zellmedianen oder durch die Bildung eines kernlosen Pollappens und dessen Verschmelzen mit einer der beiden Tochterzellen zustande (Verdonk und van den Biggelaar 1983, Dorresteijs und Fischer 1988). Die größte dieser vier Blastomeren enthält überproportional viel dotterfreies Zytoplasma. Morphogenetische Faktoren innerhalb dieses Zytoplasmas determinieren diese Zelle als Gründerzelle des D-Quadranten und damit als Stammzelle des Mesentoblasten 4d (Cather *et al.* 1976, Guerrier *et al.* 1978, Astrow *et al.* 1987, Dorresteijs *et al.* 1987, Dorresteijs und Eich 1991). Das Schicksal des D-Quadranten korreliert bei inäqual furchenden Spiraliern also mit einem besonders hohen Gehalt an dotterfreiem Zytoplasma.

Der Gehalt an dotterfreiem Zytoplasma bestimmt nicht nur das Schicksal der Blastomeren, sondern korreliert darüber hinaus auch mit der Dauer der Zellzyklen. Für die Polychaeten *Platynereis dumerilii* (Dorresteijs 1990), *Platynereis massiliensis* (Schneider *et al.* 1992)

---

<sup>2</sup> Strenggenommen steht der experimentelle Beweis für eine induktive Determination des D-Quadranten bei äqual furchenden Anneliden wie *Podarke* (Treadwell 1901) noch aus. Mehrere Autoren (Freeman und Lundelius 1992, van den Biggelaar und Haszprunar 1996, van den Biggelaar *et al.* 1997, Boyer und Henry 1998) gehen aber aufgrund der übereinstimmenden Furchungsmodi und übereinstimmender Zell-Zellkontakte davon aus, daß dieser Determinationsmodus auch für äqual furchende Anneliden zutrifft.

sowie *Pomatoceros triqueter* (Dorresteijn und Luetjens 1994) und für die Muschel *Dreissena polymorpha* (Luetjens und Dorresteijn 1995) konnte dieser Zusammenhang durch exakte zeitliche und volumetrische Vermessung quantifiziert werden. Diese Analysen zeigten, daß weder das Blastomerenvolumen noch das Kern/Plasmaverhältnis, sondern die Ausstattung mit dotterfreiem Zytoplasma mit der Zellzyklusgeschwindigkeit der Blastomeren korreliert: d.h. je mehr dotterfreies Zytoplasma eine Blastomere enthält, desto kürzer ist ihr Zellzyklus. Diejenigen Zellen des D-Quadranten, welche besonders viel dotterfreies Plasma enthalten, teilen sich demzufolge besonders rasch und eilen den Blastomeren anderer Zelllinien weit voraus. Der Zusammenhang zwischen der reichen Ausstattung mit dotterfreiem Zytoplasma und der raschen Proliferation des D-Quadranten ist auch bei anderen Spiraliern mit inäqualer Furchung beobachtet worden (Bissen und Weisblat 1989, Shimizu 1993 für Clitellaten). Dorresteijn und Mitarbeiter (Dorresteijn *et al.* 1987, Dorresteijn und Eich 1991) haben experimentell *Platynereis*-Keime erzeugt, bei denen nicht einer, sondern zwei embryonale Quadranten große Mengen an dotterfreiem Zytoplasma erhalten. Auch bei diesen künstlich veränderten Keimen teilten sich die plasmareichen Blastomeren beider großer Quadranten besonders rasch und entwickeln sich auch sonst D-Quadrant typisch. Bei inäqual furchenden Spiraliern ist also das Entwicklungsschicksal des D-Quadranten mit besonders kurzen Zellzyklen korreliert. Beides hängt unmittelbar von der überproportionalen Ausstattung des D-Quadranten mit dotterfreiem Zytoplasma ab.

Wir meinen, daß die bei Spiraliern beobachteten Teilungsasynchronien zwischen den Blastomeren keine mehr oder weniger zufälligen Begleiterscheinungen, sondern integrativer Bestandteil des Determinationsgeschehens sind. Insbesondere halten wir es für möglich, daß die rasche Proliferation der Zellen des D-Quadranten Voraussetzung für die korrekte Etablierung der dorsoventralen Körperachse und damit auch für die positionsabhängige Determination benachbarter Blastomeren ist.

In der vorliegenden Arbeit habe ich die Rolle einer differentiellen Zellzykluskontrolle bei *Platynereis dumerilii*, *Nereis virens* und *Aplysia californica* mit molekularbiologischen und zellbiologischen Methoden analysiert. Zum einen wurden frühe Furchungsstadien von *Aplysia californica* volumetrisch präzise vermessen. *Aplysia* gehört zu den ganz wenigen Spiraliern mit inäqualer erster Furchungsteilung, bei deren Keimen nicht der größte, sondern einer der kleineren Quadranten zum D-Quadranten wird. Meine Untersuchungen sollen zeigen, ob für *Aplysia* dieselben Zusammenhänge zwischen der reichen Ausstattung



mit dotterfreiem Zytoplasma, kurzen Zellzyklen und dem Schicksal des D-Quadranten gelten, wie sie für andere inäqual furchende Spiraler beschrieben sind. Daraus erhoffen wir uns Klarheit, inwieweit die differentielle Zellzyklusregulation tatsächlich für die Determination des D-Quadranten bei inäqual furchenden Spiraliern von allgemeiner Bedeutung ist.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit ist es, die Regulation der embryonalen Zellzyklen von *Platynereis dumerilii* auf molekularer Ebene zu analysieren. Wir wollen so verstehen lernen, wie die unterschiedlichen Proliferationsraten der Blastomeren zustande kommen. Es sollen Möglichkeiten gefunden werden, die Zellzyklen individueller Blastomeren im Keim zu verändern, um so die Rolle der Zellzyklusregulation für die Determination der Blastomeren und die Morphogenese des Keimes zu studieren.

Über die molekulare Kontrolle der embryonalen Zellzyklen bei Spiraliern liegen bisher nur sehr wenige Untersuchungen vor. Die Arbeiten von André van Loon und seinen Mitarbeitern über die Zellzykluskontrolle bei dem äqual furchenden Keim des Mollusken *Patella vulgata* konzentrieren sich dabei auf die meiotischen Teilungen während der Eireifung (van Loon *et al.* 1991), die Phase der synchronen Furchungsteilungen (van der Kooij *et al.* 1998, 1995) und den Zellzyklusarrest in den differenzierenden Trochoblasten (van der Kooij *et al.* 1998, 1995). In der Arbeitsgruppe von André van Loon wurde auch der bislang einzige erfolgreiche Versuch unternommen, die Dauer der embryonalen Zellzyklen bei Spiralerkeimen zu verändern (Colas *et al.* 1993). Die Autoren interessierten sich dabei aber nicht für die Folgen bei der Determination im *Patella* Keim, sondern für die Funktion des *sucl*-Proteins bei der Zellzykluskontrolle im allgemeinen.

Die differentielle Regulation bei asynchronen Zellzyklen wurde bislang nur an dem Keim des Egels *Helobdella* von Shirley Bissen und Mitarbeitern untersucht. In diesem Keim werden die Transkripte von Cyclin A (Chen und Bissen 1997) und Cdc25 (Bissen 1995) zelllinienspezifisch unterschiedlich reguliert. Inwieweit die Zellzyklusasynchronien bei der Determination der Blastomeren im Egelkeim eine Rolle spielen ist bislang allerdings noch völlig offen (für Übersichtsartikel siehe Bissen 1997).

Paterson *et al.* (1998) verdanken wir die bislang einzige Notiz über die Identifizierung von Cyclin B, Cdc2 und die Regulation der MPF-Aktivität während der meiotischen Reifeteilungen bei den Keimen zweier Polychaeten (*Nereis virens*, *Arenicola marina*).

Mit meiner Arbeit soll deshalb auch eine Lücke in unserem Verständnis über die Kontrolle der embryonalen Zellzyklen bei Spiralerkeimen geschlossen werden.

## 2 Material und Methode

### 2.1 Chemikalien, Verbrauchsmaterialien, Lösungen und Geräte

#### 2.1.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Versuche wurden in fünf verschiedenen Laboratorien durchgeführt (Universität Mainz: Institut für Zoologie (AG Fischer) und Institut für Medizinische Mikrobiologie (AG Streeck), Tokyo Institute of Technology (AG Kishimoto), Station Biologique de Roscoff (AG Meijer), Rijksuniversiteit Utrecht (AG van Loon)), welche ihre Chemikalien und Verbrauchsmaterialien von einer Vielzahl verschiedener Firmen bezogen. Deshalb wird im Methodenteil nur die Herkunft einzelner, für den Erfolg der Methoden besonders wichtiger Chemikalien und Verbrauchsmaterialien angegeben. Generell wurden nur reinste Chemikalien (Analytical Grade) verwendet.

#### 2.1.2 Lösungen und Puffer:

Soweit nicht anders angegeben, wurden alle aufgeführten Lösungen mit Reinstwasser (Hergestellt über eine MilliQ-Anlage, Millipore) angesetzt und autoklaviert.

AChE-Färbelösung (Acetylcholinesterase, Dorresteijs *et al.* 1993): 0,5mg/ml Acetylthiocholinjodid (Sigma: A-751) in 65mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 65mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> pH 6,7-6,8, 50mM Trinatrium-Citrat, 3mM CuSO<sub>4</sub>, 0,5mM Kaliumhexacyanoferrat (III)

ATP\*-Lösung: 40µl [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P] ATP (74MBq/ml, 110TBq/mmol, Amersham: PB168), 60µl ATP (1mM in Kinase-Assay-Puffer), 900µl Kinase-Assay-Puffer

CSB-Puffer (nach Chomczynski und Sacchi 1987): 42mM Natriumcitrat, 0,83% N-Lauryl-Sarcosin, 0,2mM 2-Mercaptoethanol

Extraktionspuffer I (verändert nach Meijer und Pondaven 1988): 60mM Na-β-Glycerolphosphat, 15mM p-Nitrophenylphosphat, 25mM MOPS (3-[N-Morpholino] Propansulfonsäure) pH 7,2, 15mM EGTA, 15mM MgCl<sub>2</sub>, 2mM Dithiothreitol, 1mM Na-ortho-Vanadat, 1mM NaF, 1mM Phenylphosphat, 10µg/ml Leupeptin, 10µg/ml Aprotinin, 10µg/ml SBTI (*soybean trypsin inhibitor*), 100µM Benzamidin

Extraktionspuffer II (nach Ookata *et al.* 1992): 80mM Na-β-Glycerolphosphat, 20mM EGTA, 15mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM Dithiothreitol, 20µg/ml Leupeptin, 0,3mM Phenylmethansulfonylfluorid, pH 7,3

GTC-Extraktionspuffer (nach Chomczynski und Sacchi 1987): 25g Guanidinthiocyanat in 33ml CSB-Puffer (nicht noch einmal autoklavieren, frisch angesetzt einige Tage haltbar)

H1-Kinase-Assay-Lösung: Histon H1-Lösung: ATP\*-Lösung: Kinase-Assay-Puffer [1:1:1]

Histon H1-Lösung: 5mg/ml Histon H1 (Typ III S, Sigma) in Kinase-Assay-Puffer

Kinase-Assay-Puffer: 60mM  $\beta$ -Glycerolphosphat, 30mM p-Nitrophenylphosphat, 25mM MOPS (3-[N-Morpholino] Propansulfonsäure) pH 7,0, 5mM EGTA, 15mM  $MgCl_2$ , 1mM Dithiothreitol, 0,1mM Na-Vanadat

mRNA-Elutionspuffer: 20mM Tris pH 7,6, 500mM NaCl, 1mM EDTA

MTS-Fa: 3,5% Formaldehyd in MTS-Puffer

MTS-Hoechst: 10 $\mu$ g/ml Hoechst 33258 (Sigma: B-2883) in MTS-Puffer

MTS-Puffer (*microtubule stabilizing buffer* nach Shimizu 1993): 30mM KCl, 5mM  $MgCl_2$ , 5mM EGTA, 10mM Pipes (1,4-Piperazin-Diethanesulfonsäure) pH 6,9

NA-Probenpuffer, 6fach (*nucleic acid*-Probenpuffer): 15% Ficoll (Typ 400, Pharmacia), 0,25% Bromphenolblau (Merck: 8122), 0,25% Xylencyanol FF (Fluka: 956000)

PBS (*phosphate buffer saline*): 137mM NaCl, 2,7mM KCl, 8mM  $Na_2HPO_4$ , 1,5mM  $KH_2PO_4$

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

SDS-PAGE-Probenpuffer (Laemmli 1970) 2fach-konzentriert: 20% Glycerin, 125mM Tris pH 6,8, 4% SDS, 0,002% Bromphenolblau (Merck: 8122), 10%  $\beta$ -Mercaptoethanol (Mercaptoethanol erst nach dem Autoklavieren kurz vor Gebrauch zugeben)

Sepharose-Waschpuffer (Meijer und Pondaven 1988): 50mM Tris-HCl pH 7,4, 5mM NaF, 250mM NaCl, 5mM EDTA, 5mM EGTA, 0,1% NP-40, 10 $\mu$ g/ml Leupeptin, 10 $\mu$ g/ml Aprotinin, 10 $\mu$ g/ml SBTI, 100 $\mu$ M Benzamidin

SM-Puffer: 5,8g NaCl, 2g  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 50mM Tris-HCl pH 7,5, 0,01% Gelatine in 1l Reinstwasser

TAE-Puffer: 40mM Tris-acetat, 1mM EDTA

TBE-Puffer: 90mM Tris pH 8,0, 90mM Borsäure, 2mM EDTA

TBS (*Tris buffer saline*): 50mM Tris pH 7,5, 150mM NaCl

TE-Puffer: 10mM Tris pH 8,0, 1mM EDTA

TFB-Puffer: 10mM MES (2-[N-Morpholino] Ethansulfonsäure) pH 6,0, 100mM RbCl, 45mM  $MnCl_2$ , 10mM  $CaCl_2$ , 3mM Hexaminkobaltchlorid ( $[Co(NH_3)_6]Cl_3$ )

Zenker-Lösung: 1g  $K_2Cr_2O_7$  (Kaliumdichromat), 1g  $Na_2SO_4$ , 5g HgCl und 5% Eisessig auf 100ml (Eisessig erst kurz vor Gebrauch hinzufügen)

### 2.1.3 Medien für Bakterien-Zellkultur

Alle unten angegebenen Medien wurden autoklaviert:

LB-Medium: 0,5% Hefe-Extrakt (Life Technologies: 30393-029), 1,0% Peptone 140 (Life Technologies: 30392-021), 1,0% NaCl

LB-Agar: 1,5% Bakto-Agar (Life Technologies: 30391-023) in LB-Medium

LB-Topagar: 0,7% Agarose (Bio Tech Trade & Service GmbH: HL-4-1312L) in LB-Medium

NZY-Medium: 0,5% Hefe-Extrakt, 1,0% Peptone 140, 0,5% NaCl, 0,2%  $MgCl_2 \cdot 7H_2O$

NZY-Agar: 1,5% Bakto-Agar in NZY-Medium

NZY-Topagar: 0,7% Agarose in NZY-Medium

SB-Medium: 2,0% Hefe-Extrakt, 3,5% Peptone 140, 0,5% NaCl

SOB-Medium: 0,5% Hefe-Extrakt, 2,0% Peptone 140, 0,05% NaCl, 2,5mM KCl, 10mM MgSO<sub>4</sub>

SOC-Medium: 10mM Glucose in SOB-Medium

#### 2.1.4 Geräte

Autoklaven: Melag: Modell 23; Integra Biosciences: Technoclav 50; KSG-GmbH: Typ 113

Blotting-Kammer: Millipore: Milliblot SDE, P15655

Elektrophoresekammern:

*Flachbett:* LMS GmbH Labortechnik: 9,5x 10cm; Institutswerkstatt (Eigenherstellung): 6x9cm

*Vertikal:* Hoefer Scientific Instruments: Vertical Electrophorese Unit SE 600

Bakterien-Inkubatoren:

*Inkubator:* Heraeus-Inkubator: B5050E

*Schüttelinkubator:* Braun Melsungen: Schüttler Certomat R mit Inkubationshaube Certomat HK

Kameras

*Kleinbildkamera:* Olympus OM4-Ti

*Sofortbildkamera:* Polaroid: CRT-Instant Camera TA 40

Mikroskope:

*DIK-Mikroskop:* Axioskop (Zeiss, Jena) mit Normarski-Optik für Differential Interferenzkontrast

*Epifluoreszenz-:* Axioplan (Zeiss, Jena) mit Quecksilberdampfampe (HBO 50W)

*Stereomikroskop:* Heerbrugg, Schweiz: Wild M3C

Netzgerät: Pharmacia: GPS 200/400; ECPS 3000/150; Biometra: Power Pack P25

PCR-Gerät: MJ-Research Inc.: DNA-Engine Peltier Thermal Cycler PTC 200;  
Perkin Elmer: Thermocycler

pH-Meter: Wissenschaftliche Technische Werkstätten: WTW pH 522; Schott-Geräte: CG 852

Spektralphotometer: Perkin Elmer: 522 UV-Vis; Kontron: Uvicon 860

Ultramikrotom: Reichert: OmU3

Ultraschallgerät: Branson: Sonifier Cell Disruptor B15; Braun: Labsonic 1510

UV-Transilluminator: Bachofer: IL 200M (302nm)

Vakuumtrockner: Bachofer: BA-VC 300H mit Kühlfalle KF-10

Video Systeme:

*Geldokumentation:* Cybertech: Video Gel-Dokumentationssystem CS1

*CCD-Videokamera:* Panasonic: WV-BL 600

*Videoaufnahmegerät:* Panasonic: S-VHS Timelapse AG-6720

Waagen:

*Analysenwaagen:* Mettler: AE 100; Sartorius: R2000

*Laborwaagen:* Mettler: PM 2000; Sartorius: L610

Wasserbäder:

*Heiz- und Kühl-WB:* MGW Lauda: RM6; Grant Instruments: Modell W14

*Heizwasserbad:* Braun: Frigomix 1495

*Schüttelwasserbad:* Labortechnik mbH: Typ 1083

Zentrifugen:

*Kühlzentrifugen:* Heraeus: Minifuge RF; Hettich: Rotanta/RP; Du Pont Instruments: Sorvall RC-SB

*Tischzentrifugen:* Heraeus: Biofuge Pico; Eppendorf: Modell 5415

## **2.2 Vermessung der Zell- und Dottervolumina früher Furchungsstadien von *Aplysia californica***

### 2.2.1 Herkunft der *Aplysia californica* - Gelege, Vereinzelung der Keime

Im Sommer 1995 erhielt ich von HD Dr. Theyke (Institut für Neurobiologie, Universität Mainz) einige Gelege von *Aplysia californica* (Gastropoda, Opisthobranchia). Die geschlechtsreifen Tiere wurden für ein neurophysiologisches Praktikum in künstlichem Seewasser gehalten und mit Salat gefüttert. Die Schnecken klebten ihre Gelege in Form von Eischnüren an die Aquarienwände. Diese konnten mit der Hand leicht abgelöst werden.

Bei sehr frischen, noch nicht vollständig ausgehärteten Gelegen, war es möglich, die Keime aus den Eischnüren zu befreien. Dazu wurden die Eischnüre mit einer Schere in kurze Stücke zerschnitten und mit Pasteurpipetten, deren Spitzen scharfkantig abgebrochen waren, wiederholt kräftig auf- und abgesogen. Dadurch wurde die Eigallerte zerrissen und die Eier aus den Kapseln in der Eischnur befreit.

Die ausgehärteten Gelege waren hingegen sehr widerstandsfähig und ließen sich auch mit dem Skalpell kaum zerschneiden. Nach mehrtägiger Fixierung in Zenker-Lösung ließen sich jedoch auch aus den ausgehärteten Eischnüren die einzelnen Embryonen wie beschrieben befreien.

### 2.2.2 Vorbereitung lebender Keime zur DIK-mikroskopischen Analyse

Einzelne Keime ( $\varnothing \sim 70 \mu\text{m}$ ) wurden in einem Tropfen natürlichen Seewasser auf Objektträger übertragen. Um die Verdunstung niedrig zu halten, wurde der Tropfen mit einem Ring aus flüssigem Paraffin umgeben. Durch schmale Deckglasstreifen zwischen dem Objektträger und dem Deckgläschen wurden die Keime vor dem Zerdrücken geschützt. Die so vorbereiteten Keime wurden unter einem DIK-Mikroskop auf einem gekühlten ( $18^\circ\text{C}$ ) Objektträgertisch (Zeiss, Jena) analysiert.

### 2.2.3 DIK-mikroskopische Analyse lebender und fixierter Keime

Differential Interferenzkontrast - (DIK-) Aufnahmen lebender und fixierter Keime wurden unter einem DIK-Mikroskop über eine angeschlossene Kleinbildkamera auf 64ASA

Farbdiafilm (Kodak) oder s/w-Negativfilm (25ASA Agfa Pan, 40ASA Copex Pan) dokumentiert.

#### 2.2.4 Fixierung der Keime mit Zenker-Lösung

Einzelne Keime oder auch ganze Abschnitte der Eischnüre wurden für mindestens eine Stunde in Zenker-Lösung fixiert und anschließend zweimal 5min mit PBS-gewaschen.

#### 2.2.5 Kernfärbung mit dem DNA-spezifischen Fluoreszenzfarbstoff Hoechst 33258

Zur Färbung der Kerne wurden die in Zenker-Lösung fixierten Keime zweimal 5min in MTS-Puffer gewaschen, für eine Stunde in MTS-Hoechst gefärbt, erneut zweimal 5min in MTS gewaschen und zuletzt in PBS-DABCO-Glycerin überführt und auf einen Objektträger gegeben. Durch schmale Deckglasstreifen zwischen dem Objektträger und dem Deckgläschen wurden die Keime vor dem Zerdrücken geschützt. Durch vorsichtiges Verschieben des Deckgläschens war es möglich, die Keime zu orientieren.

Die Auswertung der Keime erfolgte unter einem Epifluoreszenz-Mikroskop. Über eine angeschlossene Kleinbildkamera wurden die Fluoreszenzaufnahmen (380nm Anregungswellenlänge, Filterkombination BP365, FT395, LP397) auf 400ASA s/w-Negativfilm (Fuji: Neopan Presto; Kodak: TMAX 400pro) aufgenommen. DIK-Aufnahmen derselben Keime wurden entweder auf dem gleichen Filmmaterial oder über eine zweite Kleinbildkamera auf s/w-Negativfilm (25ASA Agfa Pan, 40ASA Copex Pan) aufgenommen.

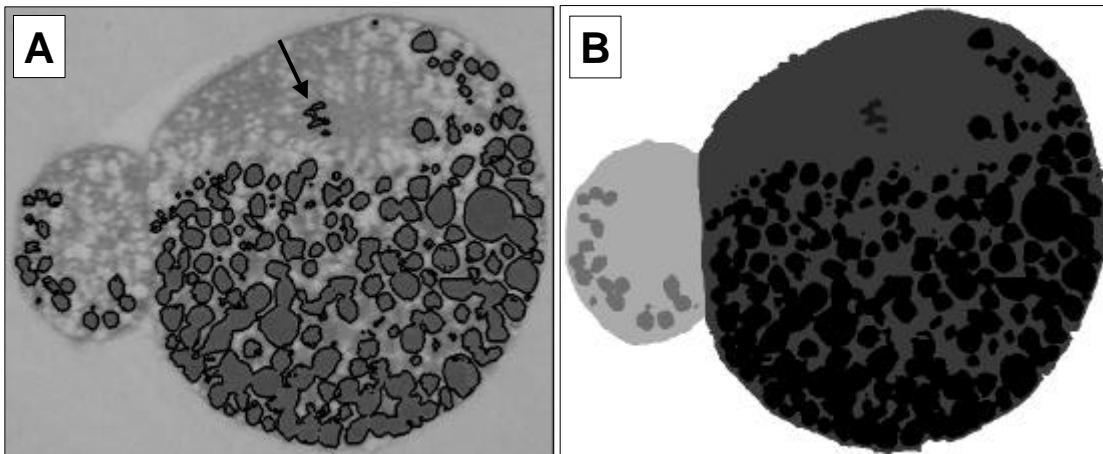
#### 2.2.6 Herstellung und Digitalisierung von Semidünnschnitten

In Zenker-Lösung fixierte Keime wurden zweimal in PBS gewaschen und in 0,7%iger Agarose orientiert. Die Agaroseblöckchen mit den Embryonen wurden anschließend über eine Alkoholreihe entwässert und schließlich in Araldit (Glauert *et al.* 1965) eingebettet. Mit einem Ultramikrotom wurden Schnittserien mit einer Schichtdicke von 1µm hergestellt, auf Objektträger aufgebracht und mit Methylenblau/Azur II (Richardson *et al.* 1960) eingefärbt.

#### 2.2.7 Quantitative Vermessung der Semidünnschnitte, Morphometrische Berechnungen

Die Semidünnschnitte wurden unter einem DIK-Mikroskop mit einer CCD-Videokamera über ein Videoaufnahmegerät unter Verwendung des EDV-Softwareprogramms SIS („Soft-Imaging-Software“ Version PIP 2.2, SIS Münster) auf einen angeschlossenen IBM-kompatiblen PC übertragen, kontrastverstärkt und gespeichert. Mit dem Bildbearbeitungsprogramm „Photoshop“ (Vers. 5.0, Adobe Systems Inc.) wurden die Umrisse der Blastomeren per Hand und die Konturen der Dottergrana mit Hilfe des Filters „Konturwerte fin-

den...“ nachgezeichnet (Abbildung 1A). Anschließend wurde den Flächen der unterschiedlichen Strukturen (Plasma, Dotter, Kerne) verschiedene Grauwerte zugeordnet (Abbildung 1B). Mit der „Treshold“-Funktion von „Image Tools for Windows“ (Vers. 1.28, UTHSCSA) wurde dann für jeden Grauwert (also jede Struktur) die Zahl der Pixel bestimmt. Digitalisierte Objektmikrometeraufnahmen dienten zur Eichung der Messung und ermöglichten die Umrechnung der „Pixel“ in „ $\mu\text{m}^2$ “. Über die vermessenen Flächenwerte und die bekannte Schnittdicke konnten die Volumina der Blastomeren, ihr Gehalt an Dotter und dotterfreiem Zytoplasma berechnet werden.



**Abbildung 1: Ein repräsentativer Schnitt durch ein 2-Zellstadium von *Aplysia*.** Mit Hilfe des Photoshop Filters „Konturwerte finden...“ konnten die Dottergrana, aber auch die Mitosechromosomen (Pfeil) präzise umrissen werden (A). Nachdem die Zellkonturen per Hand nachgezeichnet waren, wurden die unterschiedlichen Strukturen mit verschiedenen Grauwerten ausgemalt (B). Für jeden Grauwert wurde die Anzahl der Pixel bestimmt und in „ $\mu\text{m}^2$ “ umgerechnet. Weitere Erläuterungen im Text.

## 2.3 Bestimmung der Histon H1-Kinaseaktivität im Keim von *Nereis virens*

### 2.3.1 Herkunft von *Nereis virens*

Schwärbereite Exemplare des marinen Polychaeten *Nereis virens* wurden Anfang April 1993 in der Oosterschelde (Niederlande) gefangen, in feuchten Torf eingebettet und gekühlt innerhalb weniger Stunden nach Mainz transportiert.

### 2.3.2 Gewinnung und Besamung der Gameten, Fixierung der Keime

Die Oocyten und Spermien wurden durch Aufschneiden der reifen Würmer gewonnen. Die Oocyten wurden zunächst dreimal mit pasteurisiertem natürlichen Seewasser (NSW) gewaschen und anschließend mit einer verdünnten Spermisuspension besamt. Um überzählige Spermien zu entfernen, wurden die Oocyten dann erneut dreimal mit NSW gewa-

schen. Die Keime entwickelten sich bei 20°C. Unter diesen Bedingungen setzte die erste Furchungsteilung ca. 190min nach Besamung ein. Die Intervalle zwischen den Furchungen dauerten jeweils etwa 60min. Alle 30min wurden große Portionen von Keimen in 2ml-Kryogefäßen (Nalgene) gesammelt, kurz abzentrifugiert und nach dem Absaugen des überschüssigen Wassers in flüssigem Stickstoff fixiert.

### 2.3.3 Herstellung von Zellhomogenaten

Die N<sub>2</sub>-fixierten Keime wurden auf Trockeneis nach Roscoff (Frankreich) transportiert und dort an der „Station Biologique“ im Labor von Dr. Laurent Meijer weiterverarbeitet. Unmittelbar vor der Verwendung wurde zu den noch gefrorenen Embryonen das zweifache Volumen an Extraktionspuffer I hinzugefügt und die Keime viermal 30sec mit Ultraschall homogenisiert. Die festen Bestandteile der Zellhomogenate wurden anschließend 10min lang bei 12000g und 4°C abzentrifugiert. Je 1/5-Volumina der Überstände wurden zur späteren Bestimmung des Proteingehaltes (2.3.5) bei 4°C aufbewahrt. Die verbliebenen 3/4-Volumina der Überstände wurden, in zwei Portionen aufgeteilt, zur Isolierung der Cdc2/Cyclin-Kinasen verwendet (2.3.4).

### 2.3.4 Affinitätschromatographische Aufreinigung der Cdc2/Cyclin-Kinasen<sup>3</sup>

*Einführung:* Das Hefe p13<sup>suc1</sup>-Protein bzw. sein humanes Homologon p9<sup>CKShs1</sup> binden spezifisch an das Cdc2-Protein (Endicott und Nurse 1995) und sind zumindest an der Regulation der Cdc2/Cyclin B-Kinase (=MPF) beteiligt (Brizuela *et al.* 1987, Colas *et al.* 1993). Koppelt man p13<sup>suc1</sup> oder p9<sup>CKShs1</sup> an CNBr-aktivierte Sepharose, so kann ihre spezifische Bindungseigenschaft genutzt werden, um das Cdc2-Protein mit allen assoziierten Proteinen (Cyclin A, Cyclin B) aus Zellhomogenaten (auch anderer Spezies!) zu isolieren (Azzi *et al.* 1992).

*Vorbereitung der p9<sup>CKShs1</sup>-Sepharose:* 10µl gepackte p9<sup>CKShs1</sup>-Sepharose (3,9mg/ml, ausreichend für ~50µg Gesamtprotein) wurden dreimal mit 500µl Sepharose-Waschpuffer gewaschen und anschließend in einem, den Zellhomogenaten entsprechenden, Volumen Sepharose-Waschpuffer resuspendiert. Die p9<sup>CKShs1</sup>-Sepharose (Azzi *et al.* 1992) habe ich von Dr. Laurent Meijer erhalten.

*Aufreinigung der Cdc2/Cyclin-Kinasen aus den Zellhomogenaten:* Die Zellhomogenate (2.3.3) wurden zu der gewaschenen p9<sup>CKShs1</sup>-Sepharose hinzugefügt, bei 4°C für 30-60min

---

<sup>3</sup> Als Cdc2/Cyclin-Kinasen wird in dieser Arbeit die Summe der Komplexe aus Cdc2/Cyclin A und Cdc2/Cyclin B verstanden. Die Cdc2/Cyclin B-Kinase wird auch als MPF (*m-phase promoting factor*) bezeichnet



unter steter Rotation (z.B. Drehscheibe Apelex 113030, Apelab, Frankreich) inkubiert und anschließend in einer Tischzentrifuge kurz abzentrifugiert. Nachdem der Überstand entfernt war, wurden die Sepharose-Pellets mit den gebundenen Cdc2/Cyclin-Kinasen dreimal mit je 500µl Sepharose-Waschpuffer gewaschen. Nachdem der letzte Waschüberstand sorgfältig entfernt war, wurde die gebundene Histon H1-Kinase Aktivität bestimmt (2.3.6).

### 2.3.5 Bestimmung des Gesamtproteingehaltes der Zellhomogenate

*Standards:* Als Standard-Lösungen wurden 0, 20, 40, 60, 80, 100, 250, 500, 750, 1000µg/ml Rinder-Serumalbumin (BSA) in Reinstwasser verwendet.

*Proteinfällung mit Trichloressigsäure:* Da einige Bestandteile des Extraktionspuffers mit dem optischen Protein-Assay interferieren, war es notwendig, zunächst die Proteine zu fällen und in Reinstwasser zu überführen. Die für die Proteinbestimmung reservierten Zellhomogenate (2.3.3) wurden mit Reinstwasser auf 50µl aufgefüllt. Anschließend wurden die verdünnten Zellhomogenate (bzw. 50µl der Standards) mit 9,8µl 0,1%iger-Na<sub>2</sub>-Deoxycholat-Lösung versetzt, gründlich gemischt und 15min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Proteine mit 69µl 24%iger-Trichloressigsäure gefällt. Nach gründlichem Mischen wurden die Proben in einer Tischzentrifuge 30min bei maximaler Geschwindigkeit (~14000g) abzentrifugiert. Die weißen Protein-Pellets wurden je zweimal mit 100µl Aceton gewaschen und zuletzt in 50µl Reinstwasser resuspendiert.

*Bestimmung des Proteingehaltes:* Die 50µl resuspendierter Proteine wurde mit je 1ml Assay-Lösung („BCA Protein Assay Reagent“, Pierce: No. 23225) für 30min bei 36°C inkubiert und kurz abzentrifugiert. Sofort im Anschluß wurde die Absorption des Überstandes bei 562nm in einem Spektralphotometer bestimmt. Der Gesamtproteingehalt der Proben ergab sich durch Vergleich mit den BSA-Standards und diente als Maß für die Anzahl der in der Probe verarbeiteten Embryonen.

### 2.3.6 Histon H1-Kinase Assay

Die an p9<sup>CKShs1</sup>-Sepharose gebundenen Cdc2/Cyclin-Kinasen (2.3.4) wurden für 10min bei 30°C in 30µl H1-Kinase-Assay-Lösung (mit Histon H1 als Substrat und [<sup>32</sup>P]ATP als Phosphatdonor) inkubiert. Dabei wird je nach Aktivitätszustand der Cdc2/Cyclin-Kinasen mehr oder weniger Histon H1 durch Übertragung des <sup>32</sup>-Phosphatrestes aus dem ATP phosphoryliert und damit radioaktiv markiert. Anschließend wurden die Ansätze kurz abzentrifugiert und 25µl der Überstände auf je ein 2,5x3cm<sup>2</sup> großes Phosphozellulose-Filterpapier (Whatman: P81) aufgeträufelt. Die Filterpapiere wurden fünfmal 5min in 1%iger-Phosphorsäure gewaschen. Zum einen wurde so das Histon gefällt und an das Fil-

terpapier gebunden, und zum anderen wurde freies [ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ]ATP ausgewaschen. Anschließend wurden die Filter zusammen mit 5ml Szintillator-Flüssigkeit (BCS, Amersham: NBCS104) in ein 6ml-Szintillatorgefäß überführt. Die an die Filterpapiere gebundene, durch Phosphorylierung auf Histon H1 übertragene, Radioaktivität wurde in einem Packard-Counter gemessen und diente als Maß für die Histon H1-Kinase-Aktivität [cpm/min\* $\mu\text{l}$ ]. Als Kontrollen wurden (a) ein Filterpapier nur mit H1-Kinase-Assay-Lösung und (b) reine Szintillator-Flüssigkeit gemessen.

Weil die ursprünglichen Zellhomogenate unterschiedliche Mengen an Keimen enthielten (erkennbar an unterschiedlichen Gehalten an Gesamtprotein 2.3.5), waren auch unterschiedliche Mengen der Cdc2/Cyclin-Kinasen an der  $\text{p9}^{\text{CKShs1}}$ -Sephrose gebunden. Diese Unterschiede wurden aus den gemessenen Histon H1-Kinase Aktivitäten herausgerechnet.

## **2.4 Blockierung früher Furchungsteilungen von *Platynereis dumerilii* durch Hemmung der Cdc2/Cyclin-Kinasen mit dem Cdc2-spezifischen Inhibitor Olomoucine**

### 2.4.1 Hälterung von *Platynereis dumerilii* in Laborkultur

Der marine Polychaet *Platynereis dumerilii* wird in Laborkultur nach Hauenschild und Fischer (1969) gehalten und gezüchtet. Die Methoden zur Gewinnung, Besamung und Handhabung der Embryonen sind von Dorresteijn (1990) ausführlich beschrieben worden. Innerhalb eines Geleges entwickeln sich die Keime vollkommen synchron.

### 2.4.2 Inkubation von Furchungsstadien mit Olomoucine

Aus einer 100mM-Stammlösung wurden die verschiedenen Olomoucine-Konzentrationen durch Verdünnen mit natürlichem Seewasser (NSW) erreicht. In einem ersten Versuch wurden unbesamte Eizellen durch Aufschneiden eines reifen Weibchens gewonnen. Die Oocyten wurden in natürlichem Seewasser mit 0, 100, 500 und 1000 $\mu\text{M}$  Olomoucine (erhalten von Dr. Laurent Meijer) zunächst 5min vorinkubiert und anschließend mit einer verdünnten Spermienlösung besamt. Als die Kontrollkeime das 4-Zellstadium erreichten, wurden die behandelten Keime mehrfach in NSW gewaschen, um das Olomoucine wieder aus dem Seewasser zu entfernen. Die weitere Entwicklung der Embryonen wurde noch 24h in NSW beobachtet.

In einem zweiten Versuch wurden *Platynereis*-Embryonen im 4-Zellstadium (alle Kerne in der Interphase) mit 0, 50, 100, 200 $\mu\text{M}$  Olomoucine in NSW inkubiert. Als die Kontroll-

keime das 16-Zellstadium erreicht hatten, wurden die Keime mehrfach mit NSW gewaschen und ohne Olomoucine noch 3 Tage weiter aufgezogen.

#### 2.4.3 Kernfärbung mit dem DNA-spezifischen Fluoreszenzfarbstoff Hoechst 33258

Mit Beginn der Olomoucine-Inkubation bis etwa eine Stunde nach der Behandlung wurden alle 30min kleine Aliquots von Keimen in MTS-Fa fixiert, um anschließend ihre Kerne mit dem DNA-spezifischen Fluoreszenzfarbstoff Hoechst 33258 einzufärben und auszuzählen (2.2.5).

#### 2.4.4 Mikroskopische Analyse der Morphologie und des Verhaltens behandelter Keime

24h und 48h alte Trochophorae wurden in Glycerin:Eisessig:Wasser (1:1:1) fixiert und unter einem DIK-Mikroskop analysiert. Parallel wurde auch das Bewegungsverhalten solcher lebender Larven *in vivo* unter einem Stereomikroskop notiert.

#### 2.4.5 Analyse der Expression des neuronalen Markers Acetylcholinesterase (AChE)

Kontroll- und Olomoucine-behandelte Keime wurden nach 72h mittels kleiner Nylonnetze (Maschenweite 100µm) aus dem Seewasser gesiebt und für 2min in kaltem Ethanol (96%, 0-4°C) fixiert. Dabei wurde permanent frisches kaltes Ethanol in das Sieb mit den Keimen geträufelt. Anschließend wurden die Keime in die AChE-Färbelösung überführt. Nach einer Inkubationszeit von drei bis vier Stunden bei 37°C wurde die Farbreaktion in 50%igem Ethanol gestoppt. Die Keime wurden über eine alkoholische Reihe dehydriert, dann in Xylol und schließlich in Canada-Balsam (Merck: 1691) überführt und mikroskopisch analysiert (2.2.3).

## **2.5 Test der Kreuzreaktivität von Antikörpern gegen zellzyklusregulierende Proteine verschiedener Organismen mit *Platynereis dumerilii*-Proteinen**

### 2.5.1 Fixierung von Entwicklungsstadien

Aus einem sich synchron entwickelnden Gelege von *Platynereis dumerilii* (2.4.1) wurden in regelmäßigen Zeitintervallen je zwei Aliquots (zu je etwa 100 Keimen) in 1,5ml-Reaktionsgefäße überführt, kurz abzentrifugiert, vom überschüssigen Wasser befreit und entweder in flüssigem Stickstoff oder MTS-Fa fixiert. Die N<sub>2</sub>-fixierten Proben wurden in flüssigem Stickstoff aufbewahrt, auf Trockeneis nach Japan überführt und am „Tokyo Institute of Technology“ (Yokohama) im Labor von Dr. Takeo Kishimoto zum Nachweis der

zellzyklusregulierenden Proteine verwendet (2.5.2 bis 2.5.4). Die korrespondierenden MTS-Fa fixierten Proben wurden bei 4°C aufbewahrt und in Japan mit dem DNA-spezifischen Fluoreszenzfarbstoff Hoechst 33258 gefärbt und ausgewertet (2.2.5). Sie dienen dazu, die Zellzyklusphase der korrespondierenden N<sub>2</sub>-fixierten Keime zu bestimmen.

### 2.5.2 Herstellung von Zellhomogenaten

- (a) Sollten die zellzyklusregulierenden Proteine in Gesamthomogenaten nachgewiesen werden, wurden die in Stickstoff fixierten Keime (~40-50µl gepacktes Zellvolumen) direkt mit je 15µl 4x-SDS-PAGE-Probenpuffer für 30sec mit Ultraschall homogenisiert. Die festen Bestandteile dieser Gesamthomogenate wurden anschließend für 5min bei 3000g und 4°C abzentrifugiert. 10µl der Überstände wurden für die Bestimmung des Proteingehaltes verwendet (2.3.5). Die restlichen Überstände wurden über DISK-SDS-PAGE und Immunoblotting analysiert (2.5.4).
- (b) Alternativ wurden die in Stickstoff fixierten Keime wie in Kapitel 2.3.3 beschrieben homogenisiert und weiterverarbeitet. Es wurde jedoch ein etwas anderer Puffer zur Extraktion der Cdc2/Cyclin-Kinasen eingesetzt (500mM NaCl in Extraktionspuffer II). Bei dieser Variante wurde aus den Homogenatüberständen zunächst die Cdc2-Kinase isoliert (2.5.3) und erst die gereinigte Kinase mittels DISK-SDS-PAGE und Immunoblotting (2.5.4) analysiert. Dabei wurden je 1/5-Volumina der Überstände wie in Kapitel 2.3.5 beschrieben zur Bestimmung des Proteingehaltes reserviert.

### 2.5.3 Affinitätschromatographische Aufreinigung der Cdc2/Cyclin-Kinasen

Die Aufreinigung der Cdc2/Cyclin-Kinasen erfolgte im wesentlichen wie in Kapitel 2.3.4 beschrieben. Hier wurde jedoch p13<sup>suc1</sup>-Sephrose (Ookata *et al.* 1992) in einer Suspension von 5mg/ml (10µl reichen aus für ~50µg Gesamtprotein) verwendet, die ich von Dr. Takeo Kishimoto erhielt. Zur Vorbereitung der unbenutzten p13<sup>suc1</sup>-Sephrose wurde in diesem Fall Extraktionspuffer II verwendet. Bei der Aufreinigung der Cdc2/Cyclin-Kinasen wurden ungebundene Proteine mit 750mM NaCl in Extraktionspuffer II heruntergewaschen. Die an die p13<sup>suc1</sup>-Sephrose gebundenen Cdc2/Cyclin-Kinasen wurde mit 50µl 2x-SDS-PAGE-Probenpuffer abgelöst und zur DISK-SDS-PAGE mit anschließendem Immunoblotting eingesetzt (2.5.4).

#### 2.5.4 Nachweis zellzyklusregulierender Proteine über DISC-SDS-PAGE und

##### Immunoblotting

*Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (DISC-SDS-PAGE):* Abhängig vom Gesamtproteingehalt der Zellhomogenate (2.3.5) wurden unterschiedliche Volumina (aber gleiche Proteinmengen und damit gleiche Mengen an Keimen) der in SDS-PAGE-Probenpuffer gelösten Proben (2.5.2a, 2.5.3) auf ein diskontinuierliches Polyacrylamidgel (Sammelgel 5%, Trenngel 10%) aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte in einer vertikalen Elektrophoresekammer entweder bei konstant 8mA über Nacht oder bei 25mA in 30-45min. Eine Spur jedes Geles wurde mit Proteinstandards („Prestained SDS-PAGE Standards, low range“, Bio Rad: 161-0305) beschickt, die Molekulargewichte von 196, 107, 76, 52, 36,8 bzw. 27,2 kDa aufwiesen. Dadurch war es möglich, die Molekulargewichte der aufgetrennten *Platynereis dumerilii*-Proteine abzuschätzen.

*Immunoblotting:* Die im SDS-Gel aufgetrennten Proteine wurden in einer halbtrockenen Blotting-Kammer bei 120mA für 30min auf eine Nitrozellulosemembran (0,1µm, Schleicher & Schuell: 402060; oder 0,45µm, Advantec: A045A2240) übertragen. Die an die Nitrozellulosemembran gebundenen Proteine wurden mittels verschiedener primärer Antikörper markiert und mit Alkalische-Phosphatase-gekoppelten sekundären Antikörpern (Tabelle 17, Seite 58) und dem „BCIP/NBT-Phosphatase Substrat System“ (Kirkegaard & Perry: 50-81-00) sichtbar gemacht.

Die DISC-SDS-PAGE und die Western Blot-Methode wurden von Sambrook *et al.* (1989) ausführlich beschrieben.

## **2.6 Molekularbiologische Standardtechniken**

### 2.6.1 Alkoholische Fällung von Nukleinsäuren

Nukleinsäuren wurden nach Sambrook *et al.* (1989) in Anwesenheit moderater Konzentrationen monovalenter Kationen mit Alkohol gefällt:

In Reinstwasser oder TE-Puffer gelöste Nukleinsäuren wurden durch Zugabe von 1/10-Volumen 3M-Na-Acetat-Lösung (pH 5,2) zunächst mit Salzen angereichert und anschließend mit zwei Volumina 96%igem-Ethanol (oder einem Volumen Isopropanol) bei -20°C über Nacht gefällt. In dieser Form konnten die Nukleinsäuren bei -20°C oder -80°C bis zur Verwendung gelagert werden. Vor Gebrauch wurden die Lösungen dann in einer Tischzentrifuge für 30-45min bei maximaler Geschwindigkeit (~14000g) abzentrifugiert. Nach dem Entfernen des Überstandes wurde das Nukleinsäure-Pellet mit 70%igem Ethanol

(-20°C) gewaschen, anschließend an der Luft oder im Vakuum Konzentratortrocknet und, wenn nicht anders angegeben, in Reinstwasser oder TE-Puffer resuspendiert.

### 2.6.2 Entfernung von Proteinresten aus Nukleinsäure-Lösungen

Proteine wurden je nach Protokoll entweder (a) mit einem Volumen Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (1:1:1), oder (b) mit einem Volumen Phenol:Chloroform (1:1) oder (c) nacheinander mit je einem Volumen Phenol, Phenol:Chloroform (1:1) und Chloroform extrahiert (äquilibriertes Roti-Phenol pH 7,5, Roth: 0038.2). Nach Zugabe der organischen Lösungsmittel wurde die Probe jeweils für 10sec kräftig geschüttelt und 15min auf Eis inkubiert. Die Trennung der Phasen erfolgte in einer Tischzentrifuge bei 4°C und maximaler Geschwindigkeit (~14000g) für 20min. Die obere wässrige Phase mit den Nukleinsäuren wurde anschließend in ein sauberes Reaktionsgefäß überführt und in der Regel mit Alkohol gefällt (2.6.1), um Reste der organischen Lösungsmittel zu entfernen.

### 2.6.3 Quantifizierung von RNA- und DNA-Präparationen

Die Konzentration von RNA- oder DNA-Proben (gelöst in TE-Puffer oder Reinstwasser) wurde photometrisch bestimmt (Spektralphotometer), indem von einem Aliquot die optische Dichte bei 260nm (OD<sub>260</sub>) gemessen wurde. Die Umrechnungsfaktoren für RNA, doppelsträngige DNA und einzelsträngige DNA betragen bei dieser Wellenlänge 40, 50 bzw. 33µg/ml/OD-Einheit. Zur Berechnung des Gehaltes an Nukleinsäuren wurde folgende Formel angewendet:

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

Die DNA-Konzentrationen kleinster Proben wurden dagegen mit einem semiquantitativen Verfahren bestimmt. Dabei wurden von der DNA-Probe und von DNA-Standards (10, 25, 50, 75, 100, 150 und 200ng/µl linearisiertes Plasmid) je 1µl auf eine Ethidiumbromid-haltige Agaroseplatte (0,8% Agarose, Roth: 2267.3 und 1µg/ml EthBr, Serva: 21238 in TAE-Puffer) pipettiert. Nach 10-15min waren alle Tropfen absorbiert und die Intensität ihrer Lichtemissionen konnte auf einem UV-Transilluminator verglichen werden.

### 2.6.4 Horizontale Agarosegelelektrophorese zur Auftrennung von Nukleinsäuren

Die Auftrennung von Nukleinsäuren erfolgte durch horizontale Agarosegelelektrophorese (nach Sambrook *et al.* 1989) in einer Flachbett-Gelelektrophoresekammer. Je nach Größe

der aufzutrennenden DNA-Moleküle wurden 0,5-1,2%ige Agarosegele (Roth: 2267.3) mit 0,2µg/ml Ethidiumbromid (Serva: 21238) in TAE-Puffer angesetzt. Nach der Größe der aufzutrennenden DNA-Moleküle richtete sich auch der verwendete Größenmarker (Tabelle 1), der zusammen mit den Proben auf das Gel aufgetragen wurde. Die Nukleinsäureproben wurden mit 1/5-Volumen 6fach NA-Probenpuffer versetzt, in die Probenaschen des Gels pipettiert und bei 80-100V getrennt, bis der vorderste Farbmarker des NA-Probenpuffers eine Strecke von etwa 2/3 des Gels zurückgelegt hatte. Zur Auftrennung von RNA-Molekülen wurden alle Lösungen und die Elektrophoresekammer RNase-frei vorbereitet (2.7.1). Die Nukleinsäurebanden wurden im Anschluß an den Gellauf auf einem UV-Transilluminator sichtbar gemacht und mit einer Sofortbildkamera oder einem Video Gel-Dokumentationssystem dokumentiert.

**Tabelle 1: DNA-Längenmarker für die horizontale Agarosegelelektrophorese.** Die DNA von Klonierungsvektoren wurde mit sequenzspezifischen Restriktionsendonukleasen in ein Set spezifischer DNA-Fragmente mit bekannter Länge aufgespalten.

Vektor-DNA <sup>1)</sup>	Restriktionsendonukleasen	Fragmentlängen [Bp]
?-DNA	<i>EcoR</i> I, <i>Hind</i> III:	21226, 5148, 4973, 4277, 3530, 2027, 1904, 1584, 1330, 983, 831, 564, 125
pGEM <sup>®</sup> -Zf(+)	<i>Hae</i> III:	587, 458, 434, 324, 314, 289, 267, 174, 142, 102, 80, 18, 11
pUC18	<i>Hae</i> III:	587, 458, 434, 286, 267, 257, 179, 102, 80

<sup>1)</sup> für Lieferanten siehe Tabelle 3

### 2.6.5 Präparation von Nukleinsäuren aus Agarosegelen oder proteinhaltigen Lösungen

Zu präparativen Zwecken wurden einzelne Nukleinsäurebanden mit einer Rasierklinge aus dem Agarosegel (2.6.4) geschnitten und mit dem JetSorb-Extraktionskit (Genomed: 110150) nach Herstellerangabe aus der Agarose herausgelöst. Mit diesem Kit ließen sich auch Nukleinsäuren aus proteinhaltigen Lösungen aufreinigen und konzentrieren.

### 2.6.6 Sequenzspezifisches Schneiden von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Es wurden Restriktionsendonukleasen (=Restriktionsenzyme) der Firmen MBI-Fermentas, Boehringer Mannheim und New England Biolab verwendet. In den Restriktionsansätzen wurden die von den Herstellern zu jedem Enzym mitgelieferten 10x-Reaktionspuffer eingesetzt. In der Regel wurden 30µl-Ansätze aus 1µg DNA, 3µl 10x-Reaktionspuffer, 3U Restriktionsenzym in Reinstwasser angesetzt und bei der für die jeweilige Nuklease optimalen Temperatur für eine Stunde im Wasserbad inkubiert. Für größere Ansätze wurden die Komponenten entsprechend hochskaliert.

**Tabelle 2: Verwendete *E. coli*-Bakterien und geeignete Selektionsmedien.** Die Bakterien wurden in der Regel in LB-Flüssigmedium oder auf LB-Agarplatten mit zugesetztem Antibiotikum kultiviert.

<i>E. coli</i> -Stamm	Lieferant	Selektionsmedien	Verwendung
XL1-Blue MRF'	Stratagene	LB mit 12,5µg/ml Tetracyclin	cDNA-Banken, Transformation
SOLR™	Stratagene	LB mit 50µg/ml Kanamycin	cDNA-Banken
TOP10	Invitrogene	LB mit 30µg/ml Streptomycin	Transformation
TOP10 F'	Invitrogene	LB mit 12,5µg/ml Tetracyclin	Transformation
Dh5αF'	Life Technologies	LB mit 15µg/ml Nalidixic acid	Transformation

**Tabelle 3: Klonierungsvektoren (Plasmide, ?-Vektoren) und Helferphagen.** Die angegebenen Antibiotika entsprechen den Resistenzgenen, welche die jeweiligen Plasmide tragen. Zur Amplifikation der Vektoren wurden die angegebenen Bakterien mit den Plasmiden transformiert, bzw. mit den Bakteriophagen transfiert. Die Plasmidvektoren tragen Antibiotikaresistenzen. Der Zusatz der korrespondierenden Antibiotika zum Kulturmedium ermöglichte die Selektion für transformierte Bakterien.

Vektoren	Lieferant	Amplifikation in ...	Selektionsmedien
<i>Plasmidvektoren:</i>			
pGEM 3 Zf(+)	Promega	XL1-Blue MRF', Dh5αF'	LB mit 50µg/ml Ampicillin
pBluescript SK(-)	Stratagene	XL1-Blue MRF', Dh5αF'	LB mit 50µg/ml Ampicillin
pZerO™-2 <sup>1)</sup> - ohne Insert	Invitrogene	TOP10 F'	LB mit 50µg/ml Kanamycin
- mit Insert		TOP10	LB mit 50µg/ml Kanamycin
pUC18	MBI-Fermentas	XL1-Blue MRF', Dh5αF'	LB mit 50µg/ml Ampicillin
<i>Bakteriophagen:</i>			
?-Wildtyp DNA	MBI-Fermentas	-	-
?-ZAP™ II-Vektor	Stratagene	XL1-Blue MRF'	-
ExAssist™	Stratagene	XL1-Blue MRF'	-

<sup>1)</sup> Der Klonierungsvektor pZerO-2 enthält das für Bakterien lethale *ccdB*-Gen (*control of cell death*) unter der Kontrolle des induzierbaren *lac*-Promotors ( $P_{lac}$ ). Dieser Vektor kann deshalb nur in solchen Zellen amplifiziert werden, die den *lac*-Repressor überexprimieren (*lacI<sup>q</sup>*) wie z.B. TOP10F'. Durch Einklonieren eines DNA-Fragments in diesen Vektor wird die Expression von *ccdB* inhibiert und die Amplifizierung in anderen Bakterienstämmen möglich.

### 2.6.7 Kultivieren von *Escherichia coli*-Bakterien

*E. coli*-Bakterien (Stämme s.u.) wurden nach Sambrook *et al.* (1989) in Flüssigmedien oder auf Agarplatten kultiviert. Die Rezeptur der Medien wurde leicht verändert (2.1.3). Die verwendeten Bakterienstämme tragen Antibiotika-Resistenzgene auf ihren Chromosomen. Die Reinheit der Bakterienstämme konnte deshalb durch Zusatz entsprechender Antibiotika zu den Medien gewährleistet werden. Trugen die Bakterien Plasmide, so richtete sich das zur Selektion verwendete Antibiotikum nach dem Resistenzgen des Plasmides (Selektionsmedien siehe Tabelle 2 und Tabelle 3).

*Bakterien-Stammpplatten:* *E. coli*-Bakterien wurden vor Gebrauch aus Bakterien-Dauerkulturen (s.u.) oder von einer älteren Stammpplatte mit Hilfe einer sterilen Impföse auf Se-



lektionsagar (s.o.) ausgestrichen und bei 37°C in einem Inkubator kultiviert bis einzelne Kolonien sichtbar wurden (ca. 16h, über Nacht).

*Bakterien-Flüssigkulturen:* Eine einzelne Kolonie von einer Bakterien-Stammpolte wurde mit einer Impföse in ein steriles Inkubationsgefäß (Falcon-Zentrifugenröhrchen oder Erlenmeyerkolben mit Schraubverschluß) mit Selektionsmedium übertragen. Die Kultivierung erfolgte auf einem Schüttelinkubator bei 37°C. Das Wachstum der Bakterienkulturen wurde gegebenenfalls durch Messen der optischen Dichte bei 600nm ( $OD_{600}$ , vgl. 2.6.3) kontrolliert.

*Bakterien-Dauerkulturen:* Eine einzelne Kolonie von einer Bakterien-Stammpolte wurde in 10ml Selektionsmedium (s. o.) über Nacht bis zu einer  $OD_{600} > 1$  kultiviert und mit 4,5ml Glycerin:LB-Medium (1:1) versetzt. In 1ml-Aliquots wurden die Bakterien bei -80°C eingefroren und gelagert.

#### 2.6.8 Transformation von *Escherichia coli*-Bakterien mit Plasmiden

*Herstellen transformationskompetenter Bakterienzellen:* Der Zustand der "Kompetenz", während dessen Bakterien in der Lage sind Fremd-DNA aufzunehmen (Transformation), wird erreicht durch verschiedene Behandlungen, deren Wirkmechanismen bis heute nicht verstanden sind. Dazu gehören „Hitzeschock“, zweiwertige Kationen, DMSO (Dimethylsulfoxid), DTT (Dithiothreitol), Hexaminkobaltchlorid und reduzierende Agenzien. Die erreichte Effizienz hängt außerdem vom verwendeten *E. coli*-Stamm und der Qualität der Chemikalien ab. Hier wurde auf das Protokoll von Hanahan (1983) zurückgegriffen.

0,5ml einer 5ml-Flüssigkultur von *E. coli*-Bakterien (XL1-Blue MRF', TOP10F', TOP10 oder Dh5aF') wurden in 25ml SOB-Medium überimpft und bis zu einer  $OD_{600}$  von 0,5 kultiviert (2.6.7), 15min auf Eis abgekühlt und anschließend 10min bei 200g in einer Kühlzentrifuge abzentrifugiert. Die pelletierten Bakterien wurden in 4ml kaltem TFB-Puffer resuspendiert, weitere 10min auf Eis gekühlt, erneut abzentrifugiert und schließlich in 1ml TFB-Puffer resuspendiert. Nach Zugabe von 35µl DMSO, 35µl DTT-Lösung (2,25M DTT, 40mM Kaliumacetat pH 6) und weiteren 35µl DMSO (jeweils gefolgt von 5minütigen Inkubationen auf Eis) waren die Bakterien bereit zur Transformation mit Plasmiden.

*Transformation kompetenter Bakterien mit Plasmiden:* Je 200µl kompetenter Zellen wurden mit 100ng Plasmid (in 10µl Reinstwasser) versetzt und 30min auf Eis inkubiert. Die Bakterien wurden anschließend im Wasserbad für 90-120sec auf 42°C erwärmt („Hitzeschock“), anschließend schnell auf Eis gekühlt und in 800µl eiskaltem SOC-Medium ver-

dünnt. Nun wurden die transformierten Bakterien unter mildem Schütteln für 30-60min bei 37°C inkubiert (2.6.7), bevor sie mit einem Drigalski-Spatel auf LB-Agarplatten (ergänzt um selektierendes Antibiotikum) ausgestrichen und bei 37°C über Nacht weiterkultiviert wurden. Nachdem einzelne Kolonien sichtbar waren, wurden diese dann zur Plasmidpräparation eingesetzt. Tabelle 3 führt die verwendeten Plasmidvektoren und die zur Amplifikation geeigneten Bakterienstämme und Selektionsmedien auf.

#### 2.6.9 Präparation von Plasmiden aus transformierten *Escherichia coli*-Bakterien

Eine Kolonie transformierter Plasmid-tragender Bakterien (2.6.8) wurde in 5ml bzw. 250ml Selektionsmedium (Tabelle 3) über Nacht kultiviert. Das in den Bakterien amplifizierte Plasmid wurde mit dem „Plasmid Mini Kit“ (maximal 10µg Plasmid; Qiagen: 12123) bzw. „Plasmid Maxi Kit“ (maximal 500µg Plasmid; Qiagen: 12162) nach Herstellerprotokoll aus den Bakterien isoliert.

## **2.7 Techniken zur Isolierung, Aufreinigung und Verarbeitung von RNA**

#### 2.7.1 Herstellung RNase-freier Lösungen, Materialien und Geräte

RNasen sind allgegenwärtige und sehr stabile Proteine. Um RNA-Präparationen vor ungewolltem Abbau zu bewahren, wurden folgende Sicherheitsmaßnahmen durchgeführt. Alle Glaswaren wurden in Aluminiumfolie verpackt und vier Stunden bei 180°C sterilisiert. Spezielle Schraubdeckel aus Polybutylenterephthalat (PBT) zum Verschließen der Duranflaschen (Schott, Mainz) wurden ebenfalls bei 180°C sterilisiert. Plastikgeräte, z.B. Agarosegelkammern, wurden mit RNaseZAP™-Spraylösung (Invitrogen: R600-01) besprüht und nach einigen Minuten Einwirkzeit mit Reinstwasser abgespült. Plastikspitzen für automatische Pipetten, Plastikreaktionsgefäße, Plastikzentrifugenröhrchen wurden jeweils aus reservierten Packungen entnommen und autoklaviert. Für RNA-Arbeiten wurden Chemikalien verwendet, welche ausschließlich für diesen Zweck reserviert waren und nur steril aus ihren Packungen entnommen und abgewogen wurden. Alle RNA-Arbeiten, vom Herstellen der Lösungen, dem Sterilisieren der Arbeitsgeräte bis zur Durchführung der Experimente wurden mit jeweils frischen Einweghandschuhen durchgeführt.

#### 2.7.2 Präparation von *Platynereis*-Gelegen zur Extraktion der Gesamt-RNA

Mehrere Gelege von *Platynereis dumerilii* (2.4.1) wurden gleichzeitig besamt und in einer großen Hälterungsschale vereinigt. Im gewünschten Entwicklungsstadium (45min, 4h, 6h, 24h oder 48h nach Besamung) wurden sämtliche Keime in einem Nylonsieb (Maschen-

weite 100µm) gesammelt und mehrmals mit sehr viel Seewasser gewaschen, um die Gallerte möglichst vollständig zu entfernen. Anschließend wurden die Keime mit wenig Wasser in ein Plastikzentrifugenröhrchen (15ml, Falcon) überführt und 2-5min mit 1000g bei 4°C in einer Kühlzentrifuge abzentrifugiert. Sollten bereits geschlüpfte Trochophorae präpariert werden, so wurden diese vor dem Zentrifugieren 15min auf Eis gestellt, um die Schwimmbewegungen zu minimieren. Das überstehende Wasser und die restliche Gallerte wurden vollständig entfernt und die Keime sofort zur Gesamt-RNA Extraktion verwendet.

### 2.7.3 Gesamt-RNA Extraktion aus *Platynereis dumerilii*-Embryonen

Die pelletierten *Platynereis*-Keime (2.7.2) wurden in 20 Volumina GTC-Extraktionspuffer und zwei Volumina 2M Na-Acetat-Lösung (pH 4,0) resuspendiert und auf Eis einige Minuten inkubiert, bis die Keime vollständig lysiert waren. Anschließend wurde das Lysat mit Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol extrahiert (2.6.2) und die obere wässrige Phase mit der gelösten RNA in einem sauberen Zentrifugenröhrchen mit Isopropanol gefällt (2.6.1). Am folgenden Morgen wurde das RNA-Pellet in 910µl GTC-Extraktionspuffer und 90µl 2M Na-Acetat-Lösung resuspendiert. 10µl dieser Lösung wurde verwendet, um den RNA-Gehalt zu bestimmen (2.6.1). Ein 15µl-Aliquot wurde auf einem Agarosegel aufgetrennt (2.6.4), um die Qualität der extrahierten RNA zu überprüfen (Abbildung 16A, Seite 80). Anschließend wurde die Gesamt-RNA erneut mit Isopropanol gefällt (s.o.) und bis zur Weiterverarbeitung bei -80°C gelagert. Vor Gebrauch wurde die RNA in 1ml TE-Puffer resuspendiert.

### 2.7.4 Aufreinigung von poly(A)-RNA aus Gesamt-RNA von *Platynereis dumerilii*

Ausgangsmaterial zur Herstellung von cDNA (2.7.5) und cDNA-Banken (2.10.1) ist die mRNA, die aber nur etwa 1% der Gesamt-RNA ausmacht. Es ist daher günstig vor der cDNA-Synthese zunächst die mRNA-Fraktion zu isolieren. Im Gegensatz zu den anderen RNA-Klassen (rRNA, snRNA, tRNA...) ist der allergrößte Teil der mRNA polyadenyliert. Diese poly(A)-RNA kann über oligo(dT)-Säulen affinitätschromatographisch aufgereinigt werden. Für die Isolierung der polyadenylierten RNA-Fraktion wurden je Entwicklungsstadium (45min, 4h, 6h, 24h oder 48h nach Besamung) mehrere Gesamt-RNA Präparationen vereinigt.

*Aufbau der Apparatur:* Der Ablauf einer Glassäule mit Liebigkühler wurde mit silikonisierter, autoklavierter Glaswolle verschlossen. Anschließend wurde der Ablauf mit einer Klemme versperrt, die Säule mit mRNA-Elutionspuffer gefüllt und mit oligo(dT)-Zellulose beschickt (Typ 7, Boehringer Mannheim: 808 229; Bindungskapazität: 4µg poly(A)-

RNA/mg oligo(dT)-Zellulose). Die Menge der eingesetzten oligo(dT)-Zellulose richtete sich zum einen nach der Mindesthöhe der Säule von 1cm und zum anderen nach der erwarteten Menge an poly(A)-RNA (ca. 1% der eingesetzten Gesamt-RNA). An die Temperatureinheit (Liebigkühler) der Säule wurde über zwei T-Stücke zwei Wasserbäder mit 37°C bzw. 65°C angeschlossen, so daß sie wechselseitig an- bzw. abgekoppelt werden konnten.

*Vorreinigung und Equilibrierung der Säule:* Nach dem Absetzen der oligo(dT)-Zellulose wurde die Säule jeweils mit fünf Säulenvolumina (SVol) mRNA-Elutionspuffer und Waschlösung (0,1M NaOH, 5mM EDTA) gewaschen. Anschließend wurde die Säule solange mit Reinstwasser gespült, bis der pH-Wert des Eluats kleiner als acht war. Zuletzt wurde die Säule mit 5 SVol mRNA-Elutionspuffer equilibriert.

*poly(A)-RNA Aufreinigung:* Die in TE-Puffer gelöste Gesamt-RNA (2.7.3) wurde mit 2fach-konzentriertem mRNA-Elutionspuffer und 20%iger SDS-Lösung auf ein Endvolumen von 5-10 SVol (Endkonzentration: 1x-mRNA-Elutionspuffer, 0,1% SDS, 600µg/ml Gesamt RNA) eingestellt und für 10min bei 65°C denaturiert, um eventuell Sekundärstrukturen aufzulösen. Die denaturierte RNA wurde auf Eis schnell heruntergekühlt und auf die Säule (37°C) aufgetragen. Das aufgefangene Eluat wurde erneut denaturiert, abgekühlt und ein zweites Mal auf die Säule gegeben. Ungebundene RNA wurde mit 5 SVol mRNA-Elutionspuffer von der Säule gewaschen. Die Säule wurde nun an das 65°C-Wasserbad angeschlossen und die gebundenen poly(A)-RNA mit 4ml mRNA-Elutionspuffer (vorgewärmt auf 65°C) heruntergewaschen. Zehn Fraktionen von je 400µl (poly(A)-RNA meist ab Fraktion 2 bis Fraktion 6) wurden in sterilen Eppendorfreaktionsgefäßen aufgefangen und mit Ethanol gefällt (2.6.1). Zur Regeneration der Säule wurde diese erneut an das 37°C-Wasserbad angeschlossen und wie oben beschrieben vorgereinigt und equilibriert. Die gesammelten und gefällten poly(A)-RNA-Fraktionen wurden am folgenden Tag in je 10µl Reinstwasser resuspendiert, vereinigt und für 2min bei maximaler Geschwindigkeit in einer Tischzentrifuge abzentrifugiert, um Reste der Säulenmaterials zu pelletieren. Der Überstand mit der poly(A)-RNA wurde in ein sauberes Reaktionsgefäß überführt. 1/10 Volumen dieser Lösung wurde verwendet, um den Gehalt an poly(A)-RNA zu bestimmen (2.6.2). Der Rest wurde erneut mit Ethanol gefällt und bei -80°C gelagert.

#### 2.7.5 Reverse Transkription von *Platynereis dumerilii* poly(A)-RNA in cDNA

Für die reverse Transkription der mRNA in cDNA wurde die „Maus Moloney Leukämie Virus-Reverse Transkriptase“ (MMLV-RT) aus dem „RT-Kit“ von Life Technologies (28025-013) verwendet. In dem Kit enthalten waren auch der 5x-Reaktionspuffer und eine

DTT-Stammlösung. Von Pharmacia wurde sowohl der oligo(dT)-Primer (27-7610-01), als auch der RNase-Inhibitor „RNAguard“ (27-0815-01) bezogen. Die Desoxynukleotide stammen aus dem „dNTP-Set“ von MBI-Fermentas (#R0181).

50ng poly(A)-RNA (2.7.4, aus 4h, 24h und 48h alten Embryonen) wurden in 10,2 µl Reinstwasser resuspendiert und mit 1µl oligo(dT)<sub>12-18</sub>-Primern (1µg/µl) versetzt und 10min bei 80°C denaturiert, dann schnell auf Eis abgekühlt. Anschließend wurden 0,3µl „RNAguard“ (38900U/ml), 2µl Deoxynukleotid-Mix (je 10mM dATP, dCTP, dGTP und dTTP), 4µl 5x-Reaktionspuffer, 2µl 100mM-DTT, 0,5µl MMLV-RT (200U/µl) hinzugefügt. Der Reaktionsansatz wurde gut durchmischt, kurz abzentrifugiert, 90min im Wasserbad bei 37°C inkubiert und anschließend bis zur Verwendung bei -20°C eingefroren.

## 2.8 Nukleinsäureamplifikation mit der Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

### 2.8.1 Allgemeine Angaben zur Durchführung der PCR

Mit der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) lassen sich ausgehend von einer DNA-Matrize mit Hilfe zweier gegenläufiger Primer unter Einsatz thermostabiler DNA-Polymerasen spezifisch DNA-Fragmente amplifizieren (Saiki *et al.* 1988). Im Rahmen dieser Arbeit wurden hierzu verschiedene thermostabile DNA-Polymerasen (*Taq*-DNA-Polymerase, MBI-Fermentas; Deep Vent®-DNA-Polymerase, New England Biolab) verwendet. Als Matrize wurde je nach Anwendung cDNA, Plasmid-DNA, Bakteriensuspensionen oder Aliquots der cDNA-Banken eingesetzt (siehe folgende Kapitel).

Die Reaktionen bestanden aus folgenden Komponenten:

1/10 Volumen	10x PCR-Puffer	(vom Hersteller der DNA-Polymerase)
0,5-10mM	Mg <sup>2+</sup>	(12,5mM MgCl <sub>2</sub> - oder 100mM MgSO <sub>4</sub> -Stammlösung der Hersteller)
je 50-100µM	Desoxynukleotide	(je 100mM dATP, dTTP, dCTP, dGTP; Fermentas: #R0181)
1-1,5µM	5'-Primer	(siehe Tabelle 5)
1-1,5µM	3'-Primer	(siehe Tabelle 5)
Xµg	DNA-Matrize	(2.8.3 bis 2.8.6)
0,02-0,04U/µl	thermostabile DNA-Polymerase	( <i>Taq</i> oder Deep Vent)

Die Reaktionsschritte wurden nach folgendem beispielhaften Schema programmiert:

1.	5min	94°C	<i>hot start</i> -PCR: Initialer Denaturierungsschritt	(optional)
2.	5min	72°C	<i>hot start</i> -PCR: Zugabe der DNA-Polymerase	(optional)
3.	30sec	94°C	Denaturierungsschritt	
4.	30sec	55°C	Primer-Hybridisierungsschritt (evtl. mit <i>touch down</i> -Programmierung)	
5.	45sec	72°C	DNA-Polymerisierungsschritt	(ca. 1000Bp je 1min)
6.	Rücksprung zu 3.		30fache Wiederholung der Schritte 3. bis 5.	
7.	5min	72°C	Abschließender DNA-Polymerisierungsschritt	(optional)

(Kurzform: 5min 94°C; 5min 72°C; 30x[30sec 94°C; 30sec 55°C; 45sec 72°C]; 5min 72°C)

Die genaue Zusammensetzung, insbesondere die MgCl<sub>2</sub>-Konzentration, wurde für jedes Primerpaar neu optimiert. Auch die Dauer und die Temperatur der einzelnen Reaktionsschritte und die Zahl der Wiederholungszyklen wurden an jeden Einzelfall angepaßt (für Optimierungsstrategien siehe auch Innis und Gelfand 1990). Die Amplifikation spezifischer Fragmente konnte teilweise verbessert werden, indem die DNA-Polymerase erst nach einem initialen Denaturierungsschritt zu dem Reaktionsansatz hinzugefügt wurde (*hot start*-PCR). Bei der *touch down*-Programmierung wurde die zunächst hohe (stringente) Temperatur des Primer-Hybridisierungsschrittes während der Wiederholungszyklen nach und nach erniedrigt. Je nach Bedarf wurden auch folgende Kontrollen angesetzt

Negativkontrolle 1:	Ansatz ohne DNA-Matrize, um DNA-Kontaminationen auszuschließen
Negativkontrollen 2, 3, 4:	Ansätze ohne, bzw. nur mit 5'- oder 3'-Primer, um die Primerspezifität der Amplifikation zu überprüfen.
Negativkontrolle 5:	Ansatz ohne DNA-Polymerase, um Kontamination mit spezifischem DNA-Fragment auszuschließen
Positivkontrolle 1:	Ansatz mit Plasmid als Matrize und plasmidspezifischen Primern, um Aktivität der DNA-Polymerase zu überprüfen.

Die Reaktionen wurden in einem PCR-Gerät durchgeführt. 1/10-Volumen der Reaktionsansätze wurde jeweils auf einem Agarosegel analysiert und das Bandenmuster dokumentiert (2.6.4). Die genaue Zusammensetzung der einzelnen PCR-Reaktionen und die Amplifizierungsbedingungen sind an gegebener Stelle aufgeführt.

### 2.8.2 Herkunft und Design der degenerierten und spezifischen PCR-Primer

*Degenerierte Primer:* In Umkehrung des normalen Informationsflusses in der Zelle (vom Gen zum Protein) wurden ausgehend von hochkonservierten Aminosäuresequenzen (6-8

Aminosäuren) der bereits bekannten Proteine, korrespondierende Nukleotid-Sequenzen (18-24 Nukleotide) abgeleitet. Da jeder Aminosäure mehrere synonyme Triplets des genetischen Codes entsprechen, resultiert dieses Verfahren in einem Potpourri unterschiedlicher, aber informationsidentischer (=degenerierter) Oligonukleotid-Sequenzen. Für jedes zu amplifizierende Gen wurden mindestens zwei degenerierte und gegenläufige Primer entworfen (Tabelle 5). Beim Entwurf der degenerierten Primer wurden jedoch nicht alle möglichen synonymen Basentriplets berücksichtigt. Um den Grad der Degeneriertheit zu reduzieren, wurden die im *Platynereis*-Genom seltener verwendeten Triplets (siehe Tabelle 4) ignoriert (zum optimalen Design degenerierter Primer siehe auch Compton 1990).

**Tabelle 4: Codon-Nutzung von *Platynereis dumerilii*.** Grundlage der Tabelle sind die bisher veröffentlichten Gensequenzen von *Platynereis dumerilii*: Pdwee1-Gen, Pdcyc1-Fragment (beide aus dieser Arbeit); die Histon Gene H2A, H2B, H3, H4 (EMBL Acc.No.: X53330); Hunchback-Fragment (EMBL Acc.No.: L01607). Die Häufigkeit mit der die einzelnen Codons in den Gensequenzen vorkamen, wurde ausgezählt. Einzelne Codons werden gegenüber synonymen Codons deutlich seltener verwendet (z. B. CTA, ATA, GTA). Bei vielen Aminosäuren ist eine Präferenz für diejenigen Codons zu erkennen, die weniger A oder T enthalten (z. B. Phe, Ile, Thr, Tyr).

Aminos.	Codon	Gesamt	Aminos.	Codon	Gesamt	Aminos.	Codon	Gesamt	Aminos.	Codon	Gesamt
Phe, F	TTT	10	Ser, S	TCT	13	Tyr, Y	TAT	12	Cys, C	TGT	9
	TTC	25		TCC	22		TAC	29		TGC	11
Leu; L	TTA	20	STOP	TCA	12	TAA	4	TGA	1		
	TTG	28		TCG	16	TAG	0	Trp, W	TGG	4	
	CTT	15	Pro, P	CCT	14	His, H	CAT	11	Arg, R	CGT	27
	CTC	24		CCC	29		CAC	22		CGC	12
	CTA	2		CCA	10	Gln, Q	CAA	16	CGA	13	
	CTG	19		CCG	6		CAG	30	CGG	6	
Ile, I	ATT	10	Thr, T	ACT	11	Asn, N	AAT	18	AGA	19	
	ATC	45		ACC	37		AAC	40	AGG	24	
	ATA	5		ACA	10	Lys, K	AAA	28	Ser, S	AGT	17
Met, M	ATG	26	ACG	4	AAG		68	AGC		15	
Val, V	GTT	21	Ala, A	GCT	27	Asp, D	GAT	16	Gly, G	GGT	13
	GTC	27		GCC	52		GAC	32		GGC	12
	GTA	5		GCA	23	Glu, E	GAA	39		GGA	47
	GTG	10		GCG	5		GAG	37		GGG	6

*Spezifische Primer:* War die genaue Nukleotidsequenz eines Gens bekannt, konnten spezifische Primer entworfen werden, die Gensequenzabschnitten von 18-24 Nukleotiden entsprachen (Tabelle 5). Dabei wurde darauf geachtet, daß die Primersequenzen eine Schmelztemperatur von 50-60°C aufwiesen (optimale Hybridisierungstemperatur) und keine Sekundärstrukturen ausbildeten. Geeignete Sequenzabschnitte wurden mit Hilfe des

Internetprogramms „Primers for the World wide Web“ identifiziert (die URL-Adresse lautet <http://www.williamstone.com/primers/index.html>).

*Primersynthese:* Ein großer Teil der Primer stammt von Dr. André van Loon (Utrecht, Niederlande). Sofern die Primer von mir selbst entworfen wurden, wurde ihre Synthese bei der Firma Life Technologies in Auftrag gegeben.

**Tabelle 5: Charakterisierung der verwendeten PCR-Primer.** 5'-Primer entsprechen in ihrer Sequenz der mRNA eines Gens, bzw. dem Plus-Strang eines Plasmids. 3'-Primer entsprechen dagegen der *anti-sense* RNA eines Gens bzw. dem Minus-Strang eines Plasmids.

Bezeichnung	Position	zum Amplifizieren von	Nukleotidsequenz <sup>1</sup>	Entworfen von...
cyc1-F	5'	cyclin (A, B, E)	5'-taa tgc atg cgn gcn ath ctn rth gay tgg-3'	Heimann
cyc2-R	3'	cyclin (A, B, E)	5'-taa ccc ggg kgg rta nat ytc ytc rta ytt-3'	Heimann
cyc3-R	3'	cyclin (B)	5'-ctt nga rtt yck yck nag raa rt-3'	Heimann
cycA-F	5'	<i>P.d.</i> Cyclin 1	5'-agt tta ccg att gca ccg aga g-3'	Heimann
cycA-R	3'	<i>P.d.</i> Cyclin 1	5'-cct att aac tgg aga acc tgt-3'	Heimann
str11-F	5'	string (cdc25)	5'-ath ath gay tgy mgn tay ccn tay gar-3'	van Loon
str13-R	3'	string (cdc25)	5'-ncg ytc nga nga raa ytc rca rtg raa-3'	van Loon
wee1-F	5'	wee 1	5'-gcg gay ggn tgy ath tay gcn ath aa-3'	van Loon
wee2-F	5'	wee 1	5'-ggg gcn tgg gcn gar gay gay cay at-3'	van Loon
wee3-R	3'	wee 1	5'-ggg ytc rtt ytg dat nar cat rtg-3'	van Loon
wee4-R	3'	wee 1	5'-ggg nar nsw raa dat rtc ngc ytt-3'	van Loon
wee5-F	5'	<i>P.d.</i> wee 1	5'-aag ttt acg ctc acg ctg ttc ta-3'	Heimann
wee6-R	3'	<i>P.d.</i> wee 1	5'-gtc tct tct cct tcg caa tct tc-3'	Heimann
tub-F	5'	a-tubulin	5'-agg gaa ttc aay car atg gtn aar tgy ga-3'	van Loon
tub-R	3'	a-tubulin	5'-atc aag ctt ytc ncc nac rta cca rtg-3'	van Loon
pBS-A	5'	pBluescript, pZer0	5'-cta tga cca tga tta cgc caa-3'	van Loon
pBS-E	3'	pBluescript, pZer0	5'-aac gcc agg gtt ttc cca gtc-3'	van Loon
pBS-R	3'	pUC18	5'-cta tga cca tga tta cga a-3'	Heimann

<sup>1)</sup> An den degenerierten Positionen können alternativ verschiedene Nukleotide vorkommen. Für die unterschiedlichen Kombinationen existiert ein fester Einbuchstabencode. Dabei steht zum Beispiel „r“ für die Nukleotide a oder g. **r**= a, g; **y**= c, t; **m**= a, c; **k**= t, g; **s**= c, g; **w**= a, t; **h**= a, t, c; **b**= t, c, g; **d**= a, t, g; **v**= a, c, g; **n**= a, c, t, g; *P.d.*: *Platynereis dumerilii*;

### 2.8.3 RT-PCR Amplifizierung von *Platynereis dumerilii*-Genfragmenten aus mRNA

Fragmente zellzyklusregulierender Gene wurden über eine RT-PCR-Strategie (Rreverse-Transkriptase-PCR) amplifiziert (Kawasaki 1990). Dazu wurde zunächst mRNA mittels des Enzyms Reverse-Transkriptase in cDNA übersetzt (2.7.5). Aus diesem cDNA-Reaktionsansatz (20µl) wurden anschließend 0,5-1µl als Matrize in einer 25µl-PCR-Reaktion eingesetzt. Als Primer dienten degenerierte Oligonukleotide (2.8.2). Es konnten Fragmente



von *wee1*, Cyclin E, und vermutlich von Cyclin B und *string* (*Cdc25*) amplifiziert werden. Die beiden zuletzt genannten Fragmente wurden aber bisher noch nicht kloniert und konnten deshalb noch nicht sicher identifiziert werden. Als Positivkontrolle wurde jeweils ein Fragment des Tubulin-Gens („Haushaltsgen“) mitamplifiziert. Dadurch konnte geprüft werden, ob die Herstellung cDNA-Matrize überhaupt gelungen war.

#### 2.8.4 Amplifizierung von Genfragmenten aus $\lambda$ -ZAP-cDNA-Banken

Zur Amplifizierung von Genfragmenten direkt aus den cDNA-Banken wurden 30 $\mu$ l-Aliquots der cDNA-Banken als Matrize in einer 100 $\mu$ l-PCR-Reaktion eingesetzt. Bei der Programmierung wurde immer ein „*hot start*“ (2.8.1) eingefügt, um zunächst die Hüllproteine der  $\lambda$ -Phagen zu denaturieren und dadurch die DNA überhaupt erst für die DNA-Polymerase zugänglich zu machen.

#### 2.8.5 Amplifizierung von Genfragmenten aus Bakteriensuspensionen

Plasmidtragende *E. coli*-Bakterien konnten mit Hilfe der PCR auf die Identität des Plasmids hin überprüft werden. Dazu wurden von einer Kolonie einer Bakterien-Stammplatte (2.6.7) mit einem autoklavierten Zahnstocher einige Bakterien in ein Reaktionsgefäß mit 50 $\mu$ l TE-Puffer übertragen. 5 $\mu$ l dieser Bakteriensuspension wurden dann als Matrize in einer 25 $\mu$ l-PCR-Reaktion eingesetzt. Mit Plasmid-spezifischen Primern ließen sich hierbei Fragmente erfolgreich amplifizieren.

#### 2.8.6 Amplifizierung von Genfragmenten aus Plasmidpräparationen

Zur Amplifikation von Genfragmenten aus gereinigten Plasmidpräparationen (2.6.9) wurden 50 bis maximal 100ng des Plasmids als Matrize in einer 25 $\mu$ l-PCR-Reaktion eingesetzt.

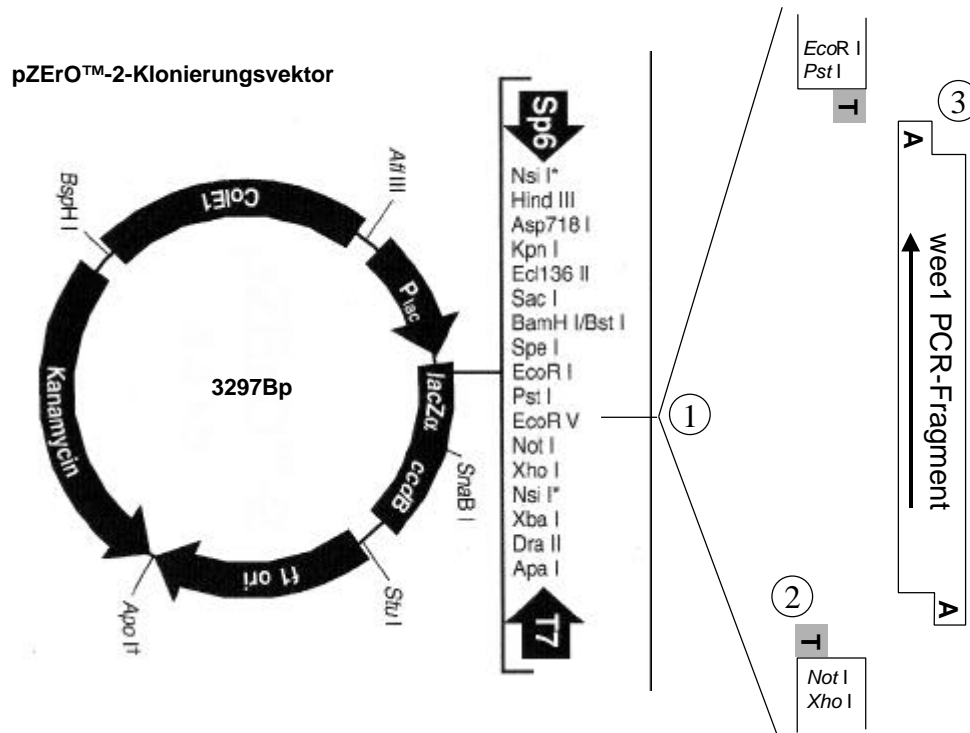
## **2.9 Klonierung und Sequenzierung von *Platynereis*-PCR-Fragmenten**

### 2.9.1 Klonierung des *Platynereis dumerilii* *wee1*-PCR-Fragments

*Amplifizierung des wee1-Fragmentes:* Aus 24h-cDNA (2.7.5) wurde mittels RT-PCR (2.8.3) unter Einsatz der *Taq*-DNA-Polymerase (2.8.1) ein 572Bp langes Fragment des *Platynereis dumerilii* *wee1*-Gens amplifiziert (*wee1*<sup>572</sup>, Reaktionsbedingungen siehe Tabelle 6). Der gesamte PCR-Ansatz wurde auf einem Agarosegel aufgetrennt (2.6.4) und die *wee1*<sup>572</sup>-Bande aus dem Gel extrahiert und in 20 $\mu$ l TE-Puffer resuspendiert (2.6.5). Die resuspendierte 572Bp-Bande wurde als DNA-Matrize in einer Kontroll-PCR eingesetzt

(Tabelle 7), um zu prüfen, ob sich auch mit dem internen Primer wee2F und wee3R Fragmente amplifizieren lassen (siehe auch 3.3.2).

**Klonierungsstrategie:** Die zur Amplifizierung des wee1-Fragmentes eingesetzte *Taq*-DNA-Polymerase weist eine schwache Terminale-Transferase-Aktivität auf und fügt deshalb an alle PCR-Produkte ein 3'-überhängendes Nukleotid an. Die *Taq*-DNA-Polymerase zeigt dabei eine deutliche Präferenz für dATP (Clark 1988, Gelfand und White 1990), so daß der überwiegende Teil der PCR-Fragmente ein überhängendes 3'-Desoxyadenylat (3'-dA) aufweist. Fügt man einem linearisierten Vektor an dessen freie Enden überhängende 3'-Desoxythymidylate (3'-dT) an, so lassen sich *Taq*-amplifizierte PCR-Fragmente aufgrund der Basenkomplementarität sehr leicht in diesen 3'-dT-Vektor einklonieren (siehe auch Abbildung 2).



**Abbildung 2: Schematische Darstellung der Klonierungsstrategie für das wee1<sup>572</sup>-Fragment.** Der pZER0™-2-Klonierungsvektor wurde mit dem Restriktionsenzym *EcoR V* glattendig linearisiert (1). Unter Ausnutzung der Terminale-Transferase-Aktivität der *Taq*-DNA-Polymerase wurden an die freien 3'-Enden des Vektors Desoxythymidylatreste angehängt (2). Aufgrund der Präferenz der *Taq*-DNA-Polymerase für dATP bei der terminalen Desoxynucleotidyl-Übertragung verfügte das wee1-Fragment über komplementäre 3'-dA-Reste (3). In der anschließenden Ligase-Reaktion wurden Fragment und Vektor kovalent verknüpft. Die ringförmige Karte des Vektors ist als PDF-Datei auf der Internetseite des Herstellers (Invitrogene) erhältlich (URL: <http://www.invitrogen.com/>)

**Linearisierung und 3'-Desoxythymidylierung des Plasmidvektors pZer0™-2:** In einem Reaktionsvolumen von 43µl wurden 2µg pZer0™-2 (Invitrogene) mit 12U *EcoR V* glatt-

endig<sup>4</sup> linearisiert (2.6.6). Zum Anfügen der überhängenden 3'-dT's wurden 5µl 10x-PCR-Puffer, 1µl 100mM dTTP und 2U *Taq*-DNA-Polymerase hinzugefügt und für zwei Stunden bei 72°C in einem PCR-Gerät inkubiert. Um Enzymreste zu entfernen wurde die Probe nacheinander mit Phenol, Phenol:Chloroform und Chloroform extrahiert (2.6.2). Der wässrige Überstand wurde mit Alkohol gefällt (2.6.1) und das Vektorpellet in 15 µl Reinstwasser resuspendiert.

*Ligation des wee1<sup>572</sup>-Fragmentes und des Vektors 3'-dT<sub>pZer0</sub>ä-2:* Zur Ligation wurden 16µl des wee1<sup>572</sup>-Fragmentes, 1µl des linearisierten und 3'-dT<sub>pZer0</sub><sup>TM</sup>-2 Vektors, 1µl T4-DNA-Ligase (400U/µl, Boehringer Mannheim: 481 220) und 2µl 10x-Ligasepuffer (inkl. ATP, vom Hersteller mitgeliefert) im Wasserbad bei 16°C über Nacht inkubiert. Das Ligationsprodukt pZerO<sup>wee572</sup> wurde anschließend in Bakterien transformiert (s.u.)

*Amplifikation von pZerO<sup>wee572</sup> in Bakterien:* 200µl transformationskompetente TOP10-Zellen wurden mit 20µl des Ligationsansatzes (s.o.) transformiert (2.6.8). Auf zwei LB-Agarplatten (mit 50µg/ml Kanamycin und 2,5mM IPTG) wurden 50µl bzw. 100µl der transformierten Bakterien ausgestrichen und bei 37°C über Nacht kultiviert.

*Überprüfung des Transformationserfolges:* Aus vielen hundert transformierten Bakterienklonen wurden 21 Klone (TOP10<sup>wee572-1</sup>-TOP10<sup>wee572-21</sup>) mit autoklavierten Zahnstochern in 50µl TE-Puffer übertragen und der Transformationserfolg über eine PCR-Reaktion getestet (Tabelle 8). Die eingesetzten Primer hybridisierten dabei mit dem Vektor beiderseits der Klonierungsstelle. Auf diese Weise wurde das inklonierte wee1<sup>572</sup>-Fragment (572Bp) zusammen mit kurzen Vektorabschnitten (230Bp) amplifiziert. Für die Test-PCR ergab sich also eine erwartete Fragmentlänge von ~800Bp.

Aus 15 der getesteten 21 Klone ließ sich ein solches 800Bp-Fragment amplifizieren. Der größte (am besten gewachsene) dieser Klone, TOP10<sup>wee572-16</sup>, wurde in 5ml LB-Medium (50µg/ml Kanamycin) über Nacht kultiviert. Am nächsten Morgen wurde aus den kultivierten Bakterien das rekombinante Plasmid pZerO<sup>wee572-16</sup> daraus präpariert (2.6.9) und später sequenziert (2.11.1).

---

<sup>4</sup> Einige Restriktionsenzyme spalten beide Stränge eines DNA-Substratmoleküls an exakt der gleichen Position und erzeugen sogenannte „glattendige“ Fragmente (*blunt ends*) ohne überhängende einzelsträngige Nukleotide. Andere Restriktionsenzyme spalten beide Stränge des DNA-Substratmoleküls an versetzten Positionen und erzeugen sogenannte „klebrige“ Fragmente (*sticky ends*) mit entweder 3'- oder 5'-überhängenden einzelsträngigen Nukleotiden.

**Tabelle 6: Pipettierschema für die Amplifizierung des wee1<sup>572</sup>-Fragmentes aus embryonaler cDNA.**

Komponenten	Ansatz [µl]	Positivkontrolle [µl]
Reinstwasser	18	17
PCR-Puffer [10x]	2,5	2,5
MgCl <sub>2</sub> [12,5mM]	2	3
dNTP-Mix [je 2,5mM]	0,5	0,5
5'-Primer [100µM]: wee1F	0,25	-
3'-Primer [100µM]: wee4R	0,25	-
5'-Primer [100µM]: tub-F	-	0,25
3'-Primer [100µM]: tub-R	-	0,25
DNA-Matrize: 24h cDNA <sup>1)</sup>	0,5	0,5
Taq-DNA-Polymerase [0,5U/µl]	1	1
Programm:	40x[1min, 94°C; 1min 35°C, 1min 67°C]	

<sup>1)</sup> Aus 24h alten Embryonen isolierte mRNA wurde in cDNA umgeschrieben (2.7.5). Jeweils 0,5µl dieses cDNA-Reaktionsansatzes wurden hier als DNA-Matrize eingesetzt.

**Tabelle 7: Wee1-Kontrollamplifikation mit internen Primern.**

Komponenten	Ansatz 1 [µl]	Ansatz 2 [µl]	Ansatz 3 [µl]
Reinstwasser	12,2	11,7	11,7
PCR-Puffer [10x]	2,5	2,5	2,5
MgCl <sub>2</sub> [12,5mM]	2,5	3	3
dNTP-Mix [je 2,5mM]	0,5	0,5	0,5
5'-Primer [100µM]: wee1F	0,25	0,25	-
5'-Primer [100µM]: wee2F	-	-	0,25
3'-Primer [100µM]: wee3R	-	0,25	-
3'-Primer [100µM]: wee4R	0,25	-	0,25
DNA-Matrize: wee1 <sup>572</sup> -Fragment <sup>1)</sup>	1	1	1
Taq-DNA-Polymerase [0,5U/µl]	1	1	1
Programm:	10min 94°C; 5min 72°C <sup>2)</sup> ; 40x[1min, 94°C; 1min 35°C, 1min 67°C]		

<sup>1)</sup> Das aus 24h-cDNA amplifizierte wee1<sup>572</sup>-Fragment wurde gelelektrophoretisch aufgetrennt, aus dem Gel eluiert und in 20µl TE-Puffer resuspendiert. Je 1µl dieser Lösung wurden hier als DNA-Matrize eingesetzt. <sup>2)</sup> Die Taq-DNA-Polymerase wurde erst nach dem initialen Denaturierungsschritt (10min bei 94°C) bei 72°C hinzugefügt (*Hot Start-PCR*).

**Tabelle 8: Wee1-Klonierungskontrolle mit vektorspezifischen Primern.**

Komponenten	Ansatz 1-21 [µl]		
Reinstwasser	12,2		
PCR-Puffer [10x]	2,5		
MgCl <sub>2</sub> [12,5mM]	3		
dNTP-Mix [je 2,5mM]	0,5		
5'-Primer	0,5 / pBS-E [45µM] <sup>1)</sup>		
3'-Primer	0,3 / pBS-A [75µM] <sup>1)</sup>		
DNA-Matrize	5µl (TOP10 <sup>wee</sup> -Bakterienlone 1-21) <sup>2)</sup>		
DNA-Polymerase [0,5U/µl]	1 / Taq		
Programm:	40x[30sec 94°C; 30sec. 55°C; 45sec. 72°C]; 7min 72°C		

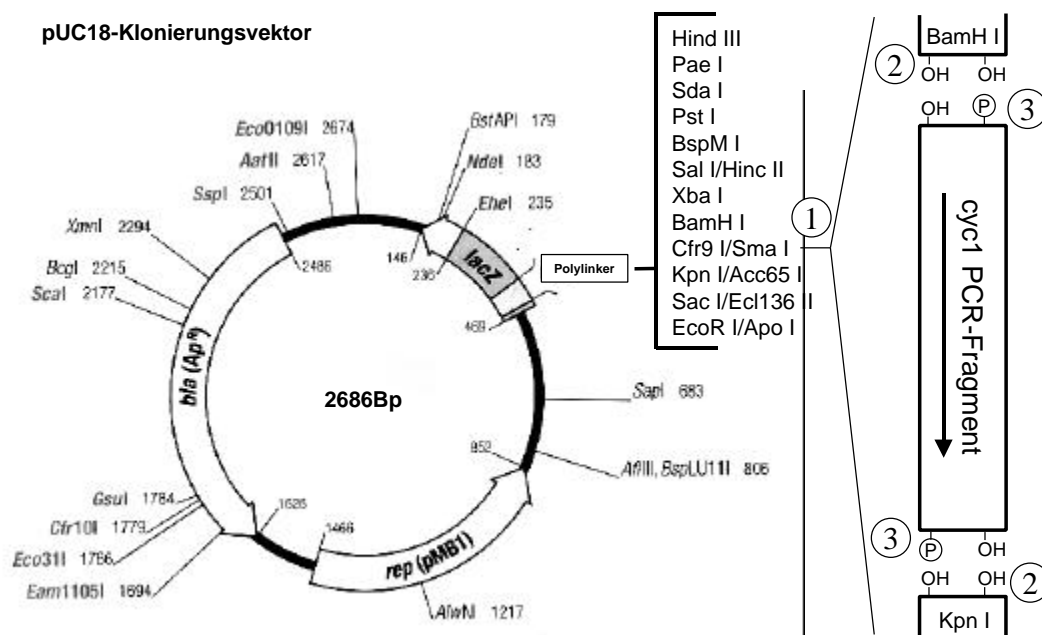
<sup>1)</sup> Die Primer pBS-E und pBS-A binden innerhalb des Vektors pZER0-2 im 5'- bzw. 3'-Bereich des Polylinkers. Mit diesem Primer-Paar läßt sich deshalb ein in den Polylinker kloniertes DNA-Fragment (zusammen mit etwa 230Bp flankierender Vektorsequenzen) über eine PCR amplifizieren. Für das klonierte wee1-PCR-Fragment (572Bp) ergibt sich deshalb eine erwartete Fragmentlänge von ~800Bp.

<sup>2)</sup> Das wee1<sup>572</sup>-Fragment wurde in den Vektor pZER0-2 einkloniert. Mit diesem Konstrukt wurden TOP10-Zellen transformiert. 21 der transformierten Bakterienklone (TOP10<sup>wee1-1</sup> - TOP10<sup>wee1-21</sup>) wurden mit einem sterilen Zahnstocher in 50µl TE-Puffer übertragen. Je 5µl dieser Bakteriensuspension wurden hier als DNA-Matrize eingesetzt. Aus 15 der Klone konnte das erwartete 800Bp-Fragment amplifiziert werden (siehe Abbildung). Von diesen 15 positiven Klonen wurde TOP10<sup>wee1-16</sup> zur weiteren Analyse verwendet.

## 2.9.2 Klonierung des *Platynereis dumerilii* Cyclin 1-PCR-Fragments

**Amplifizierung des Cyclin 1-Fragmentes:** Aus 2h-cDNA (2.7.5) wurde mittels RT-PCR (2.8.3) unter Einsatz der „Deep Vent®“ DNA-Polymerase (2.8.1) ein 205Bp langes Fragment des *Platynereis dumerilii* Cyclin 1-Gens amplifiziert (cyc1<sup>205</sup>, Tabelle 9). Der gesamte PCR-Ansatz wurde auf einem Agarosegel aufgetrennt (2.6.4) und die 205Bp-Bande aus dem Gel extrahiert und in 20µl TE-Puffer resuspendiert (2.6.5).

**Klonierungsstrategie:** „Deep Vent®“-amplifizierte Fragmente weisen zu >95% „glatte Enden“ (siehe Fußnote 4 auf Seite 35) ohne überhängende Nukleotide auf (nach Angabe von NEB) und wurden dementsprechend in einen glattendig linearisierten Vektor einkloniert (siehe auch Abbildung 3).



**Abbildung 3: Schematische Darstellung der Klonierungsstrategie für das cyc1<sup>205</sup>-Fragment.** Der pUC18-Klonierungsvektor wurde mit dem Restriktionsenzym *Sma* I glattendig linearisiert (1). Um eine Religierung des Vektors zu verhindern, wurden seine freien 5'-Phosphatgruppen mit Alkalischer Phosphatase entfernt (2). Die 5'-Enden des mit der Deep® Vent DNA Polymerase amplifizierten cyc1-Fragmentes wurden mit der T4-Polynucleotidkinase phosphoryliert (3). In der anschließenden Ligase-Reaktion wurden die 5'-Phosphatgruppen des Fragmentes mit den 3'-OH-Gruppen des Vektors kovalent verknüpft. Die ringförmige Plasmid-Karte wurde aus dem MBI-Fermentas Katalog eingescannt.

**Linearisierung des Plasmidvektors pUC18:** 2,6µg pUC18-Vektor wurden mit 2U *Sma* I in einem Reaktionsvolumen von 50µl linearisiert. 5µl wurden zur Kontrolle gelelektrophoretisch aufgetrennt (2.6.4). Um in der nachfolgenden Ligationsreaktion eine Rezirkularisierung des Vektors zu verhindern wurden die restlichen 45µl des Restriktionsansatzes mit 2µl CIP (*calf intestine alkaline phosphatase*; 1U/µl; NEB: 290S) 60min bei 37°C inkubiert, um die freien 5'-Phosphatgruppen zu entfernen. Anschließend wurde die Reaktion mit

0,5µl 0,5M-EDTA gestoppt und das Plasmid mit dem JetSorb-Kit gereinigt (2.6.5) und in 20µl 0,1M-Tris (pH 8) resuspendiert und bei -20°C bis zur Ligationsreaktion eingefroren.

*Phosphorylierung der glattendigen PCR-Fragmente:* Da bei der *blunt end*-Klonierung der Vektor dephosphoryliert wird (s.o.), muß das zu klonierende Fragment phosphoryliert werden, um eine Ligation zu ermöglichen. Dazu wurden ca. 500-750ng des zu klonierenden *cyc1*<sup>205</sup>-Fragmentes in 17µl Reinstwasser mit 1µl T4-Polynukleotidkinase (10U/µl; NEB: 201S), 2µl 10x-Polynukleotidkinasepuffer (inkl. ATP, vom Hersteller mitgeliefert) 40min bei 37°C inkubiert und anschließend mit dem JetSorb-Kit gereinigt, in 16µl Reinstwasser resuspendiert und bis zur Ligationsreaktion bei -20°C eingefroren.

*Ligation des *cyc1*<sup>205</sup>-Fragmentes und des Vektors pUC18:* Zur Ligation wurden die 16µl des zu klonierenden Fragmentes, 1µl des linearisierten Vektors, 1µl T4-DNA-Ligase (400U/µl, Boehringer Mannheim: 481 220), 2µl 10x-Ligasepuffer (inkl. ATP, vom Hersteller mitgeliefert) im Wasserbad bei 16°C über Nacht inkubiert. Das Ligationsprodukt pUC18<sup>cyc205</sup> wurde anschließend in Bakterien amplifiziert (s.u.).

*Amplifikation in Bakterien und Plasmidpräparation:* 200µl transformationskompetente Dh5aF'-Zellen wurden mit den 20µl des Ligationsansatzes (s.o.) transformiert (2.6.8). Der gesamte Transformationsansatz wurde auf einer LB-Agarplatte (50µg/ml Ampicillin) ausgestrichen und bei 37°C über Nacht kultiviert.

*Überprüfung des Transformationserfolges:* Aus 12 von vielen hundert Bakterienklonen (Dh5aF<sup>cyc205-1</sup> - Dh5aF<sup>cyc205-12</sup>) wurde jeweils 10µg Plasmid präpariert („Plasmid Mini-Kit“, 2.6.9). Etwa 1µg davon wurden eingesetzt um mittels Restriktionsverdau mit dem Enzym *Pvu* II die Länge des einklonierten Fragmentes zu analysieren. *Pvu* II schneidet im Vektor beiderseits des Polylinkers. Mit Hilfe dieses Enzyms ließ sich das einklonierte *cyc1*<sup>205</sup>-Fragment (205Bp) zusammen mit kurzen flankierenden Vektorsequenzen (322Bp) aus dem Plasmid herausschneiden. Für den Test-Verdau ergab sich also eine erwartete Fragmentlänge von etwa 520Bp. Aus acht der 12 präparierten Plasmide ließ sich ein Fragment der erwarteten Länge herausschneiden. Vier dieser Plasmide wurden sequenziert (2.11.1). Sie enthielten alle das gleiche Fragment, dessen Sequenz in Kapitel (3.3.3). Eines dieser Plasmide (pUC18<sup>cyc205-5</sup>), aus dem am besten gewachsenen Bakterienklon (Dh5aF<sup>cyc205-5</sup>), wurde für die weiteren Untersuchungen verwendet.

**Tabelle 9: Amplifizierung des cyc1<sup>205</sup>-Fragmentes aus embryonaler cDNA.**

Komponenten	Ansatz [ $\mu$ l]	Negativkontrollen [ $\mu$ l]	Positivkontrolle [ $\mu$ l]
Reinstwasser	19	Den NK fehlten jeweils	In der PK wurde
PCR-Puffer [10x, inkl. 20mM MgSO <sub>4</sub> ]	2,5	ein oder zwei Komp.	statt der cDNA
dNTP-Mix [je 2,5mM]	1	NK1: ohne cDNA	0,1 $\mu$ l des <i>Patella</i>
5'-Primer [100 $\mu$ M]: cyc1F	0,25	NK2: ohne Polymerase	Cyclin A-Gens <sup>2)</sup>
3'-Primer [100 $\mu$ M]: cyc2R	0,25	NK3: o. cyc1F + cyc2R	eingesetzt
DNA-Matrize: 2h-cDNA <sup>1)</sup>	1	NK4: ohne cyc2R	
Deep-Vent® Polymerase [0,25U/ $\mu$ l]	1	NK5: ohne cyc1F	
Programm:	5min 94°C; 5min 72°C; 20x[30sec 94°C; 30sec 72°C]; 20x[30sec 94°C; 30sec 40°C; 30sec 72°C]; 10min 72°C	94°C; 30sec 50°C (-0,5°C je Zyklus);	

<sup>1)</sup> Aus 2h alten Embryonen isolierte mRNA wurde in cDNA umgeschrieben (2.7.5). Jeweils 1 $\mu$ l dieses cDNA-Reaktionsansatzes wurden hier als DNA-Matrize eingesetzt. <sup>2)</sup> Das *Patella*-Cyclin A-Gen wurde mir freundlicherweise von Dr. van Loon (Utrecht) zur Verfügung gestellt.

### 2.9.3 Amplifizierung eines Cyclin B und eines Cdc25-Fragmentes

*Amplifizierung des Cyclin B-Fragmentes:* Aus 6h-cDNA von *Platynereis* (2.7.5) wurde mittels RT-PCR (2.8.3) unter Einsatz der „Deep Vent®“ DNA-Polymerase (2.8.1) ein 330Bp langes vermutliches Cyclin B-Fragment amplifiziert (cyc<sup>330</sup>, Tabelle 10). Der gesamte PCR-Ansatz wurde auf einem Agarosegel aufgetrennt (2.6.4) und die 330Bp-Bande aus dem Gel extrahiert und in 20 $\mu$ l TE-Puffer resuspendiert (2.6.5).

Die resuspendierte 330Bp-Bande wurde als DNA-Matrize in einer Kontroll-PCR eingesetzt (Tabelle 11), um zu prüfen, ob sich auch mit dem internen Primer cyc2R ein Fragment amplifizieren läßt (siehe auch 3.3.4).

*Amplifizierung des cdc25-Fragmentes:* Aus 24h-cDNA von *Platynereis* (2.7.5) wurde mittels RT-PCR (2.8.3) unter Einsatz der *Taq*-DNA-Polymerase (2.8.1) ein 180Bp langes vermutliches cdc25-Fragment amplifiziert (strl<sup>180</sup>, Tabelle 12).

**Tabelle 10: Amplifizierung eines cyc<sup>330</sup>-Fragmentes aus embryonaler cDNA.**

Komponenten	Ansatz [ $\mu$ l]	Negativkontrollen 1-5 [ $\mu$ l]
Reinstwasser	11,5	Den NK fehlten jeweils ein oder zwei
PCR-Puffer [10x, inkl. 20mM MgSO <sub>4</sub> ]	2,5	Komponenten im Reaktionsansatz
MgSO <sub>4</sub> [100mM]	6	
dNTP-Mix [je 2,5mM]	2	NK1: ohne cDNA
5'-Primer [100 $\mu$ M]: cyc1F	0,25	NK2: ohne Polymerase
3'-Primer [100 $\mu$ M]: cyc3R	0,25	NK3: ohne cyc1F und ohne cyc3R
DNA-Matrize: 6h-cDNA <sup>1)</sup>	1,5	NK4: ohne cyc3R
Deep-Vent® Polymerase [0,5U/ $\mu$ l]	1	NK5: ohne cyc1F
Programm:	2min 94°C; 2min 72°C; 30x[15sec 97°C; 1min 55°C (-0,5°C je Zyklus); 1min 68°C]; 10x[15sec 97°C; 1min 40°C; 1min 68°C]; 5min 72°C	

<sup>1)</sup> Aus 6h alten Embryonen isolierte mRNA wurde in cDNA umgeschrieben (2.7.5). Jeweils 1,5 $\mu$ l dieses cDNA-Reaktionsansatzes wurden hier als DNA-Matrize eingesetzt.

**Tabelle 11 Kontroll-PCR des cyc<sup>330</sup>-Fragmentes**

Komponenten	Ansatz 1 [µl]	Ansatz 2 [µl]
Reinstwasser	18,5	18,5
PCR-Puffer [10x, inkl. 20mM MgSO <sub>4</sub> ]	2,5	2,5
dNTP-Mix [je 2,5mM]	2	2
5'-Primer [100µM]: cyc1F	0,25	0,25
3'-Primer [100µM]: cyc2R	-	0,25
3'-Primer [100µM]: cyc3R	0,25	-
DNA-Matrize: cyc <sup>330</sup> Bp-Fragment	0,5	0,5
Deep-Vent® Polymerase [0,5U/µl]	1	1
Programm:	wie in Tabelle 10	

**Tabelle 12: Amplifizierung eines str1<sup>180</sup>-Fragmentes aus embryonaler cDNA.**

Komponenten	Ansatz [µl]	Negativkontrolle [µl]	Positivkontrolle [µl]
Reinstwasser	20	20,5	20
PCR-Puffer [10x <sub>4</sub> ]	2,5	2,5	2,5
dNTP-Mix [je 2,5mM]	0,5	0,5	0,5
5'-Primer [100µM]: str1F	0,25	0,25	-
3'-Primer [100µM]: str1R	0,25	0,25	-
5'-Primer [100µM]: tub-F	-	-	0,25
3'-Primer [100µM]: tub-R	-	-	0,25
DNA-Matrize: 24h-cDNA <sup>1)</sup>	0,5	-	0,5
Taq-Polymerase [0,5U/µl]	1	1	1
Programm:	40x[1min 94°C; 1min 40°C; 1min 72]; 5min 72°C		

<sup>1)</sup> Aus 24h alten Embryonen isolierte mRNA wurde in cDNA umgeschrieben (2.7.5). Jeweils 0,5µl dieses cDNA-Reaktionsansatzes wurden hier als DNA-Matrize eingesetzt.

## 2.10 Isolation des *Platynereis dumerilii* wee1-Gens aus embryonalen

### cDNA-Banken

#### 2.10.1 Konstruktion embryonaler cDNA-Banken von *Platynereis dumerilii*

Zur Konstruktion der embryonalen cDNA-Banken von *Platynereis dumerilii* wurde das „ZAP-cDNA® Gigapack® III Gold Cloning Kit“ von Stratagene (#200450) verwendet. Das vom Hersteller beigelegte Protokoll wurde genau eingehalten. Im Verlaufe dieses Protokolls wird die mRNA (poly(A)-RNA) in cDNA umgeschrieben und in den ?-ZAP™ II-Insertionsvektor kloniert. Dieser von Bakteriophagen Lambda abgeleitete Vektor kann *in vitro* in Phagenhüllproteine verpackt werden. Die Population der so erzeugten Phagenpartikel (= primäre cDNA-Bank, Primärbank) stellen im Idealfall ein 1:1 Abbild der eingesetzten poly(A)-RNA-Moleküle dar. Um das Volumen und den Phagentiter der cDNA-Bank zu erhöhen, kann ein Teil der Primärbank in *E. coli*-Bakterien amplifiziert werden (= sekundäre cDNA-Bank, Sekundärbank). Mit dem Kit wurden insgesamt vier verschiedene cDNA-Banken hergestellt (3.3.1).



### 2.10.2 Digoxygeninmarkierung des wee1-PCR-Fragmentes zur Verwendung als Sonde

Als homologe Sonde zum Suchen des wee1-Gens in den embryonalen cDNA-Banken wurde aus dem bereits klonierten wee1<sup>572</sup>-Fragment (Plasmid pZErO<sup>wee572-16</sup>, 2.9.1) in einer PCR-Reaktion ein 328Bp-Subfragment (wee1<sup>328</sup>) mit den spezifischen Primern wee5-F und wee6-R amplifiziert (Tabelle 5; Tabelle 13). Die Reaktionsansätze wurden auf einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und die 328Bp-Bande aus dem Gel eluiert (2.6.5).

**Tabelle 13: Amplifizierung des wee1<sup>328</sup>-Fragmentes zur Verwendung als Sonde.**

Komponenten	Ansätze 1- [ $\mu$ l]
Reinstwasser	83
PCR-Puffer [10x, inkl. 20mM MgSO <sub>4</sub> ]	10
dNTP-Mix [je 10mM]	2
5'-Primer [100 $\mu$ M]	1 / wee5-F
3'-Primer [100 $\mu$ M]	1 / wee6-R
DNA-Matrize	2 / pZErO <sup>wee1-16</sup> -Plasmid [50ng/ $\mu$ l]
DNA-Polymerase [0,5U/ $\mu$ l]	1 / Deep-Vent®
Programm:	2min 94°C; 30sec 72°C <sup>1)</sup> ; 40x[30sec 94°C; 30sec 62°C; 40sec 72°C]; 5min 72°C

<sup>1)</sup> Die DNA-Polymerase wurde erst nach dem initialen Denaturierungsschritt (2min bei 94°C) bei 72°C hinzugefügt (*Hot Start-PCR*).

Zur Digoxygenin- (DIG-) Markierung wurden 1 $\mu$ g des wee1<sup>328</sup>-Subfragmentes in 16 $\mu$ l Reinstwasser mit 4 $\mu$ l „DIG High Prime“-Reaktionslösung (aus dem „DIG High Prime Labeling and Detection Starter Kit“, Boehringer Mannheim: 1745832) versetzt und für 20h bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Die Reaktionslösung enthält neben dem Klenow-Fragment der *E. coli*-DNA-Polymerase I auch Hexanukleotid-Primer, die 4 Desoxynukleotide (dATP, dTTP, dCTP, dGTP) und auch Digoxygenin-markiertes DIG-11-dUTP. Letzteres wird ebenfalls in die neusynthetisierten Fragmente eingebaut und läßt sich später über einen DIG-spezifischen Antikörper nachweisen. Mit Hilfe einer Konzentrationsreihe DIG-markierter Kontroll-DNA aus dem Kit konnte die Ausbeute der Markierungsreaktion mit etwa 2 $\mu$ g DIG-markiertem wee1<sup>328</sup>-Fragment (wee1<sup>328DIG</sup>) bestimmt werden (nach einem von Hersteller mitgelieferten Protokoll).

### 2.10.3 Isolierung des *Platynereis dumerilii* wee1-Gens aus der 45min ?-ZAP™ II cDNA-Bank mit dem Digoxygenin-markierten wee1<sup>328</sup>-Fragment

Die Suche nach dem *Platynereis dumerilii* wee1-Gen (Pdwee1) in den cDNA-Banken erfolgte nach dem Plaque-Hybridisierungsverfahren unter Verwendung der homologen DIG-markierten wee1<sup>328</sup>-Sonde (wee1<sup>328DIG</sup>, 2.10.2). Hierzu werden *E. coli*-Bakterien mit ?-Phagenpartikeln aus einer cDNA-Bank infiziert und anschließend in einem Nähragar kultiviert. Die in dem Nähragar immobilisierten Bakterien vermehren sich und bilden einen

dichten Rasen. Überall dort jedoch, wo ein Phagenpartikel aus der cDNA-Bank ein Bakterium infiziert hat, sterben durch mehrfache Infektionszyklen die benachbarten Bakterien ab und es entsteht ein klarer Plaque im Bakterienrasen. Jeder dieser Plaques geht aus einem einzigen Phagenklon der cDNA-Bank zurück und enthält etwa  $10^6$ -identischer Phagenpartikel (nach Angaben von Stratagene). Die Phagenpartikel aus den Plaques werden anschließend 1:1 auf eine Nylonmembran (Hybond<sup>TM</sup>N+, Amersham: RPN303B) übertragen. Durch Hybridisierung mit DIG-wee1<sup>328</sup> werden die wee1-positiven Phagenklone markiert. Mit einem DIG-spezifischen primären Antikörper, einem Alkalische-Phosphatasegekoppelten sekundären Antikörper und dem „BCIP/NBT-Phosphatase Substrat System“ (Kirkegaard & Perry: 50-81-00) können die wee1-positiven Plaques auf dem Nylonfilter sichtbar gemacht werden. Durch Vergleich des Nylonfilters mit dem Nähragar können die Originalplaques identifiziert und aus dem Nähragar ausgestochen werden. Jeder Plaque wird in 500µl SM-Puffer übertragen und die Phagenpartikel aus dem Agar durch gründliches Mischen herausgelöst.

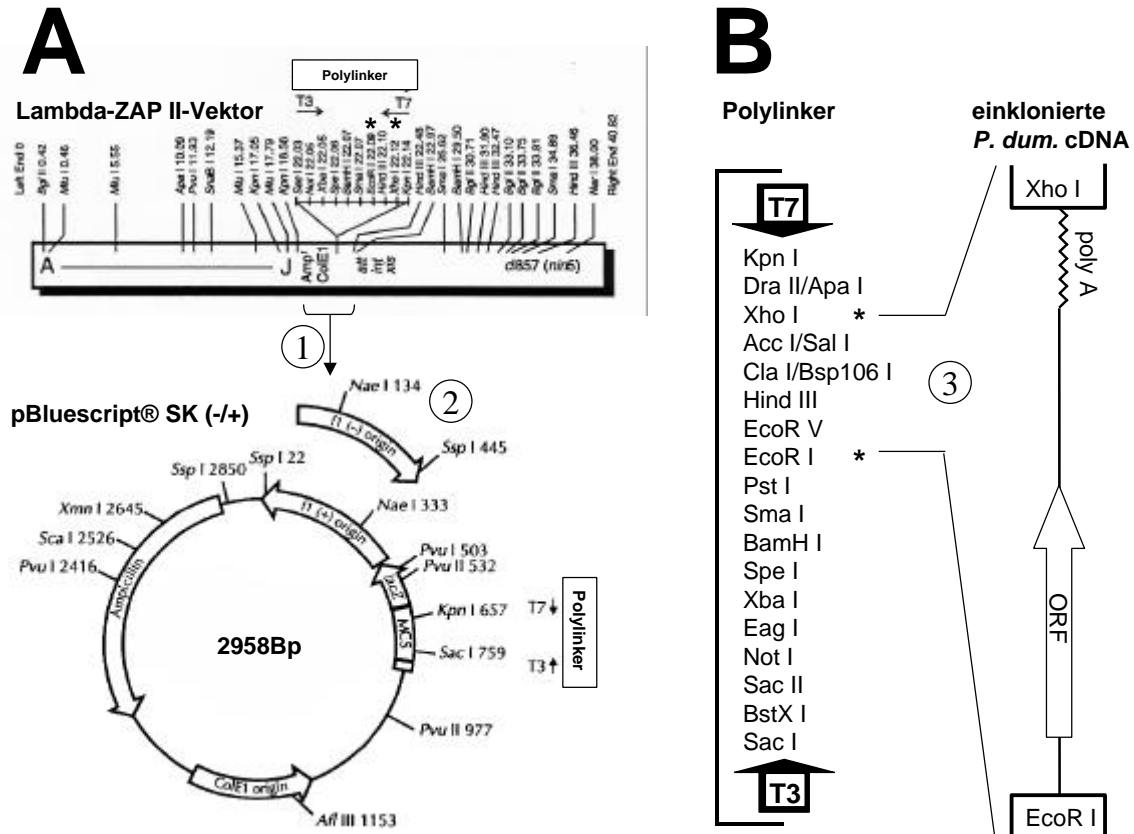
Das Ausplattieren der Phagenpartikel und die Übertragung auf die Nylonfilter wurde nach dem „DNA-Screening-Protocol“ des „ZAP-cDNA® Gigapack® III Gold Cloning Kit“ von Stratagene (#200450) durchgeführt. Die Hybridisierung mit wee1<sup>328DIG</sup> und der Antikörpernachweis der positiven Plaques wurde nach dem „Colony and Plaque Hybridization“-Protokoll aus „The DIG System User’s Guide for Filter Hybridization“ von Boehringer Mannheim (ISBN 3-88630-200-8) mit dem dort angegebenen „Standard-Hybridisierungspuffer“ (inkl. 50% Formamid) durchgeführt.

Für die Suche nach dem *Platynereis dumerilii* wee1-Gen wurden 10x 45000pfu der 45min-?ZAP cDNA-Bank mit je 600µl XL1-Blue MRF'-Zellen (OD<sub>600</sub>=0,5) auf 11x11cm NZY-Agarplatten ausplattiert. Die Konzentration der wee1<sup>328DIG</sup>-Sonde im Hybridisierungspuffer betrug etwa 20ng/ml. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 42°C in einem Schüttelwasserbad. Es wurden insgesamt 3 positive Plaques identifiziert (?-ZAP<sup>wee1-3</sup>, ?-ZAP<sup>wee1-4</sup>, ?-ZAP<sup>wee1-10</sup>).

#### 2.10.4 “in vivo Excision” des Plasmids pBluescript aus den isolierten ?-ZAP-Klonen

Der ?-ZAP II Vektor ist so konstruiert, daß innerhalb des ?-ZAP-Genoms das Plasmid pBluescript SK (-) integriert ist und die einklonierte *Platynereis dumerilii*-cDNA wiederum innerhalb der Plasmidsequenz liegt. Die Plasmidsequenz wird auf der einen Seite von der Replikations-Initiationssequenz und auf der anderen Seite von der Replikations-Termina-

tionssequenz des f1-Phagen<sup>5</sup> flankiert. Das ermöglicht in einem einfachen *in vivo* Ansatz das Herausschneiden des pBluescript-Plasmids aus dem λ-ZAP-Klon. Dazu werden in einem ersten Schritt XL1-Blue MRF<sup>-</sup>-Zellen sowohl mit einem λ-ZAP-Klon als auch einem f1-Helferphagen infiziert. Die vom Helferphagen kodierten Proteine replizieren selektiv das im λ-ZAP-Klon enthaltene Plasmid und verpacken es in f1-Hüllproteine.



**Abbildung 4: Schematische Darstellung des Konstruktionsprinzips der λ-ZAP cDNA-Bank.**

**A:** Der vom Bakteriophagen Lambda abgeleitete Vektor λ-ZAP II beinhaltet in der zentralen Region seines Genoms das linearisierte Plasmid pBluescript SK (-) (1). In den Polylinker des integrierten Plasmids wurden die embryonalen cDNA's von *Platynereis dumerilii* einkloniert (vgl. B). Über eine *in vivo*-Reaktion kann das Plasmid pBluescript mitsamt der einklonierten cDNA als ringförmiges Molekül aus dem λ-ZAP II-Vektor gewonnen werden (1). Bei der pBluescript-Variante SK (-) ist das Replikationsorigin des f1-Phagen entgegen dem lacZ-Gen orientiert (2).

**B:** Die *Platynereis*-cDNA's wurden zwischen die Xho I und Eco R I Schnittstellen des Polylinkers einkloniert (3). Die 5'- zu 3'-Orientierung des Leserahmens (ORF: *open reading frame*) verlief dabei immer von T3 nach T7. Die Promotoren T3 bzw. T7 erlauben die *in vitro* Transkription von *sense* bzw. *anti sense*-RNA. Die Karten des λ-ZAP II Vektors und des Plasmids pBluescript SK sind aus dem „Instruction Manual“ des „ZAP-cDNA® Gigapack® III Gold Cloning Kit“ herauskopiert.

<sup>5</sup> Der f1-Phage gehört zu der Gruppe der filamentösen Bakterienviren, deren Erbmaterial in eine fadenförmige Hülle aus unterschiedlichen Proteinen verpackt ist. Das Genom von f1 ist weitgehend identisch mit dem Genom der Phagen fd und M13.

So entsteht ein infektiöser f1-Phagenpartikel der das Plasmid samt der einklonierten *Platynereis dumerilii*-cDNA enthält. Bei diesem ersten Schritt entstehen natürlich auch neue  $\lambda$ -ZAP-Klone und f1-Helferphagen. Um die als f1-Phagen verpackten Plasmide von den kontaminierenden Viren zu befreien, werden die Bakterienzellen abzentrifugiert und der zellfreie Überstand zur Infektion von SOLR-Zellen verwendet. Der *E. coli*-Stamm SOLR ist resistent gegenüber  $\lambda$ -Phagen. Außerdem kann der f1-Helferphage in den SOLR-Zellen nicht replizieren. Nur die als f1-Phagen verpackten Plasmide können die SOLR-Zellen sowohl infizieren (vermittelt durch die f1-Hüllproteine), als auch innerhalb der Bakterien (als Plasmid) replizieren.

Auf diese Weise wurde unter Verwendung des „Single Clone Exision Protocol“ aus dem „ZAP-cDNA® Gigapack® III Gold Cloning Kit“ von Stratagene (#200450) aus den wee1-positiven  $\lambda$ -ZAP-Klonen ( $\lambda$ -ZAP<sup>wee1-3</sup>,  $\lambda$ -ZAP<sup>wee1-4</sup>,  $\lambda$ -ZAP<sup>wee1-10</sup>) die pBluescript-Plasmide „pBlwee1-3“, „pBlwee1-4“ und „pBlwee1-10“ herausgeschnitten. pBlwee1-4 wurde teilweise, pBlwee1-10 vollständig sequenziert (2.11.2). Das Konstruktionsprinzip der  $\lambda$ -ZAP cDNA-Bank und der „*in vivo* Excision“ sind in Abbildung 4 schematisch dargestellt.

## 2.11 Sequenzierung und Sequenzanalyse der *Platynereis* Gene

### 2.11.1 Sequenzierung der klonierten PCR-Fragmente

Die klonierten PCR-Fragmente (2.9) wurde mit dem „T7-Sequencing-Kit“ (Amersham-Pharmacia: 27-1682-01) nach Anleitung des Herstellers sequenziert. Grundlage dieses Kits ist die Kettenabbruchmethode nach Sanger *et al.* (1977). Als Sequenzierungsprimer wurde sowohl der im Kit enthaltene „Universal Sequencing Primer“ als auch der „Reverse Sequencing Primer“ (Amersham-Pharmacia: 27-1532-02) verwendet. Beide Primer hybridisieren mit Vektorsequenzen die entweder unmittelbar vor dem 5'- oder hinter dem 3'-Ende des Polylinkers liegen und in sehr vielen Klonierungsvektoren enthalten sind. Die Syntheseprodukte wurden durch den Einbau von Deoxyadenosine 5'-[ $\alpha$ -<sup>35</sup>S]thiotriphosphate ([<sup>35</sup>S]dATPaS; Amersham Pharmacia: AG1001) radioaktiv markiert. Nach dem Auftrennen der DNA-Fragmente in einem denaturierenden Polyacrylamidgel (8% in TBE-Puffer, 42% Harnstoff; vgl. 2.5.4) wurden die Banden autoradiographisch auf „Kodak Scientific Imaging Film X-Omat AR“ sichtbar gemacht und die Sequenz abgelesen. Die Sequenz des *cyc1*<sup>205</sup>-Fragmentes ist in Abbildung 21, die Sequenz des *wee1*<sup>572</sup>-Fragmentes in Abbildung 18 aufgeführt.

### 2.11.2 Sequenzierung der isolierten wee1-positiven pBluescript-Plasmide

Die Plasmide pBlwee1-10 und pBLwee1-4 (2.10.4) wurden durch die Firma Sequence Laboratories Göttingen GmbH (SEQLAB) unter Verwendung der in Tabelle 14 aufgeführten Primer sequenziert (Abbildung 18). pBlwee1-10 wurde vollständig, pBlwee1-4 nur im 5'-Bereich sequenziert. Bis auf die Standard-Sequenzierungsprimer (T3 und T7), die von SEQLAB direkt zur Verfügung gestellt wurden, wurden alle Sequenzierungsprimer von mir selbst entworfen und von den Firmen MWG-Biotech GmbH (Ebersberg) oder GenTech Mainz (Mainz) im Auftrag synthetisiert.

**Tabelle 14: Charakterisierung der verwendeten Sequenzierungs-Primer.** 5'-Primer entsprechen in ihrer Sequenz der mRNA des wee1-Gens. 3'-Primer entsprechen dagegen der *anti-sense* RNA des wee1-Gens.

Bezeichnung	Orientierung	Hybridisierungsregion	Nukleotidsequenz
T3	5'	T3-Promotorregion des Vektors	5'-aat taa ccc tca cta aag gg-3'
T7	3'	T7 Promotorregion des Vektors	5'-taa tac gac tca cta tag gg-3'
wee8-F	3'	Pdwee1-Gen	5'-caa att agg aga tgg aga a-3'
wee9-R	5'	Pdwee1-Gen	5'-gct atg aac aac aat cct g-3'
wee10-F	3'	Pdwee1-Gen	5'-cag gaa gac acg agc aca g-3'
wee11-R	5'	Pdwee1-Gen	5'-aat agt cac acg aac ctg c-3'
wee12-F	3'	Pdwee1-Gen	5'-att tac cca agg cgg aca t-3'

### 2.11.3 Sequenzanalyse

Die ermittelten Nukleotid-Sequenzen der *Platynereis* PCR-Fragmente (wee1<sup>572</sup> und cyc1<sup>205</sup>) bzw. des *Platynereis* wee1-Gens (Pdwee1) wurden mit dem „ExpASY Translate Tool“ (<http://www.expasy.ch/tools/dna.html>) des „Swiss Institute of Bioinformatics“ in Aminosäuresequenzen übersetzt. Die Aminosäuresequenz wurde mit vorhandenen EMBL- und Genbank-Datenbankeinträgen unter Verwendung der Programme Fasta (<http://www2.ebi.ac.uk/fasta3/>, Pearson und Lipman 1988) und Blast (<http://www2.ebi.ac.uk/blast2/>, Gish 1996-1999) verglichen. Multiple Alignments wurden mit dem Programm ClustalW (<http://www2.ebi.ac.uk/clustalw/>, Thompson *et al.* 1994) durchgeführt. In den Alignments wurden alle identischen Aminosäuren (AS) weiß auf schwarz und alle ähnlichen AS schwarz auf grau hervorgehoben. Dabei wurden die AS anhand ihrer physiko-chemischen Eigenschaften als „ähnlich“ eingestuft (siehe Zappo-Farbschema in der „Jalview“-Dokumentation, <http://www2.ebi.ac.uk/~michele/jalview/contents.html>). Diese Programme stehen zum Beispiel über den Internet-Server des

„EMBL-European Bioinformatics Institute“ ([http://www.ebi.ac.uk/ebi\\_home.html](http://www.ebi.ac.uk/ebi_home.html)) zur Verfügung.

Die physiko-chemischen Eigenschaften der ermittelten Aminosäuresequenzen wurden mit dem Programm „ProtParam“ (<http://www.expasy.ch/tools/protparam.html>) ermittelt. Aminosäuresequenz-Motive wurden mit den Internetressourcen „Scan Prosite“ (<http://www.expasy.ch/tools/scnpsit1.html>), „ProfileScan“ ([http://www.isrec.isb-sib.ch/software/PFSCAN\\_form.html](http://www.isrec.isb-sib.ch/software/PFSCAN_form.html)) oder „WWW PESTfind Analysis“ (<http://www.at.embnet.org/embnet/tools/bio/PESTfind/>) identifiziert.

Restriktionsverdau-Analysen wurden mit dem Internetprogramm „WWWtacg“ (Version 2.38, <http://hornet.bio.uci.edu/~hjm/projects/tacg/tacg2.form.html>) durchgeführt.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Volumetrische Vermessung und fluoreszenzmikroskopische Analyse früher Furchungsstadien von *Aplysia californica*

Während der ersten beiden Furchungsteilungen entstehen bei inäqual furchenden Spiraliern vier unterschiedlich große Blastomeren. Bei der Mehrzahl dieser Keime enthält die größte dieser Blastomeren besonders viel dotterfreies Zytoplasma. Viele Experimente belegen, daß das spezielle Schicksal dieser D-Blastomere (Bildung des Mesentoblasten u.a.) durch morphogenetische Faktoren innerhalb des dotterfreien Zytoplasmas determiniert wird (für Literatur siehe Diskussion). Die Ausstattung mit dotterfreiem Zytoplasma ist darüber hinaus auch mit der Zellteilungsgeschwindigkeit der Blastomeren korreliert. Blastomeren mit viel dotterfreiem Zytoplasma haben kürzere Zellzyklen als Blastomeren mit wenig dotterfreiem Zytoplasma (Dorresteijn und Luetjens 1994, Dorresteijn 1990).

Bei der marinen Schnecke *Aplysia californica* hingegen wird nicht die größte, sondern eine der kleineren Blastomeren des 4-Zellstadiums zur D-Zelle determiniert. Ich wollte deshalb durch eine präzise volumetrische Vermessung früher Furchungsstadien feststellen, ob die D-Zelle von *Aplysia californica*, trotz ihrer geringeren Größe, besonders reich mit dotterfreiem Zytoplasma ausgestattet ist (3.1.1). Zusätzlich habe ich die genaue Abfolge der frühen Furchungsteilungen ermittelt (3.1.2). Damit sollte aufgeklärt werden, ob im Keim von *Aplysia californica*, wie bei anderen inäqual furchenden Spiraliern, die Teilungsrate mit dem Gehalt an dotterfreiem Zytoplasma korreliert ist.

#### 3.1.1 Volumetrische Vermessung der frühen Furchungsstadien

Zur volumetrischen Vermessung der Blastomeren wurden von einem 4-Zellstadium, drei 3-Zellstadien und zwei 2-Zellstadien Serien von 1µm dicken Semidünnschnitten hergestellt und am Computer präzise planimetrisch vermessen. Aus den Meßdaten ließen sich die Zellvolumina und die jeweiligen Anteile des Dotters und des dotterfreien Zytoplasmas berechnen. Aus den Meßdaten älterer Furchungsstadien ließen sich durch Aufsummieren der Volumina der Geschwisterblastomeren auch die Blastomeren volumina der jeweiligen Mutterzelle aus vorhergehenden Stadien bis hin zur Zygote berechnen. In Tabelle 15 sind die durchschnittlichen Absolutwerte für die jeweiligen Zell-, Dotter- und Zytoplasmavolumina in µm<sup>3</sup> angegeben.

**Tabelle 15: Absolute Volumina der Blastomeren, des Dotters und des dotterfreien Zytoplasmas.**

Blastomere	Volumina [ $\mu\text{m}^3$ ]			Durchmesser [ $\mu\text{m}$ ] <sup>1)</sup>
	Zellvolumen	Zytoplasma	Dotter	
Zygote (n=6) <sup>2)</sup>	179862 ( $\pm 11293$ )	102864 ( $\pm 11055$ )	76321 ( $\pm 1851$ )	70 ( $\pm 1,4$ )
<i>2-Zellstadium</i>				
AB (n=6) <sup>3)</sup>	131168 ( $\pm 7362$ )	61214 ( $\pm 6937$ )	69954 ( $\pm 1605$ )	
CD (n=6) <sup>3)</sup>	48358 ( $\pm 5111$ )	41650 ( $\pm 4842$ )	6368 ( $\pm 823$ )	
<i>4-Zellstadium</i>				
A (n=1)	57728	26036	31692	
B (n=1)	67943	28270	39672	
C (n=4)	24909 ( $\pm 3421$ )	21482 ( $\pm 3435$ )	3012 ( $\pm 364$ )	
D (n=4)	24867 ( $\pm 2894$ )	21696 ( $\pm 2523$ )	3074 ( $\pm 509$ )	

<sup>1)</sup> Der Durchmesser wurde unter der Annahme berechnet, daß die Zygote kugelförmig ist. <sup>2)</sup> Die Zygotenvolumina wurden durch Aufsummieren der Volumina aller Blastomeren eines Keimes errechnet. <sup>3)</sup> Die Volumina der AB- bzw. CD-Blastomeren wurden zum Teil direkt vermessen, zum Teil aber auch durch aufsummieren der Volumina für die Blastomeren A und B bzw. C und D errechnet.

Die Zygoten haben durchschnittlich ein Volumen von  $179862\mu\text{m}^3$  bei einer Standardabweichung von  $\pm 11293\mu\text{m}^3$ . Daraus ergibt sich ein Zygotendurchmesser von ca.  $70\mu\text{m}$ . Die sehr gute Übereinstimmung des berechneten Durchmessers mit dem unter dem Mikroskop unmittelbar gemessenen Wertes (3.1.2) und die mit 6,2% des Durchschnittsvolumens geringe Standardabweichung sprechen für die Verlässlichkeit der volumetrischen Messung,

Aus den Absolutwerten lassen sich aber die Volumenproportionen der Blastomeren und die Volumenanteile des Dotters und des dotterfreien Zytoplasmas nicht ohne weiteres erkennen. Deshalb habe ich die Absolutwerte mit den jeweils für die Zygote gemessenen Werten in Relation gesetzt und so als prozentualen Anteil am Gesamtvolumen, an dem gesamten dotterhaltigen oder auch dotterfreiem Plasma ausgedrückt (Tabelle 16, Spalten 2-4). Daraus wird ersichtlich, daß bei der ersten Furchungsteilung das Zygotenvolumen sowie der Dotter und das dotterfreie Zytoplasma asymmetrisch und mit unterschiedlichen Proportionen auf die beiden Tochterzellen aufgeteilt werden. Insgesamt erhält die größere AB-Blastomere 73% und die kleinere CD-Blastomere nur 27% des Zygotenvolumens. Die CD-Blastomere erhält aber mit 40% überproportional viel des gesamten dotterfreien Zytoplasmas. Dafür wird der AB-Blastomere 92% des gesamten Dotters zugeteilt, wogegen nur 8% des Dotters in die CD-Blastomere gelangt.

Die zweite Furchungsteilung verläuft sowohl in AB als auch in CD äqual. Das Volumen der Blastomere AB wird mit 34% bzw. 40% nahezu gleichmäßig auf die beiden Tochterblastomeren A und B aufgeteilt. Beide erhalten mit 29% bzw. 31% des gesamten



dotterfreien Zytoplasmas und mit 41% bzw. 52% des gesamten Dotters auch ungefähr je die Hälfte der Ressourcen von AB. Die Blastomeren C und D erhalten jeweils 14% des ursprünglichen Zygotenvolumen und jeweils 21% bzw. 4% des gesamten Zytoplasmas bzw. Dotters. Die Volumenwerte für A und B beruhen auf der Vermessung nur eines 4-Zellstadiums. Deshalb ist ungewiß, ob die geringen Unterschiede zwischen A und B signifikante Teilungsasymmetrien oder individuelle Schwankungen widerspiegeln. Bei der Betrachtung individueller Keime lassen sich auch für die Blastomeren C und D geringe Unterschiede nachweisen (hier nicht dargestellt). Über die größere Anzahl an Meßwerten, von einem 4-Zellstadium und drei 3-Zellstadien, gleichen sich diese individuellen Schwankungen jedoch gegenseitig aus, und der äquale Charakter der zweiten Furchungsteilung tritt deshalb deutlich zutage.

**Tabelle 16: Relative Volumina der Blastomeren, des Dotters und des dotterfreien Zytoplasmas.**

<b>Spalte: 1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>
Blastomere	Anteil [%] <sup>1)</sup> am Gesamtv. im Keim an...			Anteil [%] am jeweiligen Blastomerenvol.		
	Zellvolumen	Zytoplasma	Dotter	Zellvolumen	Zytoplasma	Dotter
Zygote (n=6)	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	57 (±2,5)	43 (±2,4)
<i>2-Zellstadium</i>						
AB (n=6)	73 (±1,7)	60 (±2,0)	92 (±1,0)	<b>100</b>	47 (±2,7)	53 (±2,7)
CD (n=6)	27 (±1,6)	40 (±2,0)	8 (±1,0)	<b>100</b>	86 (±1,6)	14 (±1,7)
<i>4-Zellstadium</i>						
A (n=1)	34	29	41	<b>100</b>	45	55
B (n=1)	40	31	52	<b>100</b>	42	58
C (n=4)	14 (±1,1)	21 (±1,6)	4 (±0,5)	<b>100</b>	88 (±2,8)	12 (±1,0)
D (n=4)	14 (±1,0)	21 (±1,8)	4 (±0,7)	<b>100</b>	88 (±0,4)	12 (±0,9)

<sup>1)</sup> Die prozentualen Anteile wurden zunächst für jeden Keim einzeln berechnet und erst zum Schluß aufaddiert. Daraus ergeben sich teilweise scheinbare Diskrepanzen zwischen den Werten. So ist z. B. die Summe der prozentualen Volumenanteile von A und B nicht gleich dem prozentualen Volumenanteil von AB. Das liegt daran, daß der Volumenanteil von AB dem Durchschnitt von 6 Keimen entspricht, wogegen die Volumenanteile von A und B einen Einzelwert repräsentieren.

Aufgrund der extrem asymmetrischen ersten Furchungsteilung entstehen also im Keim von *Aplysia californica* Blastomeren, die sich nicht nur in ihrer Größe, sondern auch in ihrer zytoplasmatischen Zusammensetzung unterscheiden. Die unterschiedliche Zusammensetzung der Blastomeren wird besonders deutlich, wenn man die Volumenanteile des Dotters und des dotterfreien Zytoplasmas in Relation zum jeweiligen Blastomerenvolumen setzt (Tabelle 16, Spalten 5-7) und so deren prozentualen Anteil am jeweiligen Blastomerenvolumen errechnet. Die Zygote besteht zu 57% aus dotterfreiem Zytoplasma

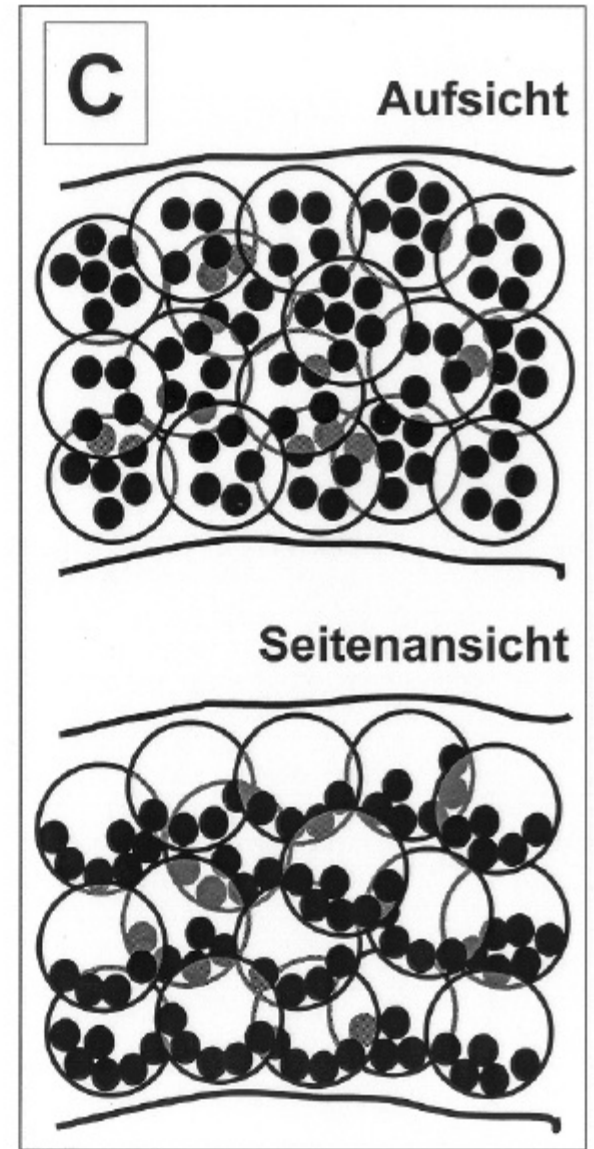
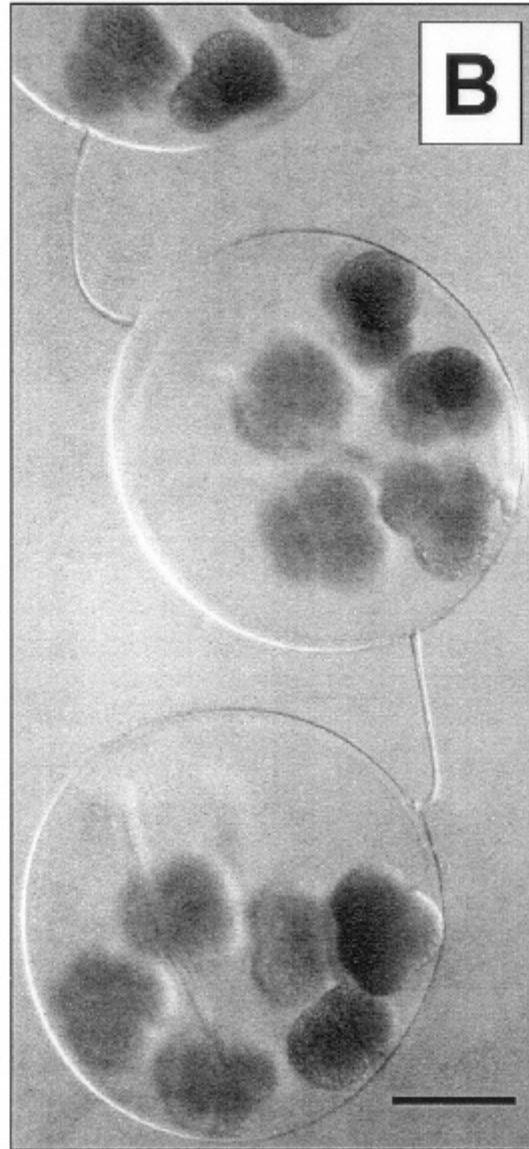
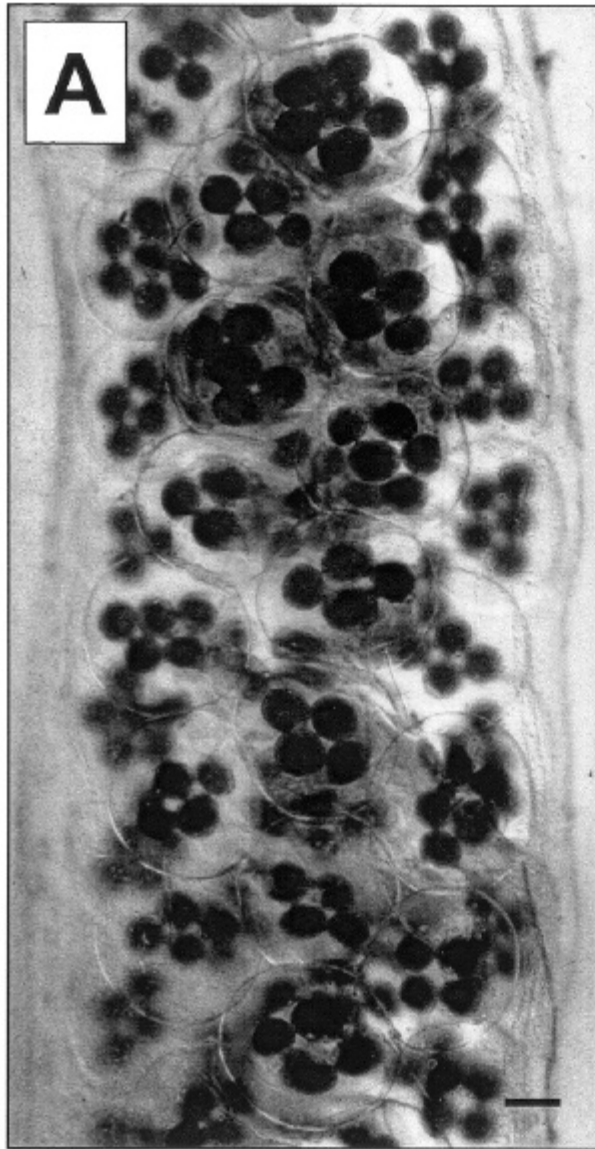
und zu 43% aus Dotter. Nach der ersten Furchungsteilung unterscheiden sich die Blastomeren des 2-Zellstadiums sehr stark in ihrer Zusammensetzung. Während die AB-Blastomere nur zu 47% aus dotterfreiem Zytoplasma aber zu 53% aus Dotter besteht, ist die CD-Blastomere aus 86% dotterfreiem Zytoplasma und nur 14% Dotter zusammengesetzt. Diese Unterschiede werden während der zweiten Furchungsteilung auf die Tochterzellen weitergegeben. Die Zellen A und B enthalten zu über 55% nur Dotter. Im Gegensatz dazu enthalten die Zellen C und D jeweils 88% dotterfreies Zytoplasma.

### 3.1.2 Analyse der frühen Furchungsteilungen von *Aplysia californica*

Die Eier von *Aplysia californica* haben einen Durchmesser von etwa 70µm und sind jeweils zu mehreren in flüssigkeitsgefüllte Kapseln (Ø~350µm) verpackt. Die Kapseln sind durch dünne Fäden („Chalazae“) perlschnurartig untereinander verbunden (Abbildung 5B). Diese im Prinzip ununterbrochene Kette von Eikapseln ist ihrerseits innerhalb einer zähen Gallerte vielfach gewunden zu einer kräftigen, etwa 1mm dicken Eischnur verklebt (Abbildung 5A). Die Eier sind innerhalb der Eikapsel­flüssigkeit frei beweglich und sinken nach jeder Drehung aufgrund der Schwerkraft erneut auf den Boden der Kapsel. In *Seitenansicht* erkennt man deshalb eine klare Schichtung der Eier in mehrere übereinander liegende Ebenen, wogegen die Eier in *Aufsicht* homogen verteilt erscheinen (Abbildung 5C). Diese hohe Beweglichkeit in den Kapseln erlaubt den Eiern, sich während der Furchungsphase stark zu verformen.

Entlang der viele Zentimeter langen Eischnur sind die Embryonen unterschiedlich weit entwickelt. Während proximal gelegene Eier noch die meiotischen Teilungen durchlaufen, befinden sich distal gelegene Embryonen bereits in einem fortgeschrittenen Furchungsstadium. Aus verschiedenen Abschnitten der Eischnüre wurden deshalb Embryonen fixiert und mit dem DNA-spezifischen Fluoreszenzfarbstoff Hoechst 33258 gefärbt (Abbildung 6b, d, e, f). Parallel dazu wurde die Entwicklung einiger lebender Keime unter dem Mikroskop verfolgt. Die lebenden Keime sind sehr opak und lassen eine Beobachtung der Kerne nicht zu. Die angegebenen Entwicklungszeiten beziehen sich deshalb auf den sichtbaren Beginn der Furchungsteilungen. Weil mir nur drei Gelege zur Verfügung standen, können die Entwicklungszeiten jedoch nur zur groben Orientierung dienen (Abbildung 6G).

**Abbildung 5: Aufbau der Eischnüre von *Aplysia californica*.** Erläuterungen im Text. Der schwarze Balken repräsentiert jeweils 100µm.



Bei 18°C entwickeln sich die Eier von *Aplysia californica* sehr langsam. Nach dem Absammeln der Gelege am frühen Morgen dauert es noch mindestens vier Stunden bis die ersten Keime den ersten Polkörper abschnüren. Nach weiteren 30 Minuten wird der zweite Polkörper sichtbar (Abbildung 6A). Etwa 2,5 Stunden nach dem Abschluß der meiotischen Teilungen beginnt die Furchungsphase. Bereits im lichtmikroskopischen Bild kann man erkennen, daß die kleinere CD-Blastomere relativ mehr dotterfreies Zytoplasma erhält als die größere AB-Blastomere (Abbildung 6B). Zwei Stunden nach der ersten Furchungsteilung beginnt sich die CD-Blastomere erneut einzuschnüren. Die Teilung der AB-Blastomere erfolgt 15min später. An fixierten Keimen ist zu erkennen, daß dieser zeitliche Vorsprung der CD-Blastomere bereits bei Beginn der zweiten mitotischen Zellteilung besteht: die Kernhülle von CD ist aufgelöst und das Chromatin kondensiert sich bereits, während AB noch in der Prophase verharrt (Abbildung 6B, b). Als Folge davon rekonstituieren sich die Kerne von C und D schon wieder, während sich AB noch furcht (Abbildung 6C). Wiederum zwei Stunden nach der zweiten Furchungsteilung setzt synchron die dritte Furchungsteilung in den Blastomeren C und D ein. 30min später furchen sich die Blastomeren A und B. Wie an lebenden Keimen, so konnte ich auch an fixierten Keimen keinerlei Asynchronien zwischen den Zellzyklen der Blastomeren C und D einerseits und A und B andererseits feststellen. Die Kerne der Blastomeren C und D lösen sich synchron auf, vor den Kernen der Blastomeren A und B (Abbildung 6D, d). Während A und B noch die Metaphase durchlaufen, haben C und D bereits die ersten Mikromeren zum animalen Pol hin abgeschnürt (Abbildung 6E, e). Nachdem sich auch die Blastomeren A und B geteilt haben, ist die dexiotrope dritte Furchungsteilung abgeschlossen und das 8-Zellstadium erreicht (Abbildung 6F, f). Obwohl sie aus unterschiedlich großen Blastomeren hervorgegangen sind, sind alle vier Mikromeren annähernd gleich groß (Abbildung 6G) und scheinen alle, zumindest bei lichtmikroskopischer Betrachtung, beinahe ausschließlich aus dotterfreiem Zytoplasma zu bestehen.

Lichtmikroskopisch lassen sich weder C von D noch A von B anhand der Größe oder Zellmorphologie voneinander unterscheiden. Um dennoch die embryonalen Quadranten benennen zu können, habe ich eine Gesetzmäßigkeit genutzt, die bei nahezu allen Spirallerkeimen zum Tragen kommt: am vegetalen Pol berühren sich stets die B- und D-Blastomere in der sogenannten vegetalen Kreuzfurche (Wilson 1928, Seite 990). Deshalb habe ich 165 Vierzellstadien daraufhin untersucht, welche beiden gegenüberliegenden Blastomeren sich am vegetalen Pol berühren. Für die von mir untersuchten drei Gelege ergab sich aus dieser Analyse, daß bei allen Keimen die embryonalen Quadranten

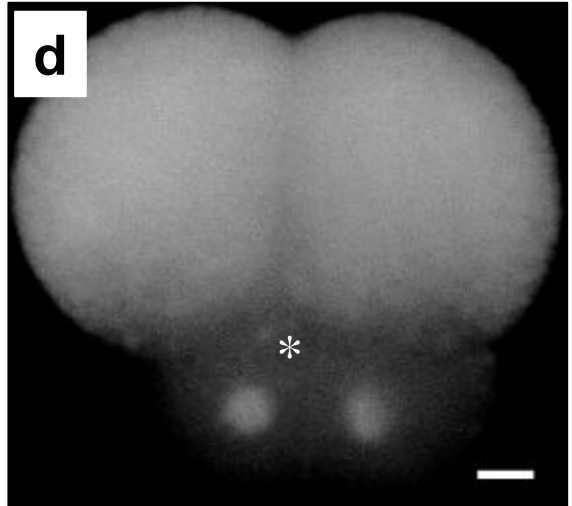
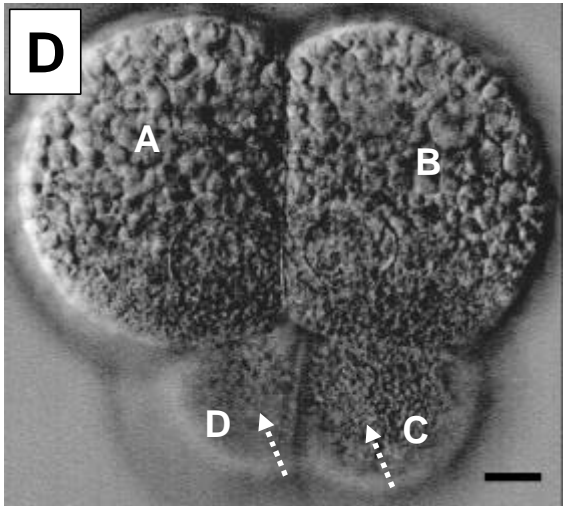
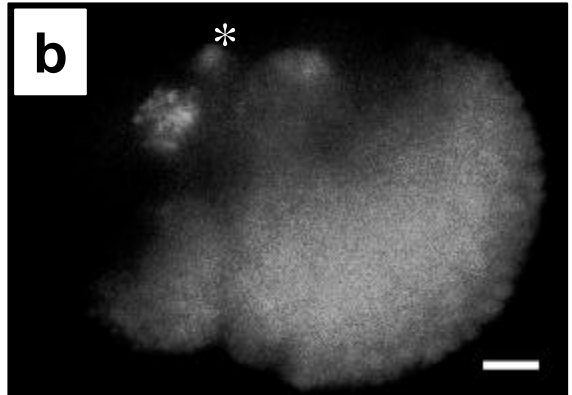
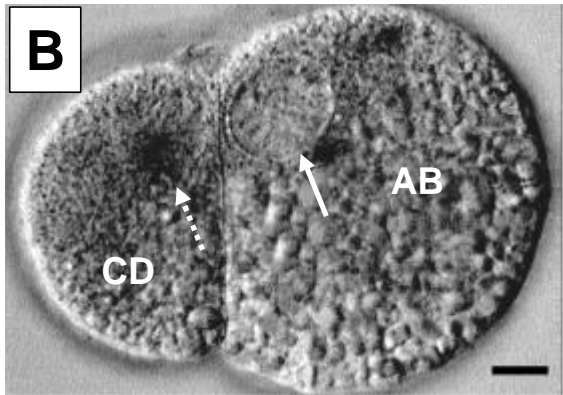
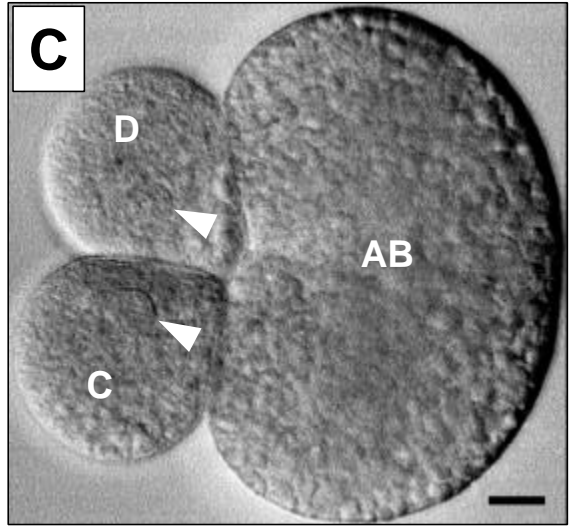
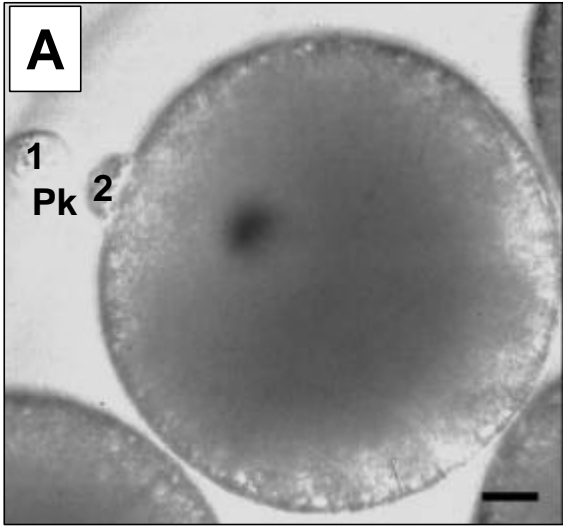
vom animalen Pol betrachtet im Uhrzeigersinn angeordnet waren (Abbildung 6G Mitte). Die Blastomeren B und D berühren sich bei *Aplysia californica* sowohl am vegetalen, als auch am animalen Pol des Keimes.

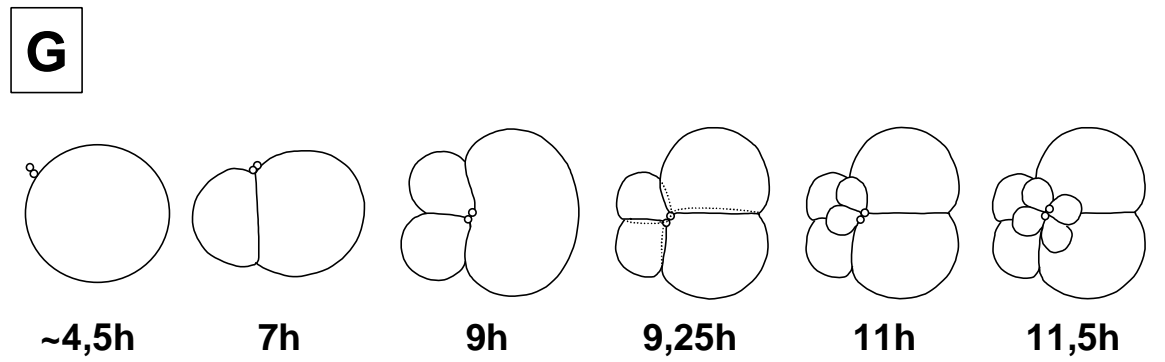
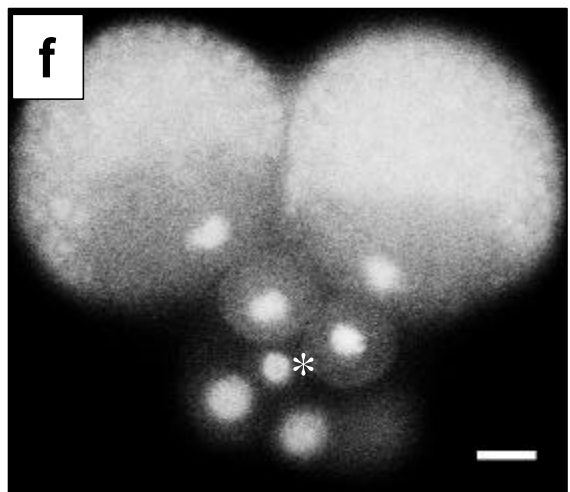
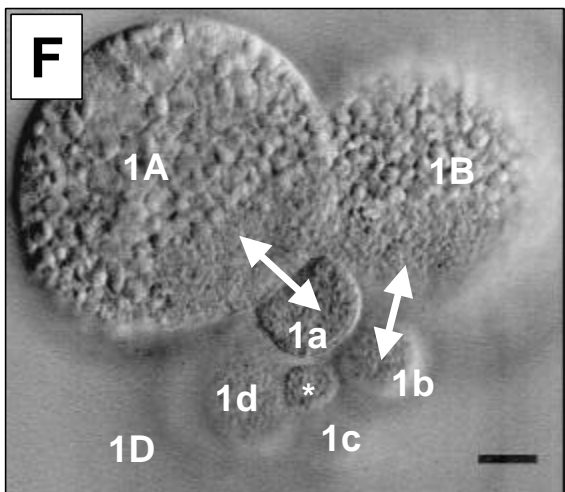
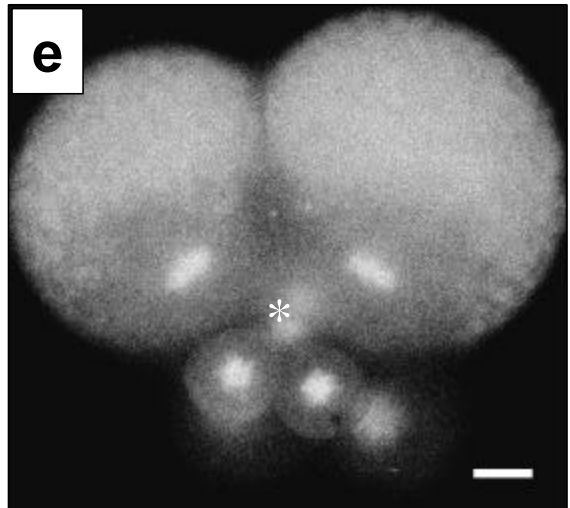
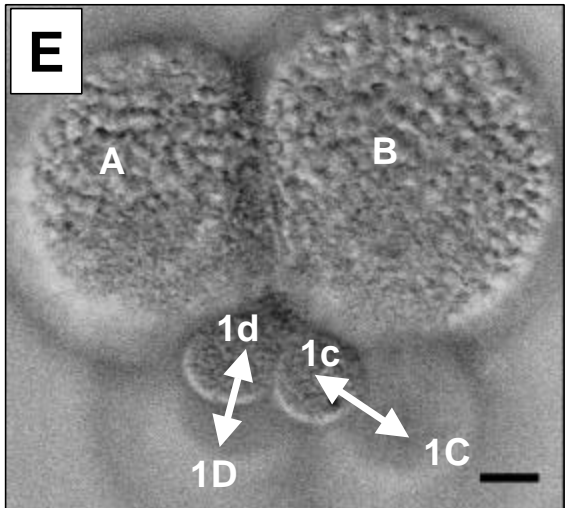
Aufgrund des wenigen Keimmaterials, das mir zur Verfügung stand, konnten die Dauer der Zellzyklen nicht präzise angegeben werden und es konnten auch nur die ersten drei Furchungen in die Studie einbezogen werden. Dennoch wird deutlich, daß beim Keim von *Aplysia californica* wie bei anderen Spiraliern auch die Zellzyklusdauer derjenigen Blastomeren am kürzesten ist, welche besonders reich mit dotterfreiem Zytoplasma ausgestattet sind. Allerdings ist dabei nicht wie bei *Platynereis* der absolute Anteil am gesamten dotterfreien Zytoplasma entscheidend, sondern der relative Anteil in Bezug zum jeweiligen Blastomerenvolumen. Die Zelle AB und ihre Tochterzellen A und B enthalten mit 60, 29 bzw. 31% deutlich mehr des gesamten dotterfreien Zytoplasmas als ihre jeweiligen Geschwisterzellen CD (40%) bzw. C und D (je 21%). Dennoch haben AB bzw. A und B deutlich längere Zellzyklen als CD bzw. C und D. Der Dotter scheint in diesen Zellen, wie es auch in einigen Lehrbüchern beschrieben wird, den Zellzyklus (mechanisch) zu hemmen (siehe Diskussion).

Die Geschwindigkeit der Zellzyklen korreliert bei *Aplysia californica* mit dem relativen Anteil des dotterfreien Zytoplasmas am Blastomerenvolumen. CD besteht zu 86%, die Zellen C und D zu je 88% aus dotterfreiem Plasma, wogegen AB, A und B nur zu je 47, 45 bzw. 42% aus dotterfreiem Plasma bestehen.

*folgende zwei Seiten:*

**Abbildung 6: Die frühen Furchungsteilungen von *Aplysia californica*.** Bis auf den lebenden Keim in (A) wurden alle gezeigten Embryonen in Zenker-Lösung fixiert und mit dem DNA-spezifischen Fluoreszenzfarbstoff Hoechst 33258 gefärbt. Von einigen Keimen sind sowohl DIK-Aufnahmen (B, D, E, F), als auch Fluoreszenzaufnahmen (b, d, e, f) abgebildet. Pfeilspitzen deuten auf sich rekonstituierende Kerne. Gestrichelte Pfeile deuten auf die Position bereits aufgelöster Kerne, durchgehende Pfeile auf noch intakte Kernhüllen. Doppelpfeile verbinden Geschwisterblastomeren. Die Polkörperchen (Sternchen) markieren jeweils den animalen Pol. Die eingezeichneten Balken repräsentieren jeweils 10µm. Weitere Erläuterungen im Text.

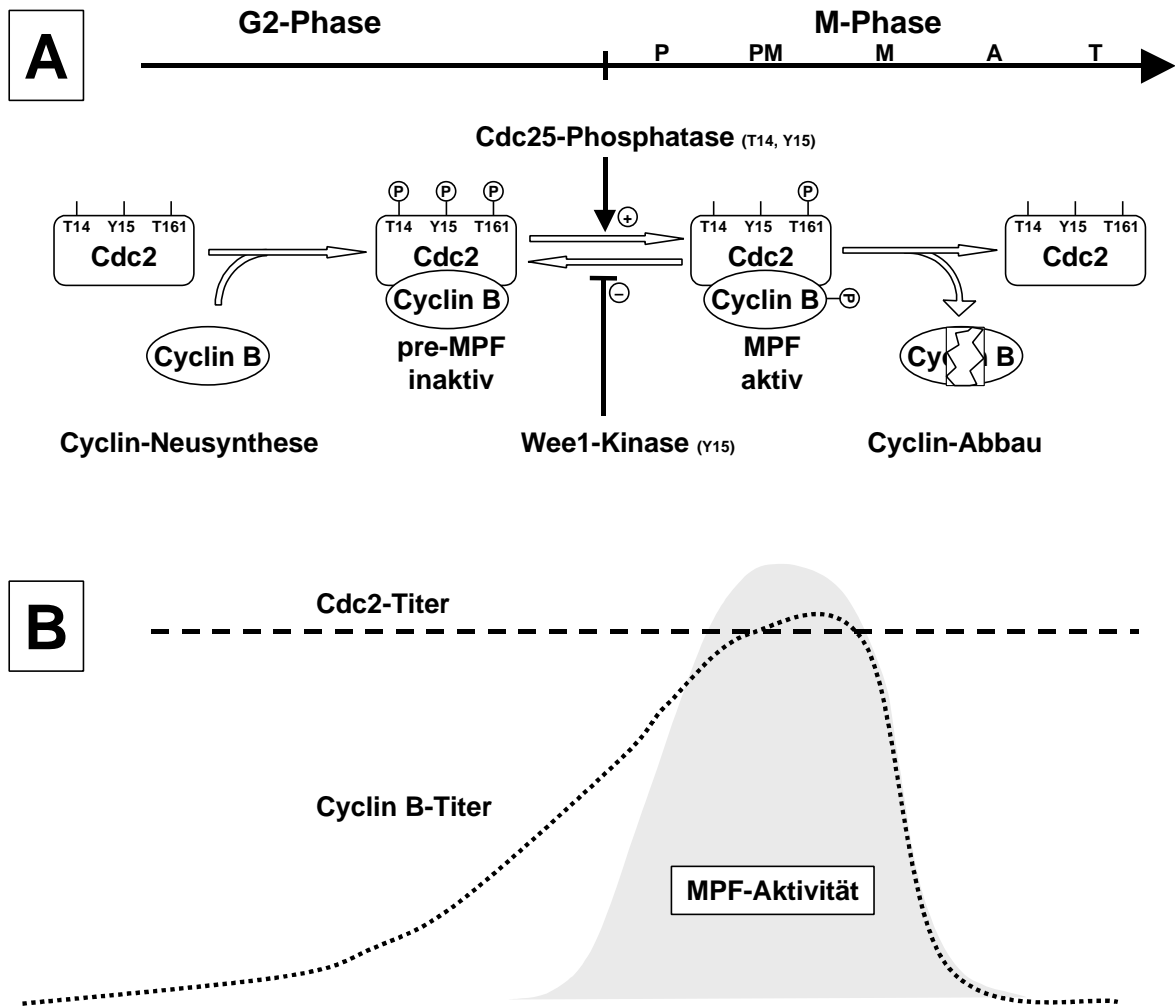




### 3.2 Molekulare Komponenten des G2/M-Kontrollpunktes in Embryonen von *Platynereis dumerilii* und *Nereis virens*

In den Embryonen der nahe verwandten Nereiden *Platynereis dumerilii* und *Nereis virens* unterscheiden sich die Blastomeren in der Dauer ihrer Zellzyklen, so daß sie sich nicht synchron, sondern in einer für alle Keime identischen, genau festgelegten Reihenfolge teilen. Ein Ziel meiner Untersuchungen war es, die molekularen Mechanismen aufzuklären, die den unterschiedlichen Proliferationsraten der Blastomeren zugrunde liegen. Die Replikation der DNA beginnt unmittelbar nach der Mitose, so daß eine G1-Phase weder während der frühen Furchungsteilungen von *Platynereis dumerilii* (Heimann 1994) noch von *Nereis virens* (Dondua und Fedorova 1982) nachweisbar ist. Die Unterschiede in den Zellzyklusgeschwindigkeiten beruhen also auf unterschiedlich langen S- oder G2-Phasen. Während die Dauer der Zellzyklen somatischer Zellen sowohl über den G1/S-, als auch den G2/M-Phasenübergang reguliert wird (Hutchison und Glover 1995, Jacobs 1992), spielt der G1/S-Phasenübergang für die Regulation der embryonalen Zellzyklen offenbar nur eine untergeordnete Rolle. Deshalb habe ich mich darauf konzentriert, die am G2/M-Kontrollpunkt beteiligten Proteine (Abbildung 7) in Embryonen von *Platynereis dumerilii* bzw. *Nereis virens* nachzuweisen. Auf der Basis dieser Analyse soll dann entschieden werden, ob und welche Möglichkeiten bestehen, den Übergang von der G2- zur M-Phase experimentell zu beeinflussen, um so die Rolle der Zellzyklusregulation bei der Determination der Blastomeren zu untersuchen. Mit Hilfe von Antikörpern gegen zellzyklusregulierende Proteine aus anderen Organismen konnte ich einige der homologen Proteine in *Platynereis*-Embryonen nachweisen (3.2.1). Ein *in vitro*-Test ermöglichte mir die Messung der Histon H1-Kinaseaktivität (3.2.2) während der ersten Furchungsteilungen von *Nereis virens*. Die Histon H1-Kinaseaktivität entspricht der Summe der Aktivitäten des Cdc2/Cyclin B-Komplexes, des eigentlichen MPF (*m-phase promoting factor*), und des ebenfalls am Ende der G2-Phase aktiven Cdc2/Cyclin A-Komplexes. Mit Hilfe des Cdc2-spezifischen Inhibitors Olomoucine konnte ich die Wirkung der beiden Cdc2/Cyclin-Kinasen indirekt auch in *Platynereis*-Embryonen nachweisen (3.2.3).





**Abbildung 7: Modell zur Regulation des mitotischen G2/M-Phasenübergangs bei höheren Eukaryonten.** Zentraler Regulator des G2-M-Phasenübergangs ist der MPF (*m-phase promoting factor*), ein Proteinkomplex aus den Proteinen Cdc2 und Cyclin B (A). Während Cdc2 während des gesamten Zellzyklus in konstanten Mengen vorhanden ist (B), muß Cyclin B während jeder Interphase neu synthetisiert werden (A, B). Unmittelbar nach der Bildung des MPF-Komplexes wird die Cdc2-Untereinheit an einer Kombination aktivierender (T161: Threonin 161) und deaktivierender Aminosäuren (T14: Threonin 14, T15: Tyrosin 15) phosphoryliert (A). Der Eintritt in die M-Phase wird eingeleitet, wenn die Cdc25-Phosphatase die inhibierenden Phosphatreste von den Aminosäuren T14 und Y15 entfernt und den MPF so aktiviert (A, B). Gegenspieler von Cdc25 ist die Wee1-Kinase, welche Cdc2 an Y15 phosphoryliert. Nach dem Eintritt in die M-Phase wird der MPF durch den raschen Abbau des Cyclin B wieder deaktiviert.

### 3.2.1 Nachweis eines mitotischen Cyclins und zweier Cdc2-Isoformen in Furchungsstadien von *Platynereis dumerilii*

Während eines Aufenthaltes im Labor von Dr. Takeo Kishimoto am Tokyo Institute of Technology hatte ich die Gelegenheit, eine Reihe von Antikörpern, die spezifisch zellzyklusregulierende Proteine von Amphibien bzw. Seesternen erkennen (Tabelle 17), auf ihre Kreuzreaktivität mit *Platynereis*-Proteinen zu untersuchen. Zum einen wollte ich mit Hilfe dieser Antikörper mehr über die Regulation der Zellzyklusmaschinerie auf der Ebene der Proteine lernen. Vor allem aber hoffte ich, die Antikörper in individuelle Blastomeren inji-

zieren zu können, um gezielt zellzyklusregulierende Proteine zu inhibieren und die normale Teilungsabfolge zu stören. Mit diesem Versuchsansatz wollen wir eine mögliche Rolle der Teilungsasynchronien bei der Determination analysieren.

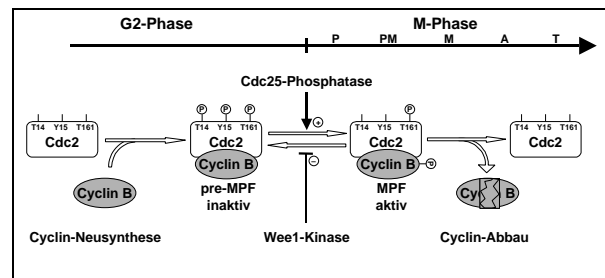
**Tabelle 17: Primäre Antikörper gegen zellzyklusregulierende Proteine und sekundäre Antikörper**

Antikörper	Typ	Kreuzreaktiv <sup>1)</sup>	Erhalten von...	Literatur
Kaninchen- $\alpha$ -Seestern Cyclin B	pAS	?	T. Kishimoto <sup>2)</sup>	Ookata et al. 1992
Maus- $\alpha$ - <i>Bufo japonicus</i> Cyclin B1	mAK	Ja	M. Yamashita <sup>3)</sup>	Sakamoto et al. 1998
Maus- $\alpha$ - <i>Rana japonica</i> Cyclin B2	mAK	Nein	M. Yamashita <sup>3)</sup>	Ihara et al. 1998
Kaninchen $\alpha$ - <i>Xenopus</i> Cyclin B1	pAS	Nein	T. Kishimoto <sup>2)</sup>	Minshull et al. 1990
Kaninchen- $\alpha$ -Seestern Cyclin A	pAS	Nein	T. Kishimoto <sup>2)</sup>	Okano-Uchida et al. 1998
Kaninchen- $\alpha$ -Seestern cdc25	pAS	Nein	T. Kishimoto <sup>2)</sup>	Okumura et al. 1996
Maus- $\alpha$ -PSTAIR	mAK	Ja	T. Kishimoto <sup>2)</sup>	Yamashita et al. 1991
Kaninchen- $\alpha$ -Maus Ig-Alkalische-Phosphatase konjugiert			D0306, DAKO <sup>4)</sup>	
Schwein- $\alpha$ -Kaninchen Ig-Alkalische-Phosphatase konjugiert			D0314, DAKO <sup>4)</sup>	

<sup>1)</sup> Alle Antikörper erkennen auch *Platynereis*-Proteine. Hier ist jedoch die spezifische Kreuzreaktivität mit zellzyklusregulierenden Proteinen gemeint; <sup>2)</sup> Dr. Takeo Kishimoto: Laboratory of Cell & Developmental Biology, Faculty of Bioscience, Tokyo, Institute of Technology, Yokohama-shi 227, Japan; <sup>3)</sup> Dr. Masakane Yamashita: Zoological Institute, Faculty of Science Sapporo 060, Japan; <sup>4)</sup> DAKO, Glostrup, Dänemark. mAK: monoklonaler Antikörper; pAS: polyklonales Antiserum

## Cyclin-Antikörper

Zur Überprüfung der Kreuzreaktivität der Antikörper habe ich Embryonen von *Platynereis* in regelmäßigen Zeitintervallen in flüssigem Stickstoff fixiert und homogenisiert. Die Homogenate wurden



anschließend gelelektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Nitrozellulosemembran übertragen und mit den unterschiedlichen Antikörpern gefärbt. Alle von mir getesteten Cyclin-Antikörper erkennen und markieren in den Extrakten von *Platynereis*-Embryonen wenigstens ein oder sogar mehrere Proteine (Abbildung 8A).

Als Kriterium, ob es sich bei den markierten *Platynereis*-Proteinen um Cycline handelt, wurden zunächst die Molekulargewichte herangezogen. Alle bisher in der Literatur beschriebenen mitotischen Cycline aus anderen Organismen weisen im Polyacrylamidgel ein Molekulargewicht von 47 bis 65kDa auf (Tabelle 21 Seite 127). Viele der im SDS-Polyacrylamidgel von den Cyclin-Antikörpern markierten *Platynereis*-Proteine liegen

außerhalb dieses Molekulargewichtsbereichs (gestrichelte Linien in Abbildung 8A) und sind deshalb vermutlich keine Cycline.

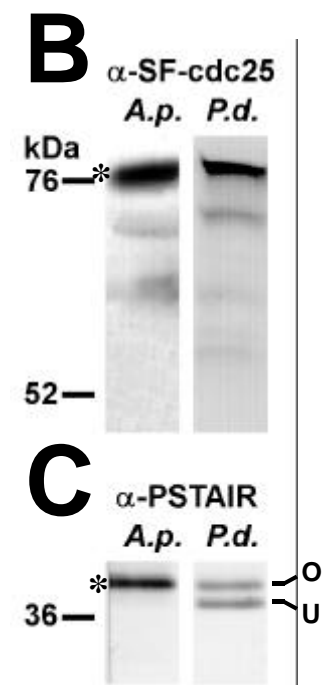
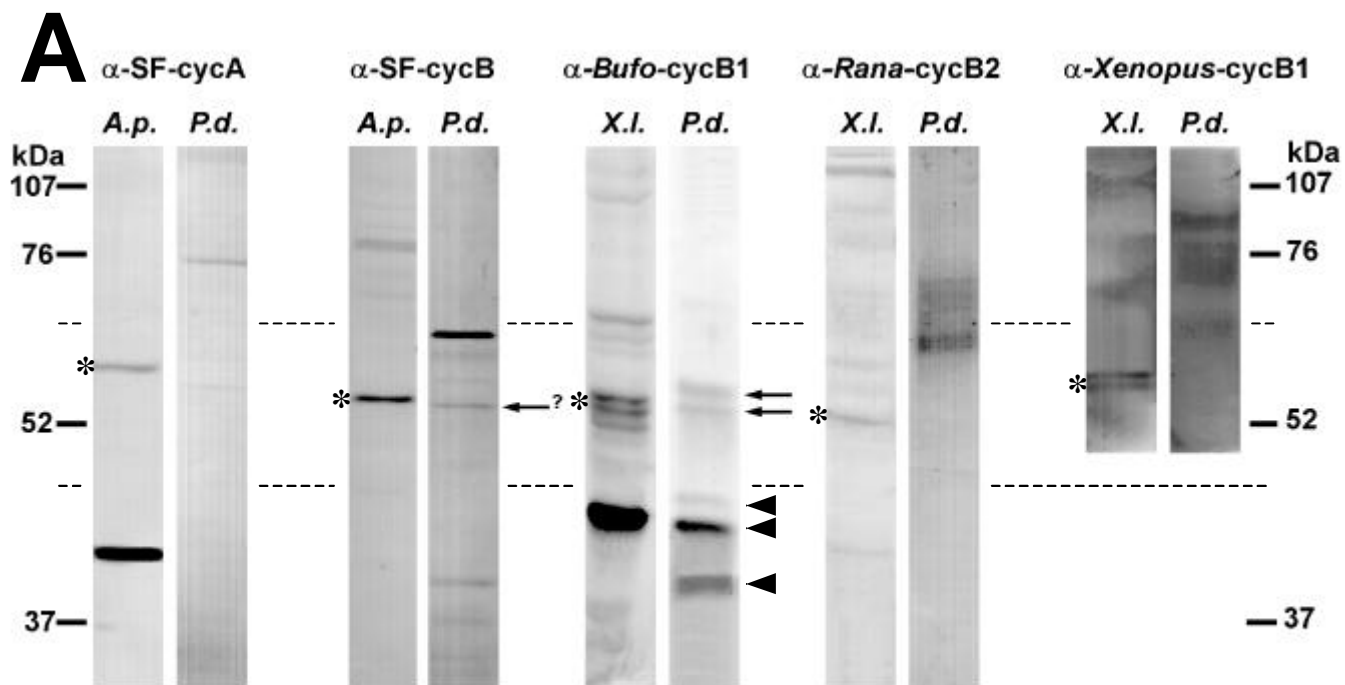
Als zweites wichtigeres Kriterium habe ich geprüft, ob die markierten Proteine eine für mitotische Cycline typische zellzyklusabhängige Dynamik aufweisen, d.h. ob die Proteine im Verlaufe eines Zellzyklus akkumulieren und während der M-Phase abrupt abgebaut werden. Die meisten der markierten *Platynereis*-Proteine waren zu jedem Zeitpunkt eines Zellzyklus in gleichbleibender Menge nachweisbar, wie beispielsweise die vom a-*Rana japonica*-Cyclin B2-Antikörper markierten Proteine (Abbildung 9A). Auch bei diesen Proteinen handelt es sich deshalb aller Wahrscheinlichkeit nach nicht um *Platynereis*-Cycline, sondern um unspezifisch markierte Proteine.

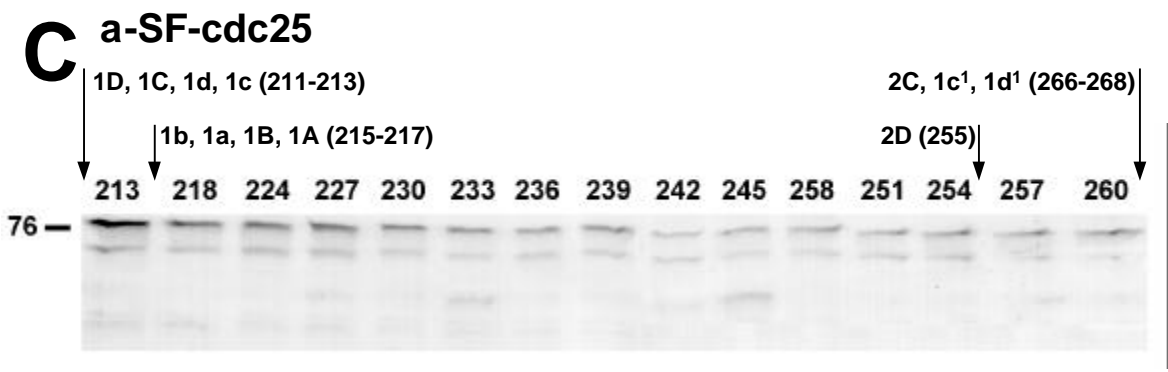
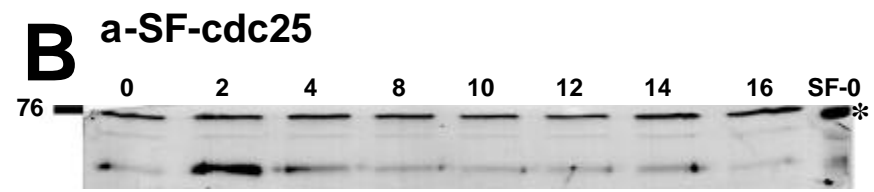
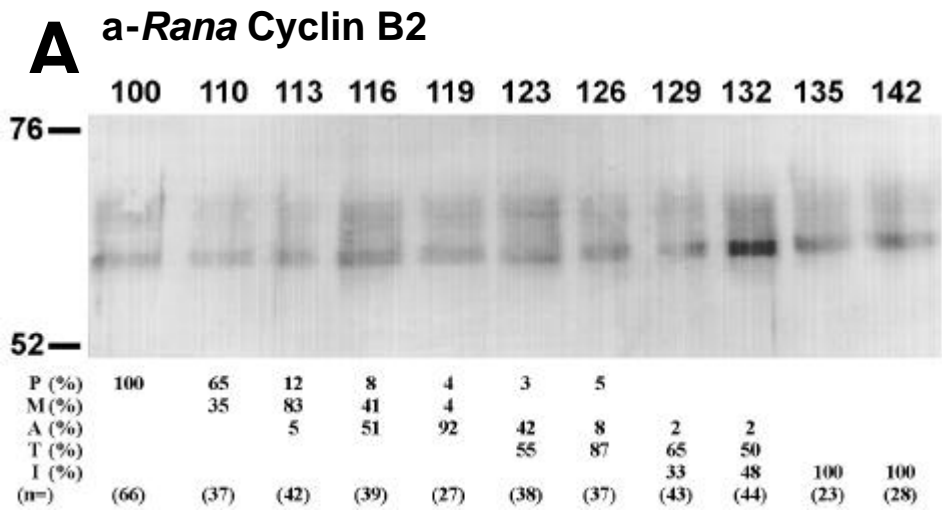
*folgende Seite:*

**Abbildung 8: Kreuzreaktivität von Antikörpern gegen zellzyklusregulierende Proteine anderer Organismen mit Proteinen aus Keimen von *Platynereis dumerilii*.** Gesamthomogenate von *Platynereis*-Keimen wurden elektrophoretisch aufgetrennt, geblottet und mit Antikörpern gegen Cycline (A), Cdc25 (B) bzw. das in Cdc2 hochkonservierte PSTAIR-Aminosäuremotiv (C) gefärbt. Die Antikörperbezeichnungen stehen jeweils über den Blots. Die Molekulargewichte sind am Rand in kDa angegeben. A-C: Gegenüberstellung von *Platynereis*-Homogenaten (*P.d.*) und für den jeweiligen Antikörper spezifischen Kontrollhomogenaten des Seesterns *Asterina pectinifera* (*A.p.*), oder von *Xenopus laevis* (*X.l.*). Für die *Bufo*- und *Rana*-Antikörper wurden ebenfalls *Xenopus*-Extrakte als suboptimale Kontrolle verwendet. Die Sternchen markieren in den Kontrollblots das jeweils spezifisch markierte Zielprotein. A: Die gestrichelten Linien grenzen den Molekulargewichtsbereich zwischen 47 und 65kDa ein, innerhalb dessen alle bisher beschriebenen mitotischen Cycline liegen (Tabelle 21, Seite 127). Der Doppelpfeil bezeichnet das vom a-*Bufo* Cyclin B1-Antikörper erkannte *Platynereis*-Cyclin. Die Pfeilspitzen deuten auf Proteine, die vom a-*Bufo* Cyclin B1-Antikörper unspezifisch erkannt werden. Der Einzelpfeil bezeichnet ein vom a-Seestern Cyclin B-Antikörper erkanntes Protein mit einem dem *Platynereis*-Cyclin Entsprechenden Molekulargewicht (weitere Erklärung im Text). C: Mit „O“ (oben) und „U“ (unten) sind die zwei Isoformen des *Platynereis*-Cdc2-Proteins gekennzeichnet. *SF*: Seestern (*starfish*)

*übernächste Seite:*

**Abbildung 9: a-*Rana japonicus*-Cyclin B2- und a-Seestern-Cdc25-Antikörper erkennen verschiedene *Platynereis*-Proteine ohne zellzyklusabhängige Dynamik.** Gesamthomogenate von *Platynereis*-Keimen wurden elektrophoretisch aufgetrennt, geblottet und mit Antikörpern gegen *Rana japonica*-Cyclin B2 (A) oder Seestern-Cdc25 (B, C) gefärbt. Die Molekulargewichte sind am Rand in kDa angegeben. Die Entwicklungszeitpunkte stehen über den einzelnen Spuren in „Minuten nach Besamung“. A: Der a-*Rana* Cyclin B2-Antikörper erkennt kein *Platynereis*-Cyclin, da die gefärbten Proteine während des gesamten ersten Zellzyklus in nahezu gleichbleibender Konzentration nachweisbar sind. Zu jedem Entwicklungszeitpunkt wurden einige Keime mit dem DNA-spezifischen Fluoreszenzfarbstoff Hoechst 33258 gefärbt. Unter dem Fluoreszenzmikroskop wurde der Prozentsatz der Keime in der Pro- (P), Meta- (M), Ana- (A), Telo- (T) bzw. in der Interphase (I) ausgezählt und unterhalb jeder Spur notiert. Die Gesamtzahl (n) der ausgezählten Keime ist jeweils in Klammern angegeben. B, C: Der a-Seestern-Cdc25-Antikörper erkennt in *Platynereis*-Extrakten mehrere Proteine, die jedoch weder während der Meiose kurz nach Besamung (B) noch während der vierten mitotischen Furchungsteilung (C) den für Cdc25 typischen und sehr ausgeprägten *mobility shift* zeigen. Auch der Titer der markierten Proteine ist stets konstant. In B wurde auf der rechten Spur als Kontrolle ein Cdc25-positives Seestern-Homogenat aufgetragen. In C markieren die Pfeile die Zeitpunkte, zu denen sich die Kerne von lebenden Kontrollkeimen unter dem Mikroskop auflösten. Die jeweiligen Blastomeren und die konkreten Zeitpunkte sind angegeben.



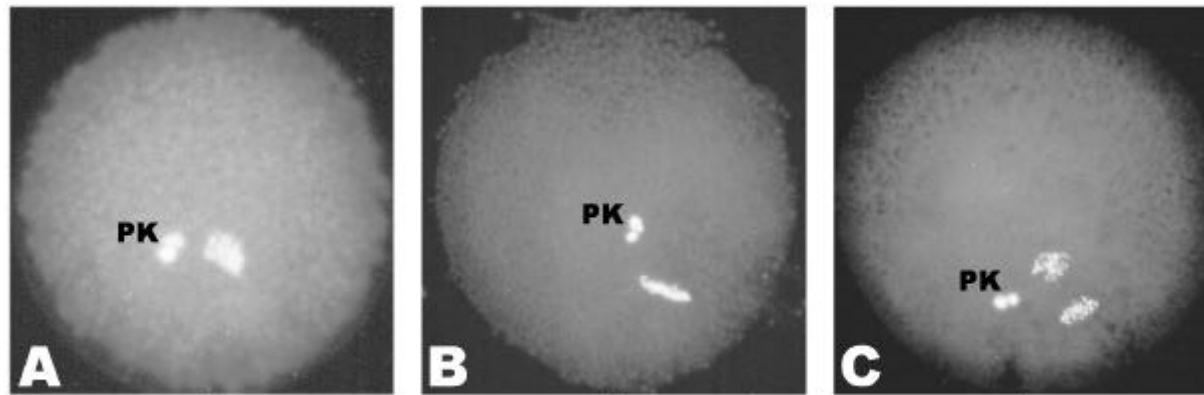


Der monoklonale Antikörper gegen *Bufo japonicus*-Cyclin B1 erkennt jedoch in Extrakten von *Platynereis*-Embryonen ein 52kDa schweres Protein (Abbildung 8A, Doppelpfeil) das eine für mitotische Cycline typische zellzyklusabhängige Dynamik aufweist (Abbildung 10, Doppelpfeil). Dieses Protein ist 97min nach Besamung, also kurz vor der ersten Furchungsteilung, zunächst noch schwach markiert, akkumuliert dann aber kontinuierlich bis etwa 110 Minuten nach Besamung, um schließlich innerhalb von nur vier Minuten vollständig zu verschwinden. Erst 130 Minuten nach Besamung läßt sich die Doppelbande wieder in den embryonalen Extrakten nachweisen, bis das Protein etwa 150 Minuten nach Besamung bei der folgenden Teilung erneut abgebaut wird (Abbildung 10D). Der *a-Bufo japonicus*-Antikörper markiert neben diesem *Platynereis*-Cyclin noch drei weitere Proteine mit höherer elektrophoretischer Mobilität (Abbildung 8, Pfeilspitzen), welche stets mit gleicher Intensität nachweisbar sind (Abbildung 10D, Pfeilspitzen). Da ich auf alle Spuren gleiche Proteinmengen aufgetragen habe, sind die beobachteten Intensitätsschwankungen der Cyclin-Doppelbande auf tatsächliche Schwankungen des Cyclin-Titers in den Blastomeren zurückzuführen.

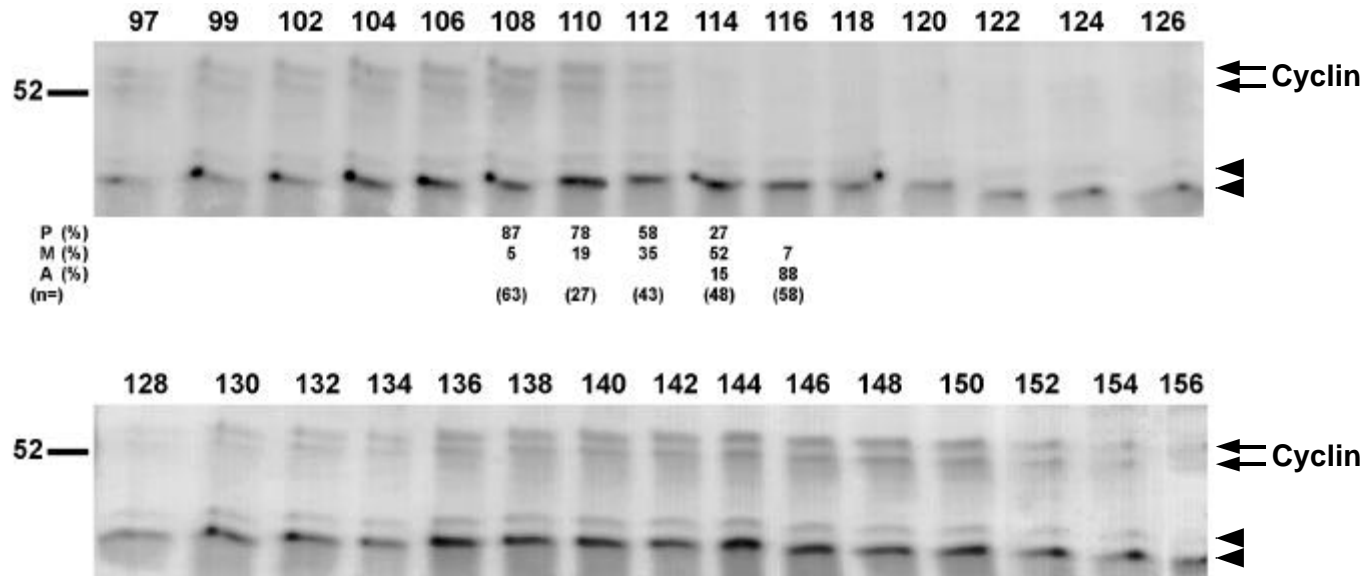
Der abrupte Abbau des *Platynereis*-Cyclins fällt mit dem Übergang von der Metaphase zur Anaphase zusammen. Das ergab die Analyse von *Platynereis*-Keimen, welche gleichzeitig mit den für das SDS-Gel bestimmten Proben fixiert und mit dem DNA-spezifischen Fluoreszenzfarbstoff Hoechst 33258 gefärbt wurden. 108 Minuten nach der Besamung sind noch 87% der Keime im Stadium der Prophase (Abbildung 10A und D). Die Cyclin-Bande ist 110 Minuten nach Besamung am intensivsten. Zu diesem Zeitpunkt befinden sich 78% der Keime noch in der Prophase und erst 19% in der Metaphase.

*folgende Seite:*

**Abbildung 10: Ein *Platynereis*-Cyclin akkumuliert während der Interphase und wird mit Beginn der Anaphase rasch abgebaut.** Keime von *Platynereis dumerilii* wurden in regelmäßigen Zeitabständen während der ersten Furchungsteilung entweder mit dem DNA-spezifischen Fluoreszenzfarbstoff Hoechst 33258 gefärbt (**A-C**) oder homogenisiert, gelelektrophoretisch aufgetrennt, geblottet und mit dem Antikörper gegen *Bufo japonicus*-Cyclin B1 markiert (**D**). **A-C:** Fluoreszenzaufnahmen repräsentativer Keime zu verschiedenen Entwicklungszeitpunkten. **D:** Der Immunoblot mit dem *a-Bufo* Cyclin B1-Antikörper zeigt, daß das *Platynereis*-Cyclin (Doppelpfeil) periodisch akkumuliert und wieder abgebaut wird. Vom selben Antikörper unspezifisch markierte Proteine (Pfeilspitzen) sind hingegen stets in gleicher Konzentration vorhanden. Die Hoechst-gefärbten Keime wurden unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgezählt und die Prozentsätze der Keime in der Prophase (P), Metaphase (M) bzw. Anaphase (A) bestimmt und unterhalb jeder Spur notiert. Die Gesamtzahl (n) der ausgezählten Keime ist jeweils in Klammern angegeben. Ein Molekulargewichtsmarker ist am linken Rand in kDa angegeben. Oberhalb der einzelnen Spuren sind die Entwicklungszeiten der jeweiligen Proben in Minuten nach Besamung notiert.



**D** *a-Bufo* Cyclin B1

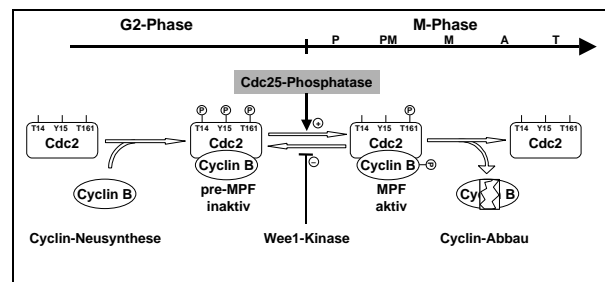


Zwei Minuten später befinden sich bereits 35% der Keime in der Metaphase, aber noch immer kein einziger Keim in der Anaphase. Die Cyclin-Bande ist zwar schon schwächer, aber noch deutlich nachweisbar. 114 Minuten nach Besamung ist die Mitose in 52% der Keime bis zur Metaphase fortgeschritten (Abbildung 10B und D) und die ersten 15% der Embryonen sind bereits in der Anaphase (Abbildung 10C und D). Mit dem Erreichen der Anaphase ist die Cyclin-Bande gänzlich verschwunden. Die Kinetik des *Platynereis*-Cyclins entspricht damit, wie in der Diskussion noch ausführlich erklärt werden soll, der Kinetik eines Cyclin B-Proteins.

Das polyklonale Antiserum gegen Seestern-Cyclin B erkennt ebenfalls eine Bande von etwa 52kDa (Abbildung 8A, Pfeil). Diese Bande wird nur sehr schwach markiert, so daß sie auch in Interphase-Keimen meist gar nicht nachweisbar ist. Deshalb ist es fraglich, ob es sich bei diesem Protein auch um das *Platynereis*-Cyclin handelt. Die Affinität dieses Antikörpers zu dem fraglichen Protein ist auf jeden Fall für eine quantifizierende Analyse zu gering.

### Cdc25-Antikörper

Ein polyklonales Antiserum gegen Seestern-Cdc25 erkennt in *Platynereis*-Extrakten vier Proteine im Bereich von 55 bis 76kDa (Abbildung 8B). Das Molekulargewicht ist in diesem Fall kein



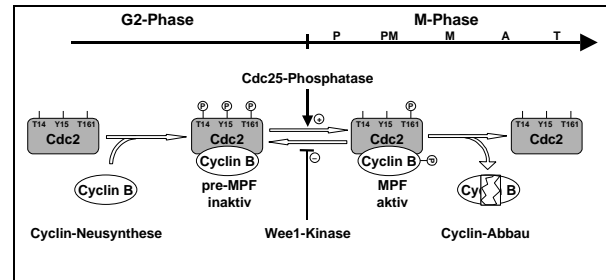
geeignetes Kriterium, um einzugrenzen, welche der markierten Proteine eventuell mit dem *Platynereis* Cdc25-Protein identisch sind. Die Molekulargewichte bereits bekannter Cdc25-Proteine sind sehr heterogen und reichen von 29kDa für das *Patella* stringlike-Protein (van der Kooij *et al.* 1996) bis 90kDa für Seestern Cdc25 (Okumura *et al.* 1996). Auch wenn die Funktion der M-Phase induzierenden Cdc25-Phosphatase als Aktivator der Cdc2/Cyclin B-Kinase bei allen Organismen gleich ist, wird die Aktivität des Cdc25-Proteins nach unterschiedlichen Mechanismen reguliert. Zum einen wird die Aktivität des Cdc25-Proteins über Phosphorylierung und Dephosphorylierung reguliert, was zu einer zellzyklusabhängig variierenden elektrophoretischen Mobilität des Proteins im SDS-Polyacrylamidgel führt. Zum anderen akkumuliert das Cdc25-Protein aber auch während der Interphase und wird zu Beginn der M-Phase rasch abgebaut (für Literatur zur Cdc25-Regulation siehe Diskussion). Weder der Titer der vom Cdc25-Antikörper in *Platynereis*-Extrakten erkannten Proteine noch deren elektrophoretische Mobilität verändern sich



jedoch, weder im Laufe der Meiose kurz nach der Besamung (Abbildung 9B) noch im Laufe der mitotischen Zellzyklen (Abbildung 9C). Es ist deshalb unwahrscheinlich, daß es sich bei einem dieser Proteine um das *Platynereis*-Homolog der M-Phase induzierenden Cdc25-Phosphatase handelt.

### PSTAIR- (Cdc2-) Antikörper

Der  $\alpha$ -PSTAIR-Antikörper ist gegen ein in allen Cdc2-Proteinen hoch konserviertes Aminosäuremotiv gerichtet (EGVPSTAIR EISLLKE, Yamashita *et al.* 1991). Neben Cdc2 (=Cdk1, *cyclin dependent kinase*)



enthalten aber auch andere Cdk-Proteine das PSTAIR- oder ein ähnliches Aminosäuremotiv. Deshalb kann nicht ohne weiteres ausgeschlossen werden, daß der Antikörper mit mehreren *Platynereis*-Cdk's kreuzreagiert. Ich habe aus diesem Grunde die Cdc2-Proteinkinase aus Extrakten von *Platynereis*-Embryonen mit Hilfe von  $p13^{suc1}$ -Sephrose affinitätschromatographisch vorgereinigt (2.3.4), um andere eventuell von dem Antikörper erkannten Cdk-Proteine weitgehend zu eliminieren. Der  $\alpha$ -PSTAIR-Antikörper erkennt sowohl in Gesamthomogenaten von *Platynereis*-Keimen (Abbildung 8C), als auch in  $p13^{suc1}$ -vorgereinigten Extrakten (Abbildung 11A, Spuren 20-50) maximal 2 Banden, eine obere (O) und eine untere (U), mit einem Molekulargewicht von etwa 37-38kDa. Beide PSTAIR-Banden repräsentieren deshalb sehr wahrscheinlich unterschiedliche Isoformen des *Platynereis*-Cdc2-Protein. Es kann allerdings nicht vollkommen ausgeschlossen werden, daß sich hinter den PSTAIR-Banden zum Teil auch das Cdk2-Protein verbirgt, welches in manchen Organismen ebenfalls mit  $p13^{suc1}$ -Sephrose aus Gesamthomogenaten isoliert werden kann. Allerdings kommt Cdk2 in allen bisher quantitativ untersuchten embryonalen Systemen in sehr viel geringerer Konzentration vor als Cdc2 (siehe Diskussion).

Unbesamte *Platynereis*-Oocyten enthalten nur die obere PSTAIR-Bande (Abbildung 11B, Spur 0). Auch nach der Besamung ist diese PSTAIR-Bande in *Platynereis*-Extrakten durchgehend bis zur Bildung des ersten Polkörperchens nachweisbar (Abbildung 11A). Die untere PSTAIR-Bande hingegen läßt sich erstmals 18-20 Minuten nach Besamung in den *Platynereis*-Extrakten nachweisen (Abbildung 11A, B). Zu diesem Zeitpunkt löst sich das Keimbläschen auf, d.h. die Oocyten treten in die M-Phase der ersten Meiose ein. 55 Minuten nach Besamung, also gegen Ende der ersten meiotischen M-Phase und kurz vor der Bildung des ersten Polkörpers, verschwindet die untere PSTAIR-Bande wieder

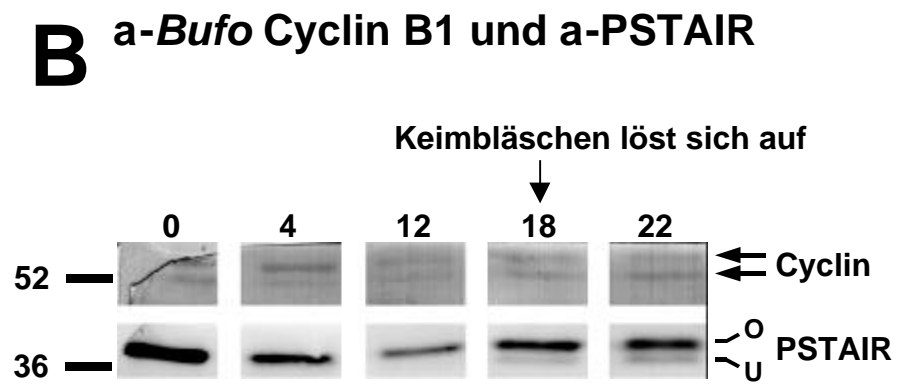
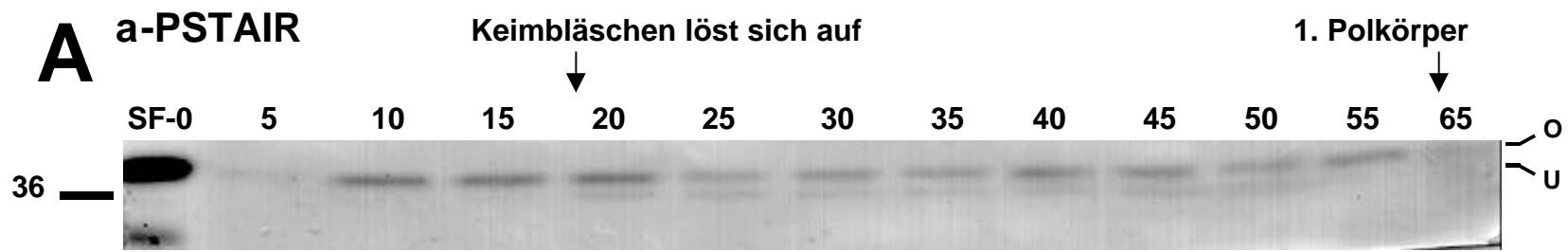
(Abbildung 11A). Sehr wahrscheinlich handelt es sich bei der unteren, M-Phase-spezifischen PSTAIR-Bande um die aktive Isoform des *Platynereis*-Cdc2 Proteins, wohingegen die obere PSTAIR-Bande eine inaktive Cdc2-Isoform repräsentiert (siehe auch Diskussion).

### **Verwendbarkeit der getesteten Antikörper**

Der monoklonale  $\alpha$ -*Bufo japonicus*-Cyclin B1-Antikörper, sowie der  $\alpha$ -PSTAIR-Antikörper sind geeignet, um die Veränderungen im Cyclin B-Titer bzw. im Aktivitätsstatus von Cdc2 in Gesamthomogenaten von *Platynereis*-Keimen zu analysieren. Interessanter wäre es aber über eine *in situ*-Analyse Unterschiede in den Proteintitern zwischen den Blastomeren aufzuzeigen bzw. durch Injektion der Antikörper in einzelne Blastomeren die Zellzyklusgeschwindigkeit *in vivo* zu verändern. Solche Experimente lassen sich aber mit diesen Antikörpern leider nicht durchführen, da sie neben dem jeweiligen Zielprotein auch noch andere Proteine erkennen, so daß unspezifische Effekte die Ergebnisse verfälschen könnten. Deshalb haben wir eine alternative Strategie eingeschlagen und damit begonnen *Platynereis*-eigene Gene zellzyklusregulierender Proteine zu klonieren, um so an spezifische molekulare Werkzeuge zu gelangen, mit denen sich die genannten Versuche durchführen lassen (3.3).

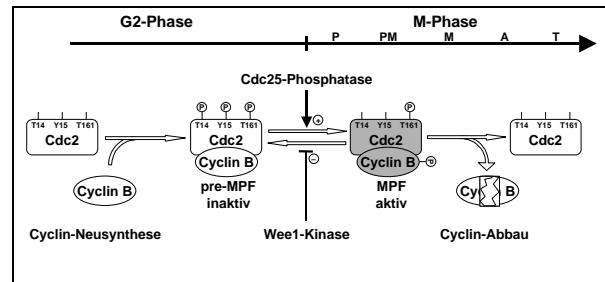
*folgende Seite:*

**Abbildung 11: Der  $\alpha$ -PSTAIR-Antikörper erkennt in *Platynereis*-Homogenaten zwei Isoformen von Cdc2, die zellzyklusabhängig reguliert werden.** Aus Gesamthomogenaten von *Platynereis*-Embryonen wurden mit p13<sup>suc1</sup>-Sephrose das Cdc2-Protein und die assoziierten Cycline affinitätschromatographisch vorgereinigt, gelelektrophoretisch aufgetrennt, geblottet und schließlich mit dem  $\alpha$ -PSTAIR-Antikörper (**A**, untere Spur in **B**) bzw. dem *Bufo japonicus*-Cyclin B1-Antikörper (obere Spur in **B**) nachgewiesen. Die Molekulargewichte sind jeweils am Rand in kDa angegeben. Die Entwicklungszeitpunkte stehen jeweils über den einzelnen Spuren in „Minuten nach Besamung“. Der  $\alpha$ -PSTAIR-Antikörper erkennt in *Platynereis* zwei Isoformen des Cdc2-Proteins. In unbesamten Oocyten (**B**, ganz linke Spur) liegt nur die Isoform mit der geringeren elektrophoretischen Mobilität (O) vor. Die andere Isoform (U) erscheint erst 18 (**B**) bis 20 (**A**) Minuten nach Besamung, wenn sich das Keimbläschen auflöst und verschwindet 55 Minuten nach Besamung kurz vor der Abschnürung des ersten Polkörpers wieder (**A**). Die U-Isoform ist also nur während der M-Phase der ersten meiotischen Teilung nachweisbar. *Platynereis*-Cyclin ist sowohl in unbesamten Oocyten, als auch kurz nach Besamung bis über die Auflösung des Keimbläschens hinaus in konstanter Menge vorhanden (**B**).



### 3.2.2 Die Histon H1-Kinaseaktivität der Cdc2/Cyclin-Kinasen im Keim von *Nereis virens* wird zellzyklusabhängig moduliert

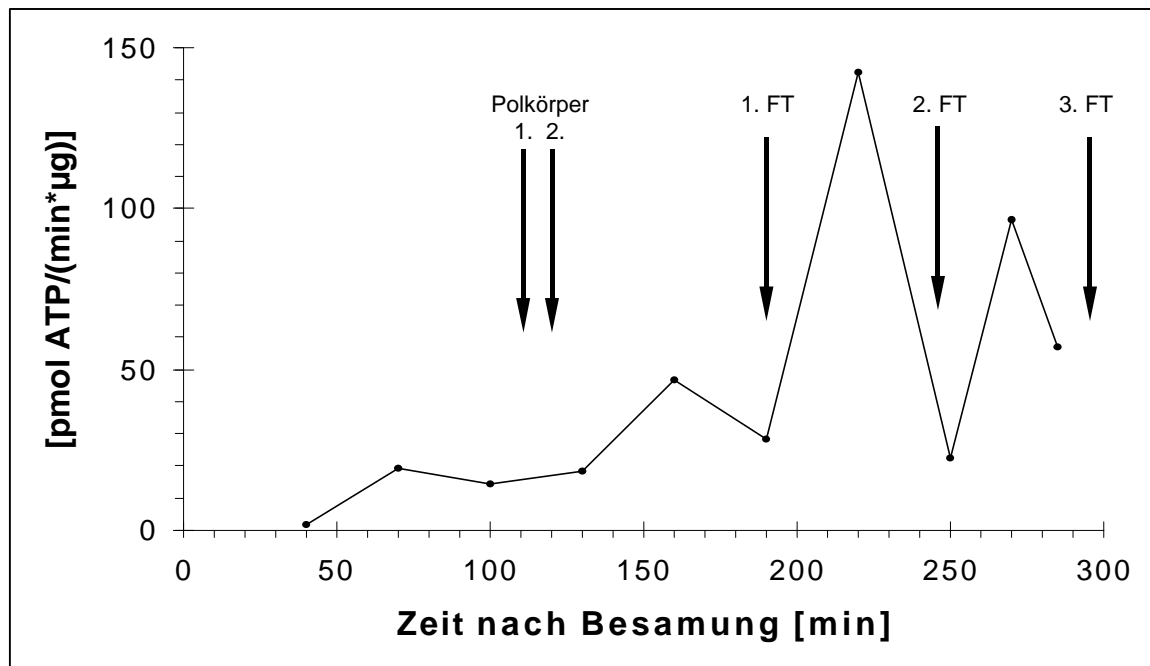
Der aktive Komplex aus Cdc2 und Cyclin B ist identisch mit dem MPF (*m-phase promoting factor*; siehe Fußnote 3, Seite 16). Neben der Cdc2/Cyclin B-Kinase ist beim Übergang von der G2- zur



M-Phase aber auch die Cdc2/Cyclin A-Kinase beteiligt. Beide Cdc2/Cyclin-Kinasen phosphorylieren zumindest *in vitro* Histon H1. Die Übertragung von radioaktiv markierten  $\gamma$ -Phosphatresten aus ATP auf Histon H1 kann deshalb in einem einfachen *in vitro* Test zur Bestimmung der Aktivitäten der Cdc2/Cyclin-Kinasen (Siehe Fußnote 3, Seite 16) herangezogen werden (Arion *et al.* 1988). Während eines Forschungsaufenthaltes im Labor von Dr. Laurent Meijer in Roscoff (Frankreich) konnte ich in Embryonen von *Nereis virens* die zyklische Aktivität der Cdc2/Cyclin-Kinasen während der ersten Furchungsteilungen untersuchen. Da mit meinem methodischen Ansatz beide Cdc2/Cyclin-Komplexe immer zusammen isoliert wurden, ist im folgenden unter der „Cdc2-assoziierten Histon H1-Kinaseaktivität“ die Summe der Aktivitäten von Cdc2/Cyclin A und Cdc2/Cyclin B (MPF) zu verstehen. Ob in den Furchungszellen von *Nereis virens* tatsächlich beide Cdc2/Cyclin-Kinasen vorhanden und auch aktiv sind ist allerdings bislang unbekannt.

In regelmäßigen Zeitabständen wurden während der ersten drei Furchungsteilungen Keime von *Nereis virens* in flüssigem Stickstoff fixiert und anschließend homogenisiert. Mit Hilfe von p9<sup>CKShs1</sup>-Sepharose<sup>6</sup> wurde aus den Homogenaten das Cdc2-Protein zusammen mit den assoziierten Cyclinen isoliert und die Histon H1-Kinaseaktivität dieser Komplexe bestimmt.

<sup>6</sup> p9<sup>CKShs1</sup> ist das humane Homologon des Hefeproteins p13<sup>suc1</sup>, vgl. vorheriger Abschnitt, siehe auch Material und Methode



**Abbildung 12: Die Histon H1-Kinaseaktivität während der ersten drei Furchungsteilungen von *Nereis virens*.** Die Histon H1-Kinaseaktivität (Y-Achse) wurde über den Einbau des radioaktiv markierten  $\gamma$ -Phosphatrestes aus ATP auf Histon H1 bestimmt und ist als Umsatz von ATP je Minute und  $\mu\text{g}$  Histon H1 angegeben. Die Pfeile markieren jeweils die an lebenden Kontrollkeimen unter dem Mikroskop beobachteten Zeitpunkte der Bildung der Polkörper und der ersten drei Furchungsteilungen (FT).

Die Histon H1-Kinaseaktivität der Cdc2/Cyclin-Kinasen ist in der Zygote zunächst nicht nachweisbar und läßt sich erst zwischen 40 und 70min nach Besamung detektieren (Abbildung 12). Das deckt sich mit dem Befund am Keim von *Platynereis*, bei dem die vermutlich aktive Cdc2-Isoform erst 18-20 Minuten nach der Besamung nachzuweisen ist (3.2.1, Abbildung 11, Bande „U“). Während der meiotischen Meßpunkte (100 und 130min) ist die Histon H1-Kinaseaktivität in *Nereis virens* auf niedrigem Niveau nachweisbar. Jedoch ist der zeitliche Abstand der Meßpunkte zu groß, um eventuelle Schwankungen während der ersten und zweiten meiotischen Teilung darzustellen. Im Verlauf der mitotischen Zellzyklen von *Nereis virens*-Keimen erreicht die Histon H1-Kinaseaktivität der Cdc2/Cyclin-Komplexe etwa 20min vor jeder Furchungsteilung, also etwa zu Beginn der M-Phase (siehe Diskussion), ein Maximum und sinkt dann steil ab, so daß sie bereits wieder während der Furchung (Telophase) und während der folgenden Interphase sehr niedrig ist.

Dieser Aktivitätsverlauf deckt sich mit demjenigen von Seestern-Keimen (Okano-Uchida 1998) und korreliert darüber hinaus mit dem periodischen Auf- und Abbau von Cyclin

während der Furchungsteilungen von *Platynereis* (3.2.1, Abbildung 9A-D). Der periodische Verlauf der Aktivitäten der Cdc2/Cyclin-Kinasen von *Nereis virens* und die gute Übereinstimmung dieses Aktivitätsverlaufs mit der zellzyklusabhängigen Regulation von Cdc2 und Cyclin in *Platynereis*-Embryonen legt nahe, daß auch in *Platynereis dumerilii* die Aktivität der Cdc2/Cyclin-Kinasen den Takt für die mitotischen Furchungsteilungen bestimmt.

### 3.2.3 Der Cdc2-spezifische Hemmstoff Olomoucine blockiert reversibel die Furchungsteilungen im *Platynereis*-Embryo

Während meines Aufenthaltes in Roscoff war es nicht möglich, die Histon H1-Kinaseaktivität der Cdc2/Cyclin-Kinasen auch in Embryonen von *Platynereis* direkt zu messen, wie dies für *Nereis virens* gelang (3.2.2). Die Menge an Keimen, die dieser Polychaet mit einem Gelege produziert, reicht nicht aus, um über einen längeren Zeitraum hinweg eine ausreichende Menge von Keimen für den Kinase-Assay zu fixieren. Deshalb habe ich mit Hilfe des Cdc2-spezifischen Inhibitors Olomoucine versucht, die Wirkung der Cdc2/Cyclin-Kinasen bei der Einleitung der Mitose indirekt nachzuweisen.

In einem ersten Versuch wurden unbesamte Eizellen von *Platynereis dumerilii* in natürlichem Seewasser mit 0, 100, 500 und 1000µM Olomoucine inkubiert und nach fünf Minuten besamt. Während sich in den Kontrollkeimen die ooplasmatische Segregation und die Furchungsprozesse normal vollzogen, blieben die behandelten Keime stets ungefurcht. Die Kortikalreaktion lief zwar teilweise ab, aber das Keimbläschen löste sich nicht auf. Die Olomoucine-behandelten Keime verharrten also offenbar weiterhin in der Prophase I, also an der Grenze zwischen G2- und M-Phase. Dieser Befund stimmt gut mit der erwarteten hemmenden Wirkung von Olomoucine auf Cdc2 und der damit verbundenen Inaktivierung der Cdc2/Cyclin-Komplexe überein.

In einem zweiten Versuch wurden *Platynereis*-Embryonen erst unmittelbar nach Abschluß der zweiten Furchungsteilung, also zu Beginn der Interphase des 4-Zellstadiums, in Seewasser mit 0, 50, 100 oder 200µM Olomoucine überführt und solange darin inkubiert, bis die Kontrollkeime das 16-Zellstadium erreicht hatten. Anschließend wurden die Keime mehrfach mit natürlichem Seewasser gewaschen und über mehrere Tage in Olomoucine-freiem Seewasser belassen. Zu verschiedenen Zeitpunkten während und nach der Olomoucine-Inkubation wurden Keime aus allen Ansätzen fixiert und mit dem DNA-spezifischen Fluoreszenzfarbstoff Hoechst 33258 gefärbt. Unter dem Fluoreszenzmikroskop

wurde von jeweils 10 Keimen die Anzahl der Kerne bestimmt, um zu ermitteln, inwieweit Olomoucine auch die mitotischen Furchungszyklen hemmt (Tabelle 18).

**Tabelle 18: Die furchungshemmende Wirkung von Olomoucine auf die Blastomeren von *Platynereis*.** Von 200 bis 320 Minuten nach Besamung (=Inkubationsperiode, grau unterlegt) wurden Keime von *Platynereis* in Seewasser mit 50, 100, oder 200µM Olomoucine, bzw. ohne Olomoucine (K) inkubiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten (oberste Zeile) während und nach der Inkubationsperiode wurden aus jeder Gruppe 10 Keime entnommen und die Anzahl der Kerne je Keim bestimmt (linke Spalte). Für jeden Probenzeitpunkt und für jede Versuchsgruppe wurde notiert, wieviel Keime eine bestimmte Anzahl an Kernen aufwiesen. Anaphasen wurden dabei als zwei Kerne gewertet.

Anzahl der Kerne je Keim	Probenzeitpunkte in Minuten nach Besamung																							
	230 min				260 min				290 min				320 min				380 min				440 min			
	200	100	50	K	200	100	50	K	200	100	50	K	200	100	50	K	200	100	50	K	200	100	50	K
4	10	9	10	10	10	3			4	1							1							
5						4			2				2				1							
6						3	2		1				2	1			1							
7							2		1	1	1		3								1	1		
8		1					6	10	2	8	9	9	3	9	10	3	4	1	1		1			
9-15 <sup>1)</sup>																	5	6			2	4	1	
16										1					7		1	7			6	1		
17-31 <sup>1)</sup>																		2	10		4	9	8	
=32 <sup>1)</sup>																								2

1) Die intermediären Stadien zwischen dem 8- und 16-, dem 16- und 32- bzw. dem 32- und 64-Zellstadium wurden hier nicht weiter aufgeschlüsselt.

Zu Beginn der Inkubationsperiode bestanden nur geringe Asynchronien innerhalb des Geleges. Bis auf ein 8-Zellstadium in der 100µM-Gruppe befanden sich auch 30 Minuten nach Inkubationsbeginn (230 Minuten nach Besamung) noch alle Keime, einschließlich der Kontrollen, im 4-Zellstadium. Am Ende der Inkubationsperiode (320min nach Besamung) hatten alle Kontrollkeime die dritte und sieben von 10 Keimen auch bereits die vierte Furchungsteilung abgeschlossen. Die Olomoucine-behandelten Keime hingegen wiesen maximal 8 Kerne auf. Olomoucine hat also auch bei der geringsten angewendeten Konzentration von 50µM eine deutliche furchungshemmende Wirkung auf die Blastomeren von *Platynereis dumerilii*. Allerdings befand sich am Ende der Inkubationsperiode auch in der 200µM-Gruppe kein einziger Keim mehr im 4-Zellstadium. Trotz Olomoucine haben die Keime die dritte Furchungsteilung wenn nicht in allen, so doch zumindest in einzelnen Blastomeren abgeschlossen. Vermutlich benötigte das Olomoucine nach Inkubationsbeginn noch einige Minuten, um in die Zellen zu diffundieren (siehe auch Diskussion). Die darauffolgende vierte Furchungsteilung wurde jedoch in allen Keimen während der Dauer der

Olomoucine-Behandlung vollständig unterdrückt und die Blastomeren verharrten in der Interphase des 8-Zellstadiums (=Interphaseblock). Sehr wahrscheinlich waren die Blastomeren dabei, wie es für eine Inhibierung der Cdc2/Cyclin-Kinasen zu erwarten wäre, in der G2-Phase der vierten Mitose arretiert.

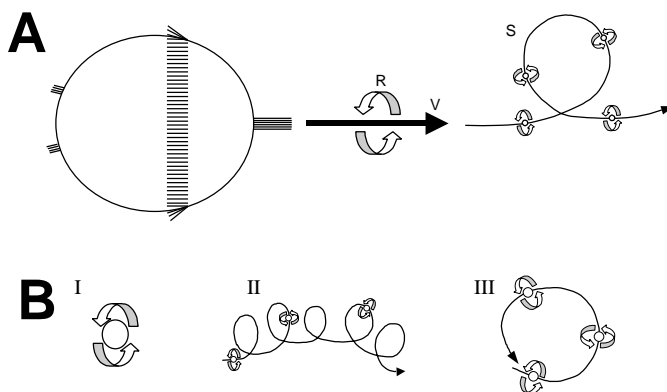
Neben dem bei allen Olomoucine-Konzentrationen gleichermaßen wirksamen Interphaseblock, war auch eine zweite furchungshemmende Wirkung von Olomoucine zu beobachten, welche klar von der Olomoucine-Dosis abhängig war. Für die Mitose, welche der dritten Furchungsteilung vorausgeht und welche offensichtlich eingeleitet worden war, bevor Olomoucine in den Zellen wirken konnte, benötigten die Blastomeren je nach Olomoucine-Konzentration unterschiedlich lange. Von den mit 50µM Olomoucine behandelten Keimen wiesen 260 Minuten nach Besamung, also 60 Minuten nach Beginn der Olomoucine-Inkubation, bereits sechs von 10 Keimen acht Kerne auf. Am Ende der Inkubationsperiode (320 Minuten nach Besamung) hatten sämtliche Keime dieser Gruppe das 8-Zellstadium erreicht. In den 100µM- und 200µM-Gruppen ließen sich erst 290 Minuten nach Besamung, also etwa 30 Minuten später als in der 50µM-Gruppe, die ersten Keime mit acht Kernen nachweisen. Am Ende der Inkubationsperiode hatten in der 100µM-Gruppe neun, in der 200µM aber nur drei von je 10 Keimen die dritte Furchungsteilung in allen Blastomeren abgeschlossen. Dieser Effekt beruht wahrscheinlich nicht auf einer Hemmung von Cdc2, sondern ist vermutlich auf eine Cdc2-unabhängige Wirkung von Olomoucine zurückzuführen, weil die Cdc2/Cyclin-Kinasen nur für den Eintritt in die M-Phase notwendig sind und anschließend durch den Abbau der Cycline rasch wieder deaktiviert werden. Yakisich *et al.* (1998) berichten von „frühen inhibitorischen Effekten auf die DNA-Synthese“ durch Olomoucine, die nicht über Cdc2 bzw. Cdk2 vermittelt werden und die möglicherweise die bei *Platynereis* beobachtete Verlangsamung der Zellzyklen hervorrufen.

Der durch Olomoucine verursachte Zellteilungsblock war weitgehend reversibel. Dabei hing die Dauer der Erholungsphase deutlich von der Olomoucine-Konzentration ab, mit der die Keime zuvor behandelt worden waren. Wahrscheinlich benötigt Olomoucine je nach Anfangskonzentration unterschiedlich lange, um vollständig aus den Keimen auszudiffundieren.

Bei der 50µM-Gruppe waren am Ende der Inkubationsperiode (320 Minuten nach Besamung) sämtliche Blastomeren in der Interphase des vierten mitotischen Zellzyklus arretiert, befanden sich also in der gleichen Zellzyklusphase. Insofern waren alle Blastomeren synchronisiert. Bemerkenswert ist aber, daß diese erzwungene Synchronität nach der



Olomoucine-Behandlung sehr rasch wieder verlorenging. Bereits 60 Minuten nach dem Ende der Inkubationsperiode (380 Minuten nach Besamung) wiesen zwei von zehn Keimen der 50µM-Gruppe 17 bzw. 20 Kerne auf, was nur mit einem asynchronen Verlauf der Zellzyklen zu erklären ist. Bei der gleichen Gruppe befanden sich 440 Minuten nach Besamung sogar wieder alle Keime dieser Gruppe in einem intermediären Furchungsstadium zwischen dem 8- und 16- bzw. zwischen dem 16- und 32-Zellstadium.



**Abbildung 13: Die Schwimmbewegungen von Trochophora-Larven aus der Kontrollgruppe und aus den mit Olomoucine behandelten Versuchsgruppen. A:** Normale 24h alte Trochophorae schwimmen langsam um sich selbst rotierend (R) in großen weiten Schleifen (S) vorwärts (V). **B:** Olomoucine-behandelte Trochophorae hingegen rotieren sehr langsam um ihre eigene Achse ohne sich fortzubewegen (I), schwimmen in sehr kleinen Schleifen torkelnd voran (II) oder schwimmen um sich selbst rotierend gewissermaßen auf der Stelle im Kreis (III).

Im Anschluß an die Olomoucine-Inkubation wurden über mehrere Tage die lebenden Larven, die aus allen Versuchsgruppen hervorgingen, auf Anomalien des Verhaltens und der Anatomie hin untersucht. Zum Teil wurden auch fixierte Larven unter dem Mikroskop analysiert. Nach ca. 29h Entwicklung hatten sich alle Kontrollkeime zu normalen Trochophorae entwickelt. Diese waren bereits aus ihrer Gallerthülle geschlüpft und schwammen in großen weiten Schleifen, langsam um die eigene Achse rotierend, frei in der gesamten Wassersäule umher (Abbildung 13A). Von den Olomoucine-behandelten Keimen waren sehr viele verendet. Darüber hinaus war die Schwimmfähigkeit der überlebenden Trochophorae deutlich vermindert (Abbildung 13B). Die Keime rotierten am Grund der Aufzuchtsschalen langsam auf der Stelle. Einige torkelten in sehr kleinen Schleifen voran. Nur wenige Keime in der 50µM-Gruppe bewegten sich relativ normal, d.h. um sich selbst rotierend vorwärts. Jedoch blieben diese Keime stets in Bodennähe und konnten offenbar nicht an die Oberfläche schwimmen.

Auch strukturell anatomisch waren die Olomoucine-behandelten Keime deutlich geschädigt, was bereits bei geringer Vergrößerung unter dem Stereomikroskop anhand der ungewöhnlich vielen kleinen Lipideinschlüsse auffiel. Normale Trochophorae haben lediglich 4 große Lipidtropfen (je einen in jeder der vier Makromeren). Unter dem Mikroskop ließen

sich weitere schwere Mißbildungen erkennen. Normale Trochophorae von *Platynereis* weisen auf der Ventralseite der Episphäre fünf große larvale Drüsenzellen auf, die eng beieinander liegen (Abbildung 14A) und sich aufgrund ihres granulären Aussehens deutlich von den anderen Zellen abheben. In den Trochophorae hingegen, welche aus Keimen hervorgingen, die während des dritten mitotischen Zellzyklus in Olomouc in inkubiert worden waren, fanden sich stets ungewöhnlich viele Zellen mit der für die larvalen Drüsen typischen Struktur (Abbildung 14B). Nach einer sorgfältigen Analyse ließ sich hinter der zunächst chaotisch erscheinenden Verteilung der überzähligen Drüsen eine gewisse Ordnung erkennen. So wie bei den normalen Trochophorae (Abbildung 14a) auch, lagen alle Drüsenzellen ausschließlich in der Episphäre (Abbildung 14C) und in unmittelbarer Nachbarschaft zum Prototroch, wo sie unter normalen Umständen auch ausmünden (Dorresteijn, persönliche Mitteilung). Die Drüsen waren jedoch nicht auf die sonst übliche ventrale Seite der Episphäre beschränkt, sondern lagen entlang des gesamten Prototrochs verteilt (Abbildung 14b). Nur zwei aus vielen hundert mit Olomouc behandelten Keimen entwickelten sich über das Trochophora-Stadium hinaus zur Metatrochophora mit beborsteten Parapodien (Abbildung 14D). Jedoch waren auch diese Individuen stark deformiert. Die Anordnung der parapodialen Borstenbüschel bei dem in Abbildung 14D gezeigten Keim deuten auf eine Radialisierung des Embryos hin. Ein Stomodaeum konnte in keinem einzigen Fall nachgewiesen werden.

*folgende Seite:*

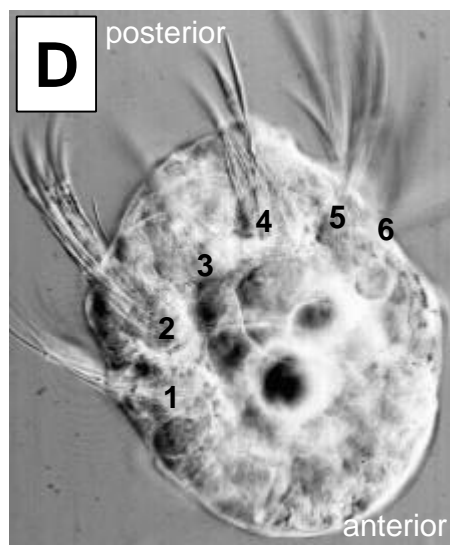
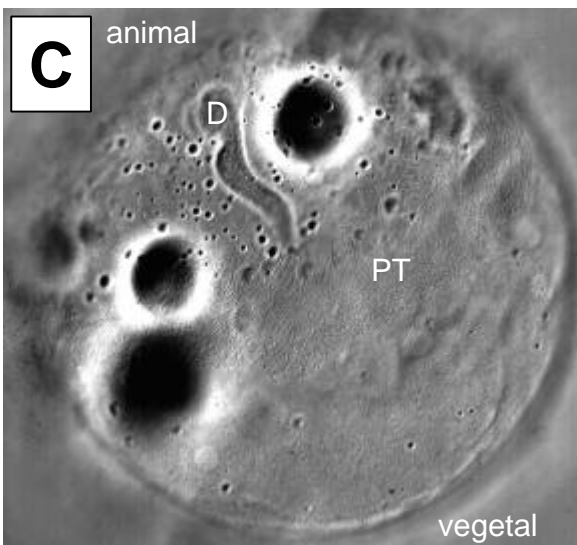
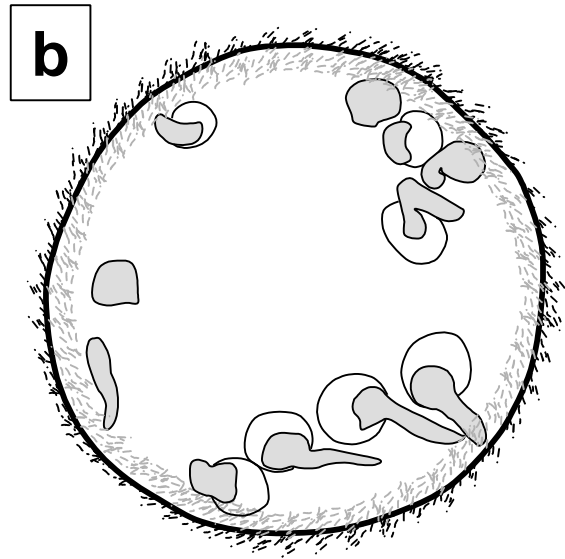
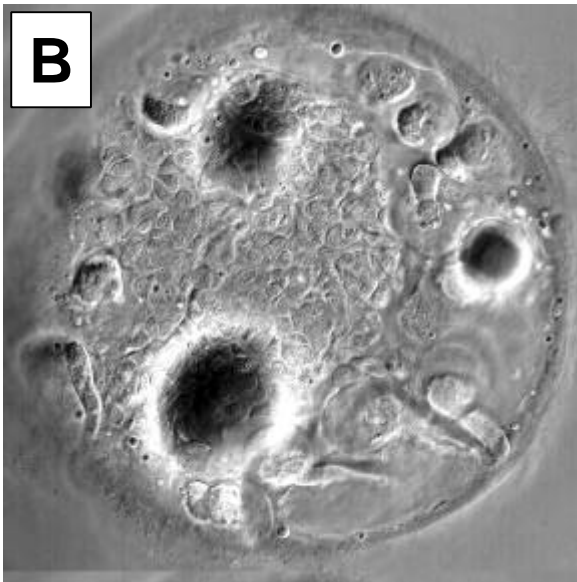
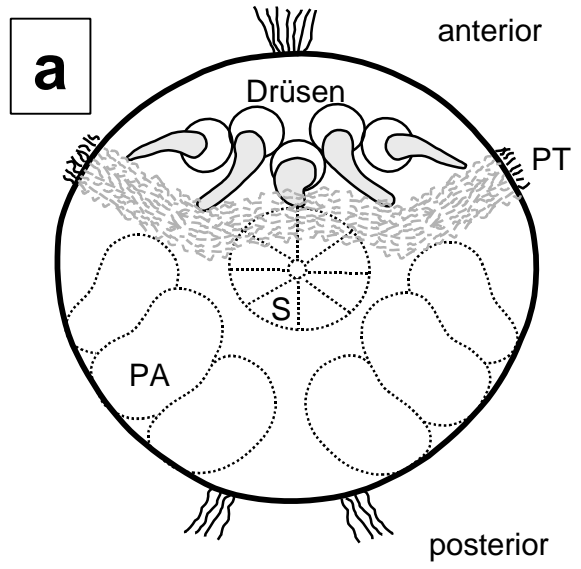
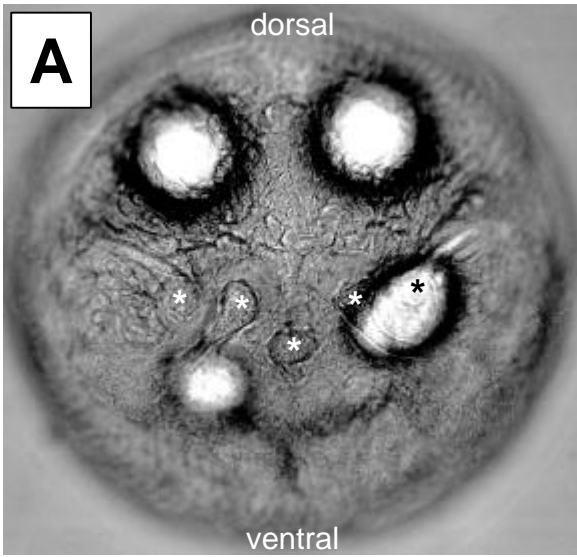
**Abbildung 14: Anatomische Defekte in den Trochophorae nach Olomouc-Behandlung.**

**A, a:** Situs (A, Apikalansicht) und Schema (a, Ventralansicht) einer normalen Trochophora. Die fünf larvalen Drüsenzellen (\*) liegen eng benachbart auf der Ventralseite der Episphäre (A) anterior vom Stomodaeum (S). Diese granulären Zellen heben sich deutlich von den anderen embryonalen Zellen ab und münden jeweils oberhalb des Prototrochs (PT in a) nach außen.

**B, b:** Situs (B) und Schema (b) der Apikalseite eines Olomouc behandelten Embryos im Trochophora-ähnlichen Stadium. Entlang des gesamten Prototrochs (nicht nur auf der Ventralseite) finden sich viele überzählige granuläre Drüsenzellen.

**C:** Seitenansicht eines Olomouc behandelten Embryos im Trochophora-ähnlichem Stadium. Nur auf der animalen Seite des Prototrochs (PT) sind Drüsenzellen (D) vorhanden.

**D:** Ein lebender mit Olomouc behandelte Embryo im Metatrochophora-Stadium. Schräg von vorne betrachtet fällt auf, daß die sichtbaren sechs Borstenbüschel in atypischer Weise rings um den Rumpf herum angeordnet sind.



Nach drei Tagen der Entwicklung wurden einige Keime auf die Verteilung des Enzyms Acetylcholinesterase (AChE) hin untersucht, um morphologische Defekte im Nervensystem der Olomoucín-behandelten Trochophorae aufzuzeigen. AChE läßt sich in *Platynereis*-Embryonen erstmals nach etwa 24h in einigen Zellen des Apikalorgans (larvales Gehirn) nachweisen. Im Metatrochophora-Stadium kommt AChE außer im larvalen Gehirn und dem ventralen Nervensystem auch in zwei Zellansammlungen des Pygidiums vor (Dorresteijn *et al.* 1993, siehe auch Abbildung 15A). In den mit Olomoucín behandelten Keimen kamen unregelmäßig verteilte Gruppen AChE-positiver Zellen vor, die zwar zum Teil nervenartige Ausläufer bildeten (Abbildung 15C-F), aber ansonsten keine Ähnlichkeit mit den normalen neuronalen Strukturen aufwiesen. Die Kontrollkeime waren zu diesem Zeitpunkt bereits dreisegmentige Jungwürmer, bei denen das Enzym AChE im Gehirn, im ventralen Nervensystem und in einigen Zellen des Pygidiums vorkommt (Abbildung 15B).

Die Behandlung mit Olomoucín während des dritten mitotischen Zellzyklus führte in Embryonen von *Platynereis dumerilii* zu einem Arrest in der Interphase des 8-Zellstadiums. Dieser Befund stimmt gut überein mit der erwarteten Hemmung der Cdc2/Cyclin-Kinasen, welche den Übergang von der G2-Phase zur M-Phase regulieren. Nach dem Ende der Olomoucín-Behandlung war die Abfolge der Zellteilungen zwangsläufig verändert. Dies führte zu schweren Mißbildungen im Embryo, wie der Vervielfachung der larvalen Drüsenzellen, einem Organisationsverlust im neuronalen Gewebe und dem weitgehenden Fehlen von Stomodaeum und Parapodienanlagen. Die Anordnung der Drüsenzellen und bei den wenigen Metatrochophorae auch die Anordnung der Parapodien lassen vermuten, daß die Olomoucín-Behandlung zu einem Verlust der dorsoventralen Polarität geführt hat.

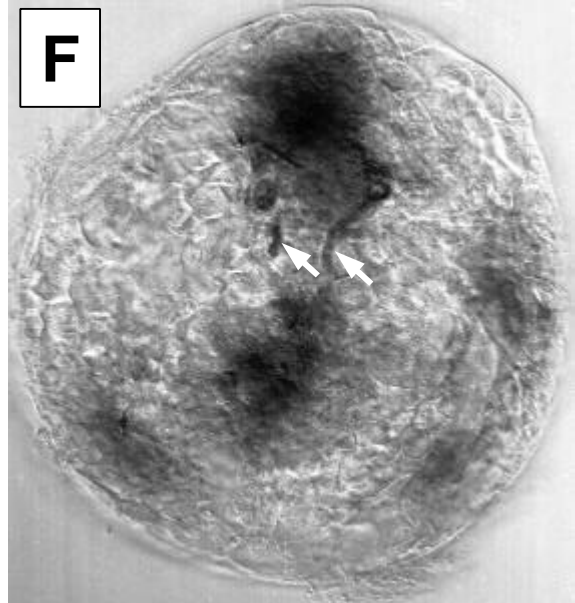
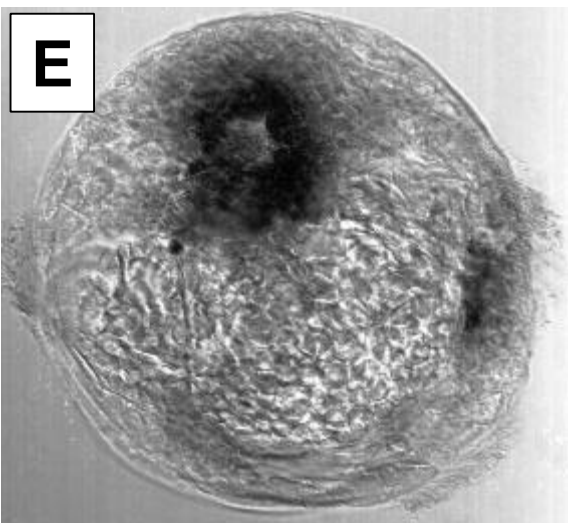
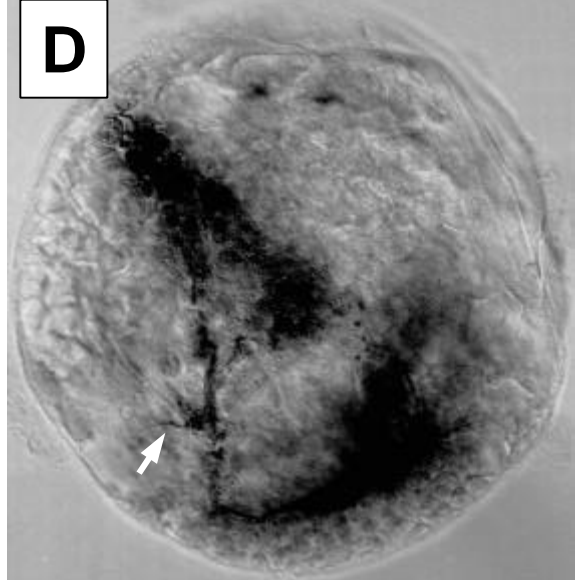
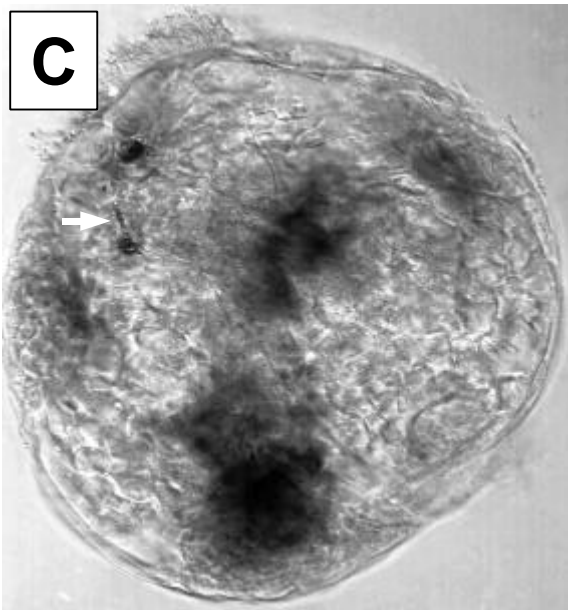
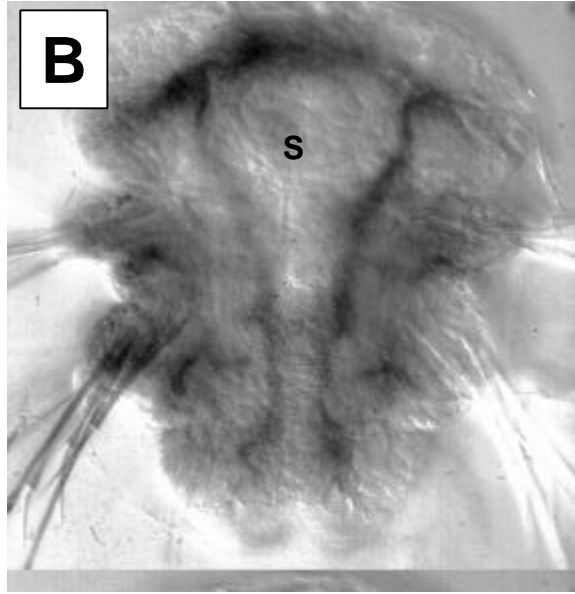
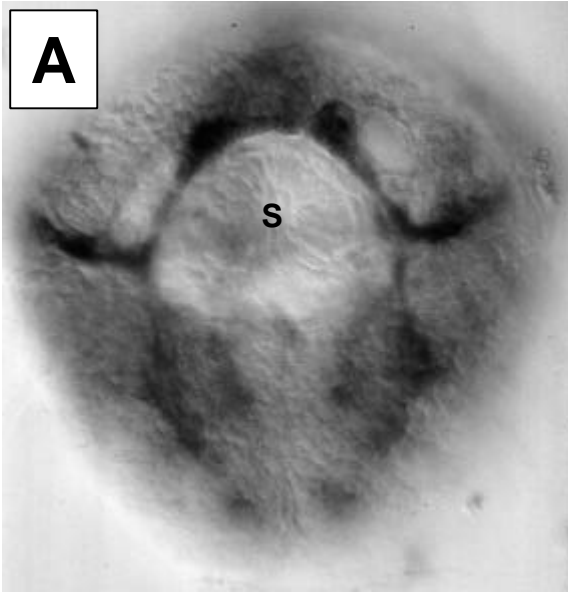
*folgende Seite:*

**Abbildung 15: Acetylcholinesterase Verteilung in 2-3 Tage alten Larven von Kontroll- und mit Olomoucín-behandelten Keimen.**

**A:** AChE-Verteilung in einer normalen 48h-alten Trochophora (Abbildung von A. Dorresteijn). Außer im larvalen Gehirn oberhalb des Stomodaeums (S) und im ventralen Nervensystem findet sich das Enzym auch in zwei ventrolateralen Bereichen der prätrochalen Region und in zwei Zellklustern des Pygidiums.

**B:** In drei Tage alten Kontrollkeimen lassen sich die Stränge des ventralen Nervensystems gut erkennen. Aufgrund unspezifischer Kupferoxidpräzipitation sind auch die parapodialen Drüsen markiert.

**C-F:** Olomoucín-behandelte Embryonen entwickeln sich auch nach drei Tagen nicht über ein Trochophora-ähnliches Stadium hinaus. In diesen Keimen lassen sich unregelmäßig verteilte Gruppen von AChE-positiven Zellen ohne erkennbare Ordnung erkennen. Teilweise finden sich auch nervenähnliche Ausläufer (Pfeile).



### **3.3 Klonierung und Sequenzierung von zellzyklusregulierenden Genen von *Platynereis dumerilii***

Wie schon in der Einleitung erwähnt, vermuten wir einen Zusammenhang zwischen der Dauer der Zellzyklen und dem Entwicklungsschicksal der Blastomeren. Ein Ziel meiner Arbeit war die Suche nach molekularen Werkzeugen, mit deren Hilfe man die Zellzyklen individueller Blastomeren im intakten Keim gezielt verändern kann. Die in Kapitel 3.2.1 vorgestellten Antikörper sind in dieser Hinsicht leider ungeeignet. Neben den spezifisch erkannten zellzyklusregulierenden Proteinen (Cyclin und Cdc2) erkennen sie unspezifisch auch weitere Proteine von *Platynereis*. Eine Injektion solcher Antikörper in Blastomeren könnte somit zu unkalkulierbaren Nebeneffekten führen. Der Cdc2-spezifische Hemmstoff Olomoucine (3.2.3) wiederum ist membrangängig und diffundiert somit stets in alle Zellen gleichermaßen. Er ist also ungeeignet die Zellzyklen einzelner Blastomeren zu blockieren. Außerdem zeigt Olomoucine auch unspezifische Nebeneffekte. Deshalb habe ich damit begonnen, Gene zellzyklusregulierender Proteine von *Platynereis dumerilii* zu klonieren, um damit für experimentelle Zwecke ganz spezifische Sonden in die Hand zu bekommen. Dazu habe ich zunächst cDNA-Banken aus Embryonen von *Platynereis dumerilii* konstruiert (3.3.1). Anschließend wurden über eine Polymerase-Kettenreaktion (PCR) unter Verwendung degenerierter Primer Fragmente von zellzyklusregulierenden Genen aus embryonaler *Platynereis*-cDNA amplifiziert (3.3.2 bis 3.3.5). Einige der amplifizierten PCR-Fragmente konnten erfolgreich kloniert und sequenziert werden (3.3.2 und 3.3.3). Im Falle des *wee1*-Gens konnte sogar das vollständige Gen aus den embryonalen cDNA-Banken isoliert werden (3.3.2).

#### 3.3.1 Herstellung embryonaler cDNA-Banken

Als Grundlage für die Klonierung vollständiger *Platynereis*-Gene habe ich vier embryonale cDNA-Banken hergestellt. Dazu wurde mRNA aus verschiedenen Entwicklungsstadien gewonnen und in cDNA umgeschrieben. Schließlich wurde die cDNA in den  $\lambda$ -ZAP™ II-Insertionsvektor (Stratagene) einkloniert und in die Hüllproteine des  $\lambda$ -Phagen verpackt (2.10.1).

#### **Auswahl der Stadien**

Eine der Banken basiert auf mRNA, welche 45 Minuten nach Besamung gewonnen wurde. Diese Genbank umfaßt nur maternale Genprodukte, weil zu diesem Zeitpunkt die zygotische Transkription noch nicht angelaufen sein kann: die Meiose des Oocytenkerns muß

erst noch abgeschlossen werden, und der Spermienkern befindet sich noch im kondensierten Zustand an der Eioberfläche. Erst etwa 90min nach Besamung findet die Karyogamie der Vorkerne zum Zygotenkern statt (Dorresteiijn 1990).

Es wurden bewußt keine unbesamten Oocyten als Ausgangsmaterial ausgewählt, da sie in den Kortikalgrana große Mengen an Gallertsubstanzen enthalten. Diese würden bei der Lysierung der Zellen stark aufquellen und das Homogenat zu einer zähen dickflüssigen Masse verschleimen. 45 Minuten nach Besamung jedoch sind die Kortikalgrana vollständig ausgestoßen (Kluge *et al.* 1995). Die ausgeschleuste Gallerte kann dann leicht von den Oocyten abgewaschen werden und stört so bei der Fixierung und Lysierung der Oocyten nicht mehr. Das 45min-Stadium ist also idealer Ausgangspunkt für die Konstruktion einer *Platynereis* cDNA-Bank, die nur maternale Transkripte umfassen soll.

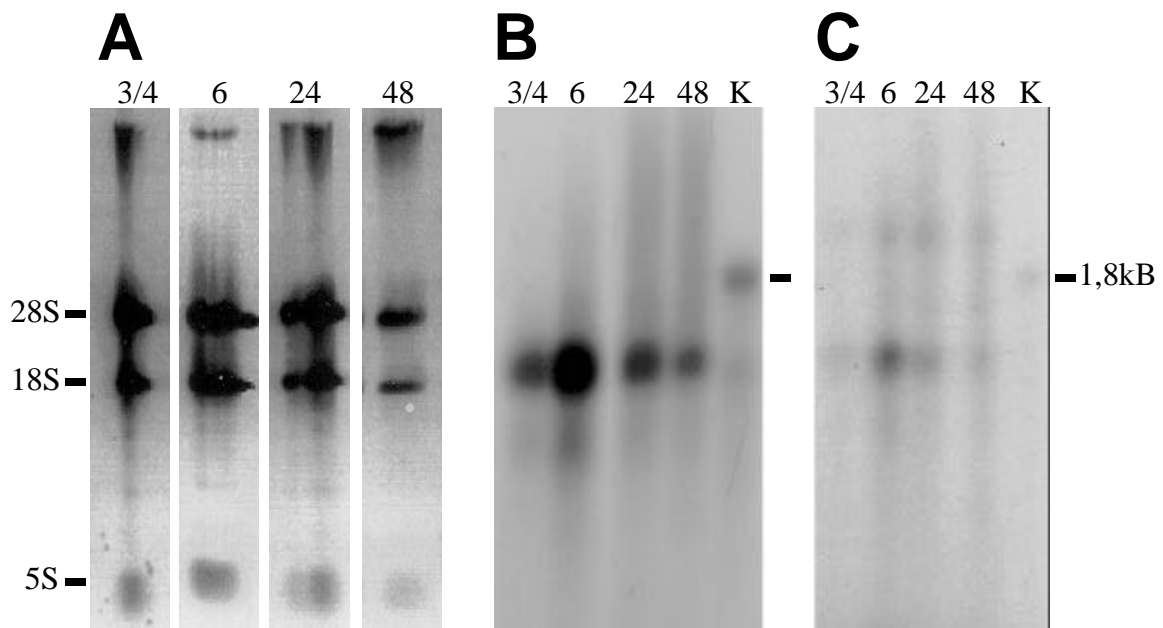
Die zweite cDNA-Bank wurde aus sechs Stunden alten Embryonen hergestellt. In diesem Alter haben die Embryonen bereits die fünfte Furchung abgeschlossen und bestehen aus etwa 32 Zellen. Die fünfte Furchungsteilung markiert bei *Platynereis* ein Übergangsstadium, welches der *Midblastula-Transition* anderer Organismen entspricht: nach der fünften Furchungsteilung werden die Furchungasynchronien zwischen den Blastomeren extrem verstärkt und die Dauer der Zellzyklen nimmt in den meisten Zelllinien schlagartig zu (Dorresteiijn 1990). In Analogie zur *Midblastula-Transition* besser untersuchter Tierarten (Andéol 1994) nehmen wir daher an, daß nach der fünften Furchungsteilung bei *Platynereis* die zygotische Transkription in großem Umfang einsetzt. Dieses Stadium erscheint deshalb für die Analyse der differentiellen Zellteilungskontrolle besonders interessant.

Zwei weitere cDNA-Banken wurden aus 24- bzw. 48 Stunden alten Trochophorae gewonnen. Zwar gibt es einzelne maternale Effektgene welche auch noch in älteren Larven wirken (Fischer 1971). Insgesamt wird jedoch der Anteil maternaler Genprodukte in den Trochophora-Banken im Gegensatz zu den cDNA-Banken früherer Stadien deutlich niedriger sein. Außerdem entsprechen die Teilungszyklen in den Trochophorae von *Platynereis*, so wie bereits für *Nereis* gezeigt (Dondua und Fedorova 1982), sehr wahrscheinlich dem „Standardmodell“ somatischer Zellproliferation, d.h. die Zellen durchlaufen eine G1-, S-, G2- und M-Phase. Darin weichen sie von den speziellen Mitosen der frühen Furchungsteilungen ab, bei denen in *Platynereis* eine G1-Phase fehlt (Heimann 1994). Für die Regulation der Furchungsteilungen sind deshalb möglicherweise nur ein Teil oder spezielle Varianten jener Gene erforderlich, welche die somatischen Mitosen späterer Stadien regulieren. So wird das Cyclin A1 bei *Xenopus*-Keimen beispielsweise nur

während der frühen embryonalen Stadien exprimiert (Howe *et al.* 1995). In den Trochophora-cDNA-Banken von *Platynereis* sollten sich hingegen alle für die somatischen Zellzyklen notwendigen Gene finden lassen.

### Die Qualität der hergestellten cDNA-Banken

Die Qualität der cDNA-Banken hängt entscheidend vom Ausgangsmaterial, der isolierten RNA ab. Ribonukleasen, die während der RNA-Isolation aktiv werden, können die mRNA-Transkripte drastisch verkürzen, so daß keine vollständigen Gene mehr kloniert werden können. Ein Aliquot der aus den verschiedenen Stadien isolierten Gesamt-RNAs wurde deshalb auf einem Agarosegel analysiert (Abbildung 16A). Die in der Gesamt-RNA mengenmäßig dominanten ribosomalen RNAs (28S-, 18S-, 5S-rRNA) waren auf dem Gel als scharfe Banden deutlich zu erkennen. Sie wurden offenbar unzerstört präpariert und aufgetrennt. Daraus läßt sich folgern, daß auch die mRNAs bei der Präparation weitestgehend intakt blieben.



**Abbildung 16: Kontrollgele zur Beurteilung der Qualität der cDNA-Banken.** Abbildung (A) zeigt die elektrophoretische Auftrennung der aus unterschiedlich weit entwickelten (3/4h, 6h, 24h, 48h) *Platynereis*-Embryonen isolierten Gesamt-RNA. Die anhand der mRNA synthetisierte cDNA wurde während der Primärstrangsynthese (B) bzw. während der Sekundärstrangsynthese (C) radioaktiv markiert. Nach elektrophoretischer Auftrennung wurden die cDNA-Moleküle autoradiographisch sichtbar gemacht. Eine Kontroll-mRNA von 1,8kB Länge wurde ebenfalls in cDNA umgesetzt, um die Größenverteilung der cDNA-Moleküle abschätzen zu können. Die Intensität der Schwärzung auf den Autoradiogrammen läßt keine Aussage über die synthetisierten Mengen zu, da unter den vom Protokoll vorgesehenen Bedingungen die Sekundärstränge generell schwächer markiert werden als die Primärstränge.

Ein zweiter für die Qualität der cDNA-Banken entscheidender Schritt ist die „Rückübersetzung“ der mRNA in cDNA. Dazu wird zunächst die mRNA mit Hilfe des Enzyms



„Reverse-Transkriptase“ in einzelsträngige cDNA umgeschrieben (Primärstrang). Anschließend wird mit der *E. coli*-DNA-Polymerase I der komplementäre Strang synthetisiert (Sekundärstrang) und die cDNA zum doppelsträngigen Molekül ergänzt. Bildet die mRNA Sekundärstrukturen (Dimere, Schleifen) aus, kann es bei der Primärstrangsynthese zu unvollständig synthetisierten cDNAs kommen. In ungünstigen Fällen kann es bei der Sekundärstrangsynthese zu einem vorzeitigen Kettenabbruch und damit ebenfalls zur Synthese verkürzter Moleküle kommen.

Das von der Lieferfirma Stratagene mitgelieferte Protokoll sah als Kontrolle vor, sowohl bei der Primärstrang-, als auch bei der Sekundärstrangsynthese einen Teil der Reaktionsprodukte radioaktiv zu markieren. Dieses Protokoll wurde befolgt und die Kontrollansätze wurden anschließend auf einem Agarosegel aufgetrennt und autoradiographisch sichtbar gemacht. Als Vergleich wurde eine 1,8kB-lange Kontroll-mRNA ebenfalls in cDNA rückübersetzt und mit auf das Gel aufgetragen. Im Vergleich mit der Kontrolle konnte die Länge und damit die Qualität der *Platynereis*-cDNA beurteilt werden (Abbildung 16B, C). Das Gros der synthetisierten *Platynereis*-cDNAs ist kürzer als 1,8kB und damit auch kürzer als durchschnittliche eukaryotische mRNA's. Es ist allerdings unklar, ob bei *Platynereis* die durchschnittliche Länge der Transkripte generell unter 1,8kB liegt, oder ob sich bei der Primärstrangsynthese Kettenabbrüche ereigneten. Die kontinuierlichen Belichtungsschatten im Autoradiogramm oberhalb der Hauptbanden zeigen jedoch, daß zumindest in den 6h-, 24h- und 48h-Präparationen auch ein beträchtlicher Anteil längerer cDNA-Moleküle vorkommt. Die Bandenmuster der Primär- und Sekundärstränge sind identisch. Bei der Sekundärstrangsynthese ist es also zu keinem Kettenabbruch und damit zu keinem Längenverlust gekommen. Letztendlich läßt sich die Qualität der eingesetzten cDNA anhand erfolgreich isolierter Gene beurteilen. Der von mir aus der 45min-cDNA-Bank isolierte *wee1*-Klon (3.3.2) hat eine Länge von über 3,7kB und beweist damit, daß bei der Konstruktion der cDNA-Banken auch sehr lange Transkripte vollständig in cDNA umgeschrieben wurden.

**Tabelle 19: Eckdaten der embryonalen cDNA-Banken von *Platynereis dumerilii*.**

Entwicklungsstadium [Zeit nach Besamung]	Eingesetzte poly(A)-RNA [µg]	Gesamtumfang der Primärbanken [pfu]	Titer der Sekundärbanken [pfu/ml]
45min (Oocyten)	7,7µg	7,3 x 10 <sup>5</sup>	6,7 x 10 <sup>9</sup>
6h (>32-Zellstadium)	7,7µg	2,0 x 10 <sup>6</sup>	8,6 x 10 <sup>9</sup>
24h-Trochophorae	7,0µg	4,4 x 10 <sup>6</sup>	7,0 x 10 <sup>10</sup>
48h-Trochophorae	8,0µg	3,7 x 10 <sup>5</sup>	1,5 x 10 <sup>11</sup>

pfu: *plaque forming units*

Die cDNA-Moleküle werden schließlich *in vitro* in Hüllproteine des  $\phi$ -Phagen verpackt. Die Population der so erzeugten Phagenpartikel (Primärbank) stellt im Idealfall ein 1:1-Abbild der eingesetzten mRNA-Moleküle dar. Je mehr Phagenpartikel erzeugt werden, desto repräsentativer ist die jeweilige cDNA-Bank. Der Umfang und der Phagentiter der Banken wird zum Schluß durch Amplifizierung der Phagenpartikel in *E. coli*-Bakterien drastisch erhöht (Sekundärbank), so daß genügend Material für die Klonierungsarbeiten entsteht. Mit über zwei bzw. vier Millionen pfu (*plaque forming units*) haben die 6h bzw. 24h-Primärbanken jeweils einen sehr guten, repräsentativen Umfang. Die 45min- und insbesondere auch die 48h-Primärbanken sind mit jeweils unter einer Million pfu deutlich weniger repräsentativ. Sie eignen sich deshalb nur begrenzt für die Suche nach seltenen Genen, welche nur in geringen Ausmaß transkribiert werden. In Tabelle 19 sind die Eckdaten der von mir hergestellten *Platynereis*-cDNA-Banken noch einmal zusammengefaßt.

folgende Seite:

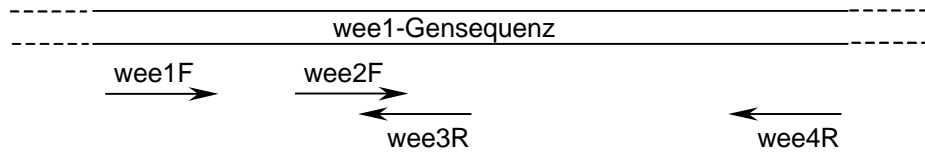
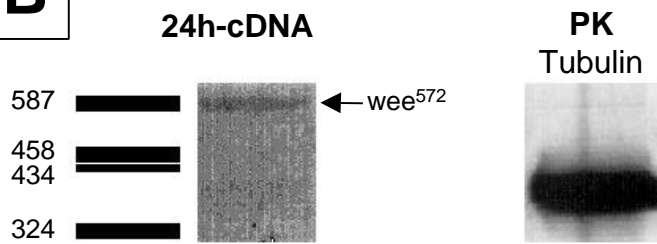
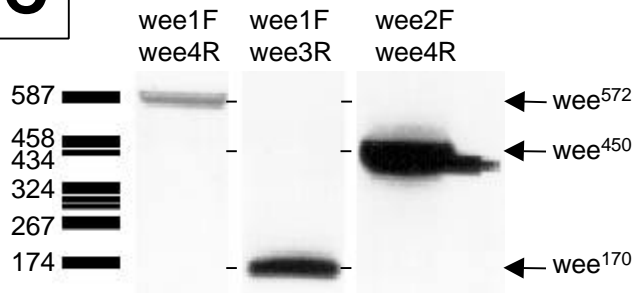
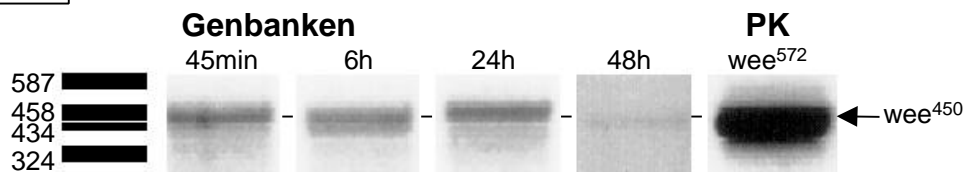
**Abbildung 17: PCR-Amplifizierung eines *wee1*-Fragmentes aus *Platynereis*-cDNA.**

**A:** Schematische Darstellung der kodierenden Sequenz eines *wee1*-Transkriptes mit den Positionen der verwendeten degenerierten PCR-Primer.

**B:** Mit den Primern *wee1F* und *wee4R* konnte aus 24h-cDNA von *Platynereis* eine sehr schwache 572Bp-Bande amplifiziert werden (linke Spur, Reaktionsbedingungen siehe Tabelle 6 auf Seite 36). Zur Verdeutlichung der Bande ist die Spur kontrastverstärkt worden. Die gleichzeitige Amplifizierung eines Tubulin-Fragmentes zeigt, daß die mangelhafte Amplifizierung nicht methodenbedingt ist.

**C:** Kontroll-PCR mit dem 572Bp-Fragment aus **B** als DNA-Matrize. Außer mit dem original Primerpaar *wee1F/wee4R* ließen sich auch in Kombination mit den internen Primern (*wee1F/wee3R*; *wee2F/wee4R*) Fragmente amplifizieren (Reaktionsbedingungen siehe Tabelle 7 auf Seite 36). Das Primerpaar *wee2F/wee4R* ist zur Amplifizierung des *Platynereis wee1*-Gens wesentlich besser geeignet als das Paar *wee1F/wee4R*.

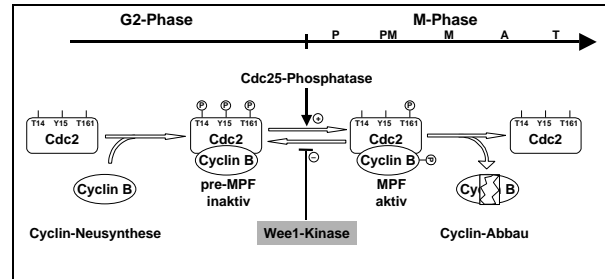
**D:** Mit den Primern *wee2F/wee4R* läßt sich in allen cDNA-Banken das *Platynereis wee1*-Gen nachweisen (Reaktionsbedingungen wie in **C**). Als Größenvergleich ist in der Positivkontrolle das *wee*<sup>450</sup>-Fragment aus dem klonierten *wee*<sup>572</sup>-Fragment herausamplifiziert worden. PK: Positivkontrolle

**A****Schematische Anordnung der degenerierten wee1-Primer****B****PCR-Amplifikation eines 572Bp-langen wee1-Fragmentes ( $wee1^{572}$ )****C****Reamplifikation des  $wee1^{572}$ -Fragmentes mit verschiedenen Primerpaaren****D****Nachweis des  $wee1^{450}$ -Fragmentes in den *Platynereis* cDNA-Banken aus der Oocyte (45min) bzw. alteren Embryonalstadien (6h-48h)**

### 3.3.2 Klonierung eines PCR-Fragmentes und des vollständigen Gens der *Platynereis* Wee1-Proteinkinase

#### Klonierung und Amplifizierung eines wee1-PCR-Fragmentes

Zur Amplifizierung eines wee1-Fragmentes standen mir vier degenerierte Primer aus der Arbeitsgruppe von Dr. van Loon zur Verfügung (Abbildung 17A). Mit den Primern wee1F und wee4R konnte



ich in einer PCR aus *Platynereis*-cDNA (24h) eine ganz schwache Bande von etwa 572Bp amplifizieren (Abbildung 17B). Um zu überprüfen, ob es sich wirklich um ein wee1-Fragment handelt, wurde diese Bande aus dem Gel eluiert und in einer zweiten Kontroll-PCR selbst als DNA-Matrize eingesetzt. Erwartungsgemäß konnte das Fragment mit dem Primerpaar wee1F und wee4R weiter amplifiziert werden (Abbildung 17C, linke Spur). Darüber hinaus konnten aus dem 572Bp-Fragment auch mit den internen Primern wee3R bzw. wee2F, jeweils in Kombination mit wee1F bzw. wee4R, ebenfalls Fragmente amplifiziert werden (Abbildung 17C, mittlere und rechte Spur). Dieses sogenannte „nested priming“ belegt, daß es sich bei dem als Matrize eingesetzten 572-Bp-Fragment tatsächlich um ein Fragment des wee1-Gens gehandelt hat, andernfalls hätten die wee1-spezifischen internen Primer nicht funktionieren dürfen. Die 572Bp-Bande konnte ich erfolgreich klonieren und sequenzieren (Abbildung 18, die Nukleotide 835 bis 1404 des gesamten Gens entsprechen dem PCR-Fragment).

Die Kontroll-PCR (s.o.) hat gezeigt, daß das Primerpaar wee2F/wee4R zur Amplifizierung eines wee1-Fragmentes sehr viel besser geeignet ist, als das zuerst verwendete Primerpaar wee1F/wee4R (Abbildung 17C). Deshalb habe ich das zuerst genannte Primerpaar verwendet, um das wee1-Transkript in den embryonalen cDNA-Banken von *Platynereis* nachzuweisen (Abbildung 17D). Das wee<sup>450</sup>-Fragment, und damit das wee1-Transkript, ist schon in der 45min-cDNA-Bank als maternales Transkript (siehe auch 3.3.1, „Auswahl der Stadien“) nachweisbar. Auch in den 6h-, 24h- und 48h-cDNA-Banken ist das wee1-Genprodukt nachweisbar.

#### Isolierung des vollständigen wee1-Gens aus einer embryonalen cDNA-Bank

Das klonierte PCR-Fragment wurde mit Digoxigenin markiert und als Sonde eingesetzt, um im klassischen Plaque-Hybridisierungsverfahren mehrere wee1-positive cDNA-Klone

aus der 45min-cDNA-Bank zu isolieren. Den längsten dieser Klone (pBlwee1-10) habe ich vollständig sequenziert. Dieser Klon beinhaltet einen offenen Leserahmen von mindestens 1755 Nukleotiden (585 Aminosäuren). Allerdings ist der Leserahmen an seinem 5'-Ende unvollständig, da er nicht das Start-Codon beinhaltet. Aus diesem Grund habe ich zusätzlich einen zweiten Klon (pBlwee1-4) partiell sequenziert. Die Nukleotidsequenz dieses Klons, soweit sie ermittelt wurde, ist weitgehend identisch mit der Sequenz von pBlwee1-10. Im Überlappungsbereich (Nukleotide 90-663 in Abbildung 18) weicht die Sequenz von pBlwee1-4 nur in sechs Nukleotiden von der Sequenz von pBlwee1-10 ab (Positionen 240, 257, 262, 315, 414, 636 in Abbildung 18). Dabei führt nur der Nukleotidaustausch an Position 257 auch zu einem Aminosäureaustausch im Protein. Das zeigt, daß es sich bei den Sequenzen der Klone pBlwee1-4 und pBlwee1-10 um verschiedenen Allele des gleichen Gens handelt. pBlwee1-4 weist aber an seinem 5'-Ende gegenüber pBlwee1-10 zusätzlich 179 Nukleotide auf, so daß der Leserahmen nun vollständig rekonstruiert werden konnte.

*folgende 2 Seiten:*

**Abbildung 18: Die cDNA- und Aminosäuresequenz des *Platynereis dumerilii* Wee1-Transkriptes.** Die abgebildete Nukleotidsequenz (Kleinbuchstaben) entspricht der wee1-mRNA. Die Aminosäuresequenz des Wee1-Proteins ist unterhalb der Nukleotidsequenz dargestellt (Großbuchstaben). Die Nummern am rechten Rand bezeichnen die Nukleotidpositionen. Das erste Aminosäure-kodierende Triplet definiert dabei die Position 1. Die eingerückten kursiven Nummern geben die Aminosäurepositionen an. Die Nukleotidsequenz um das **Start-Codon** herum (Nukleotide -6 bis 4) stimmt in 7 von 10 Positionen mit der Kozak-Konsensussequenz (GCC[A/G]CCATGG) überein (Übereinstimmungen doppelt unterstrichen). Ein **in frame-Stop-Codon** im untranslatierten 5'-Bereich (5'-UTR, Position -45) ist einfach unterstrichen. Im **untranslatierten 3'-Bereich (3'-UTR)** der Nukleotidsequenz sind zwei Polyadenylierungssignale fettgedruckt hervorgehoben. Die Nukleotide 835 bis 1404 entsprechen der Sequenz des als Sonde verwendeten **wee1<sup>572</sup>-Fragmentes**. Innerhalb der Aminosäuresequenz ist die **Proteinkinase Domäne** fettgedruckt dargestellt. Die **ATP-Bindungsstelle** (einfach unterstrichen) und das **Aktive Zentrum** (doppelt unterstrichen) sind darin hervorgehoben. Drei **potentielle PEST-Sequenzen** sind mit einer unterbrochenen Linie unterstrichen. 13 **potentielle Phosphorylierungsstellen** (S/T-P) sind umrahmt. Die Nukleotidsequenz wurde zusammengesetzt aus den **cDNA-Klonen pBlwee1-4 (Nukleotide -85 bis 89) und pBlwee1-10 (Nukleotide 90-3814)**. pBlwee1-4 wurde nur bis Nukleotid 663 sequenziert und weicht im Überlappungsbereich (Nukleotide 90-663) in 6 Nukleotiden (240; 257; 262; 315; 414; 636) von der pBlwee1-10 Sequenz ab. Jedoch führt nur der Nukleotidaustausch an Position 257 auch zu einem Aminosäureaustausch. Beide Klone repräsentieren also zwei Allele desselben Gens. Die in dem Klon pBlwee1-4 gegenüber pBlwee1-10 abweichenden Nukleotide bzw. Aminosäuren sind jeweils hochgestellt neben dem Nukleotid bzw. der Aminosäure aus pBlwee1-10 geschrieben (z.B. g<sup>a</sup> an Nukleotidposition 257).

-85 agatg gtggaagggtt gtgtttacag -61

gtggcattta aaagttgaaa gcaaaggaat ttacgtagat tattaactga caacgtcaac -1

atg tcg att tgc aaa gga agg ttg atc ttc cac ccg aga tcg gag cgc cgt agg 54

M S I C K G R L I F H P R S E R R R 18

gag gat tcg ggc atc gca cag acc tta aac ttc cag gac gac gac gat aac gaa 108

Q D S G I A Q T L N F Q D D D D N E 36

atg gac tca agt ttc aac gac gct tca atg gag tcc gtg agt cct gtt cgc tca 162

M D S S F N D A S M E S V S P V R S 54

aaa act tcc ccc tct gcc ttc tgg gac tct tcg ctg gag tcc cct gtt agt tct 216

K T S P S A F W D S S L E S P V S S 72

aac acc cgt aaa tcg aga aga tcc<sup>f</sup> ccc cgg tca gcc agg agt<sup>t</sup> cag ctg ctg tcg 270

N T R K S R R S P R S A R S<sup>n</sup> Q L L S 90

ccg att cct ttc agt tgc gaa gat tcc gag gag gaa cac gtt gct<sup>f</sup> gaa tcg ttg 324

P I P F S C E D S E E E H V A E S L 108

tct gcc aag tcg gtc cat ggg aaa tta cct tcg ttc cct ctc acc cct ccc cac 378

S A K S V H G K L P S F P L T P P H 126

aag aaa tta cgc tct ctc aga ctc tat gac act cct<sup>f</sup> cat acc cct aaa agt tta 432

K K L R S L R L Y D T P H T P K S L 144

ttg caa aag gca cag aga cgg ata aca cgg gca caa cgg agt atg act gat gag 486

L Q K A Q R R I T R A Q R S M T D E 162

aag ttc tgc cta aac aac aac agt ctg aat ggc atc aca aca gca aat ggc aat 540

K F C L N N N S L N G I T T A N G N 180

acc agt gcc aat gga aca tgt gca tcg gca gag aga ccc ctg act aat atc aac 594

T S A N G T C A S A E R P L T N I N 198

cct ttt act cct gac aac aac aac ttg aat tta tct gga ggg<sup>f</sup> gtt aag aga cca 648

P F T P D N N N L N L S G G V K R P 216

cga cat aac gga ttt gat ggg agt tta aca gat gac tta att gag gaa gat tta 702

R H N G F D G S L T D D L I E E D L 234

gaa gat gac atg cct tca aca aag aaa att gcc ttg aga gag atc aac aca ttc 756

E D D M P S T K K I A L R E I N T F 252

aga tac aat gag gag ttc cac caa gtt agc aaa tta gga gat gga gaa ttc ggt 810

R Y N E E F H Q V S K L G D G E F G 270

agc gtc tac aag tgt atc cat cga ttg gac ggc tgc tgt tat gcc att aag aaa 864

S V Y K C I H R L D G C C Y A I K K 288

tct aag aaa ccc gtt gcc gga agt gct tat gaa cga caa gct atg aat gaa gtt 918

S K K P V A G S A Y E R Q A M N E V 306

tac gct cac gct gtt cta gga aaa cat cca cac gtt gtc cga tat tat tca gca 972

Y A H A V L G K H P H V V R Y Y S A 324

tgg gca gaa aac gac cac atg tac att caa aat gaa ttt tgt aac gga ggc agt 1026

W A E N D H M Y I Q N E F C N G G S 342

tta gca gac ctt tgt gca gac aat gaa aaa gaa gac acc ctg atg acg gaa gct 1080

L A D L C A D N E K E D T L M T E A 360

gaa ttg aag cag ttg tta tta caa gtc tcc cag ggc ttg cgt tat gta cat tcc 1134

E L K Q L L L Q V S Q G L R Y V H S 378

caa aac tta gtg cac ctt gat atc aaa tta gga aat att ttc ata gac aac agt 1188

Q N L V H L D I K L G N I F I D N S 396

ccc caa att cag tcg cca gaa agc ggg ttc gaa gat tgc gaa gga gaa gag acg 1242

P Q I Q S P E S G F E D C E G E E T 414

gaa gaa atg gac tac atg gtc act tac aaa atc ggt gat tta gga cac gta aca 1296

E E M D Y M V T Y K I G D L G H V T 432

tcg gta tca aac ccc acg gtg gaa gaa ggt gac tgt cga tat ctt ccg aat gaa 1350

S V S N P T V E E G D C R Y L P N E 450

att ctt caa gag aac tac gac aat tta ccc aag gcg gac atc ttc tct ctt gcc 1404

I L Q E N Y D N L P K A D I F S L A 468

ctc act ctg atc gaa gcg gga ggg ggc ggc ccc tta ccc aaa aac gga gaa gaa 1458

L T L I E A G G G G P L P K N G E E 486

tgg cac aag atc cga cga gga gaa ctc ccc tac ttg tcg aat tgt tca cca gct 1512

W H K I R R G E L P Y L S N C S P A 504

ttt aat gaa ttg ctt agg agc atg gcc cat cca gac ccc aga gca aga ccc tcg 1566

F N E L L R S M A H P D P R A R P S 522

gcg gcc gtt ctg cac cag cac cca gcc ctc tgt cca ttc gcc agg aag aca cga 1620

<b>A A V L H Q H P A L C P F A R K T R</b>	540	
gca cag ctg cgc aag gaa ctt aac gag gag agg ttc aag aat gag gtt tta act	1674	
A Q L R K E L N E E R F K N E V L T	558	
agg caa tta caa gaa gcc aag cgt ctg agt gga gca agt cag ccc agt ccg gtt	1728	
R Q L Q E A K R L S G A S Q P <span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">S P</span> V	576	
caa ccg agc atc atc gca gca gct aaa gta ttt ccc gcc cct atg atg acc cag	1782	
Q P S I I A A A K V F P A P M M T Q	594	
tca act cgc caa gcc aga ctc atc gga aga aaa gtc aac cgg agt atc agc ttg	1836	
S T R Q A R L I G R K V N R S I S L	612	
aac ttt tga attacggatgccatg gtggattgct ccgcccctct ttagatggaa attattcccc	1900	
N F STOP	614	
ttagttactt gatgcttatt cctttccac gtctcttgac gtgggtgtac cttccgggtg	1960	
gaaaacggac tgttgctctc gaagataagt aacgcctgtc tttatattatg actgtgatga	2020	
aggaatcggt tgttcaaggt gtgttccatg attttaagggc ctgttttggg aggtacttgt	2080	
ctggaatata tatctttttc aacattttaa ttatgttact gctaacttta tgaactgtgt	2140	
caacatggca agaaatatgt gaatatctta ttcttatttt aaatgtatac atagattatt	2200	
tgagattcat ttttaacttct atatatattg tagaaattta taccctatca tttctaaaat	2260	
atcaatttta aagcctactt tataaagtaa atttttaaag atcatattgc tcatattatgt	2320	
gctgctgatg tttttaaattt gttcgctttt gagattaaat taaattattt gcttcacgac	2380	
tatatccgtc ctgtacatat actcgttaag tgtacacttt ttgtaaaaat attgatgcag	2440	
tgttatgctg tgcaggttcg tgtgactatt ttttatctgc cgctctacag cgtttgctat	2500	
aagactcctt gagattatac tacaactggt tcagagggaa ctttgacatt atgatgatgc	2560	
tatagaaaaa gtagaacat gtataagtca atagccagct atgttcgtaa cttactaat	2620	
cctcatctta tgccttaata caattttgta ccctaaattc tcattttggt atctttttga	2680	
ttcttttagga tagaatgata aatttaaaat ggacaaaaat agaata <b>ataa</b> atttaaaatg	2740	
ggcaaaaata atagcccttg ctataatatg aaaaaaaaaa ttcagttaaa aggctctgac	2800	
ctggttctgc tatgtagtgc aggcctctca ttgcaatttc ccctcattta cagtaccttt	2860	
ttacattaaa tatttgaaaa tattgcatat aatggaagtt caatatcttc tttaatcaga	2920	
caccttaagg ttaaaatcct cgaatgtcta gcttcctctg aaacggctgt gattttgata	2980	
ttgtgcyagt agactgggac ttcttgctgg gcgagtagaa gcttggatta gaaagcgatt	3040	
taggacgagg ggaggcaaag tatggtgctt cttggtgaat tttatttcgg tagatgacca	3100	
cgattgtact tttcaccatt aaacttgtag atttgtatat attatgtatg ttactcgatt	3160	
aacggcatca ttagcctcac gtcgtagttt caaactttca ttacatgtac ttcatccaac	3220	
atcattata tatcgattat tcatttcgta attgcatttg ctggcaggat tgttgttcat	3280	
agcattcaaa cattagcatt tattccagag atttgatcag atttgactc atgtgactt	3340	
agaaaaggty cgaaattatg ttagtgtata tatgtatata acggttttac aatgcatgta	3400	
cttactgtat gataaccatt ctaggacttg taaaggttta tagaattacc atgggtgttg	3460	
gcaattgttt gctgcctatt ttatgattgt catgtcttat caactathtt acactttata	3520	
tccatatttt tcgctcttta ttaatggctt acactgattt tgtatgaact tttcttgttc	3580	
gagaaactga ttccaaaggg aatcttttta agatgttttg tattgtttta ccagatggta	3640	
aatttagttt aatttttaac ctacttttgt aatctactag tggagaacta gttccatgcg	3700	
tattgtttaa ggttcatgat taagagaaca acatgcattt gctatgcaag ctgtgattaa	3760	
gtttttgtga cttgaaggat tttg <b>ataa</b> aagatcttta ttttatgaca aaaa	3814	

Subdomänen <-----I-----><-----II-----><-----III-----><-----IV----->

*P. dum.* 257 EFHQVSKLGDGEFGSVYKCIERLDG-CFYAIKKSKK---PVAGSAMEROAMNEVYAHAVLG--KHPHVVRY 321

*S. pur.* 279 EFVEVCKVGSGEFGSVYKCIERLDG-CFYAIKKSRR---PLAGSAREOMALNEVYAHAVLG--THIHVVRY 343

*H. sap.* 298 EFHELEKIGSGEFGSVFKCVKRLDG-CFYAIKRSKK---PLAGSVDROALREVYAHAVLG--QHSHVVRY 362

*X. lae.* 209 EFLEIEKIGAGEFGSVFKCVKRLDG-CFYAIKRSKK---PLAGSTDEOLALREVYAHAVLG--HHPHVVRY 273

*D. mel.* 238 EFMQVNVIGVGEFGVVFQCVNRLDG-CFYAIKKSKK---PVRGSSFEKRALNEVYAHAVLG--KHDNVVRY 302

*S. pom.* 565 RFRNVITLLGSGEFGSEVQVEDPVEKTLKYAVKRLKV---KFSGPKERNRLLOEVSTQRALK--GHDHIVEL 630

*S. cer.* 443 KFTINVHSLGKGFSTVYQVTFQAQTN-KKYAIKAIKPNKYNLSLKRILLEIKILNEVTNQITMDQEGKEYIIDY 513

Konsensus \* \* \* \* \* C RL C \* \* \* \* \*

wee1F

Subdomänen -----><-----V-----><-----VIA-----><-----VIB----->

*P. dum.* 322 YSAWAENDHMYIQNEFCNGGSLADLCADNEKE-DTILMTEAEKQLLQVSOGLRYVHS-ONLVHLDIKLGN 392

*S. pur.* 344 YSAWSBAGHMITQNEYCNGGSLADIISSNKQN-NHRMTEIETLQVLLVQLAQGLKYIHS-EGLVHMDIKFGNI 414

*H. sap.* 363 YSAWAEDDHMITQNEYCNGGSLADAISENYRI-MSYFKEAEKLDLLQVGRGLRYIHS-MSLVHMDIKPSNI 433

*X. lae.* 273 YSAWAEDDHMITQNEYCNGGSLQDLIVDNNK-KGFVLEQELKEILLQVSMGLKYIHS-SGLVHMDIKPSNI 343

*D. mel.* 303 YSAWAEDDHMITQNEFCNGGSLHARIQD---HCLGEAEKIVLVMHVIETGLRYIHS-NDLVHMDIKPANI 368

*S. pom.* 631 MDSWEHGGFTYQVEVFCENGSLDRFLEEQGQ---LSRLDEFVWKILVEVALGLQFIHH-KNYVHLDIKPANV 700

*S. cer.* 514 ISSWKFQNSYIIMTELCEGNLDGFLQEQVIKKRLEDWRIWKIIVELSLALRFIHDSCHTVHLDIKPANV 586

Konsensus S \* DHM I N \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \*

wee2F wee3R

Subdomänen -----><-----VII-----><-----VIII----->

*P. dum.* 393 FIDNSPQIQ-----SPESGFEDCEGETEEMDYM---VTYKIGDLGHVTSVSNPT--VE-EGDCRYL 437

*S. pur.* 415 FISKEPLPSTTPES-EKIDEEEEE--GATEDNTPLAS---LIYKIGDLGHVTSISNPK--VE-EGDVREL 475

*H. sap.* 434 FISRTS-----IPNAASE--EGDEDDWASNK---VMEKIGDLGHVTRISSEFQ--VE-EGDSREL 483

*X. lae.* 344 FICRQ-----TELQEE--SDGEDLSSGS---VLYKIGDLGHVTSIINPQ--VE-EGDSREL 394

*D. mel.* 369 ESTMNPNAHKLVEVQPQTK---DDGMDSVYELRHSENI-VTYKIGDLGHVTSVKBEY--VE-EGDCRYL 432

*S. pom.* 701 MITFE-----GTLKIGDFGMASVWPVPRG-MEREGDCEEYI 733

*S. cer.* 587 MITFE-----GNLKLGFDMATHLPLEDKSFEENEGDREYI 620

Konsensus \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \*

Subdomänen -----><-----IX-----><-----X-----><-----XI----->

*P. dum.* 437 PNEILQENYDNLPKADIFSLALTLTEAGGGGGLPKNGFEWHKIRRGEL---PVLNCSGP-----AFNELI 509

*S. pur.* 476 PVEILQEEHTHLTKADIFALALTAALAGGESLPKNGDDWHIRIQGHF---PPLPHIST-----DLVDLL 547

*H. sap.* 484 ANEVLQENYTHLPKADIFALALTIVVCAAGAEPLPRNGDQWHEIRQGRIL---PRIPQVLSQ-----EFTELL 546

*X. lae.* 395 ANEILQEDYSOLPKADIFALGLTIALAAGAAPLPONEDSWHEIRKGNL---PHVPQLLTP-----VFLALL 457

*D. mel.* 433 PKEILHEDYSNLKADIFSLGITLFEAAGGGGLPKNGFEWHNLRDQKV---PILPSLSR-----DFNELI 492

*S. pom.* 734 APEVLANHLVDKP--ADIFSLGITVFEAAANIVLPDNGQSWQKURSGDLSDAPRLSSSTDNG-(19)-GLDRVV 817

*S. cer.* 621 APEVLSLCTYDY--KADIFSLGLMIVELAANVVLDPDNGNAWHKURSGDLSDAGRLLSSTDIH-(85)SLERIV 770

Konsensus \* \* \* \* \* K \* \* I \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \* \*

wee4R

Subdomänen XI----->

*P. dum.* 510 RSMHPDPRRPSAAVLHHPAL 532

*S. pur.* 548 QTMIDPDPSQRPSASALVQHPIL 560

*H. sap.* 547 KVMTHPDPERRPSAMALVKHSVL 569

*X. lae.* 458 KLLVHPDPVVRPPAASLAKNSVL 480

*D. mel.* 493 AQMMHPVDPKRPSTQSIFSHPLL 515

*S. pom.* 818 EWMLSPVPRNRPTIDQILATDEV 840

*S. cer.* 771 RWMLEPNYERPTANQILQTEEC 793

Konsensus \* \* \* \* \*

**Abbildung 19: Alignment der Kinase Domäne des *Platynereis*-Wee1 mit den Kinase Domänen der Wee1-Proteine anderer Eukaryoten.** Ausgehend vom *Platynereis dumerilii* Wee1-Protein wurden alle identischen Aminosäuren (AS) weiß auf schwarz und alle ähnlichen AS schwarz auf grau hervorgehoben (2.11.3). In der obersten Zeile sind die 12 Kinase Subdomänen (nach Hanks und Hunter 1995) mit römischen Zahlen gekennzeichnet. Unterhalb des Alignments sind einige konservierte AS gekennzeichnet. Dabei sind die mit einem Großbuchstaben bezeichnen AS spezifisch für alle, oder zumindest eine Gruppe von Wee1-Kinasen. Die mit einem Sternchen (\*) gekennzeichneten Positionen sind auch in anderen Serin/Threonin-Proteinkinasen konserviert. Die Positionen der PCR-Primer sind durch Pfeile markiert. Das Alignment wurde über Internet mit dem Programm CLUSTAL W (2.11.3) erzeugt. Die Cyclin-Sequenzen stammen aus der EMBL- und der Swisshot-Datenbank. *D.mel.*: *Drosophila melanogaster*; *H.sap.*: *Homo sapiens*; *P.dum.*: *Platynereis dumerilii*; *S.cer.*: *Saccharomyces cerevisiae*; *S.pom.*: *Schizosaccharomyces pombe*; *S.pur.*: *Strongylocentrotus purpuratus*; *X.lae.*: *Xenopus laevis*;



Das *wee1*-Transkript umfaßt 3898 Nukleotide (EMBL-Accession No.: AJ224984, Abbildung 18). Davon entfallen 85 Nukleotide auf die 5'-UTR (untranslatierte Region, Nukleotide -85 bis -1 in Abbildung 18), 1845 Nukleotide auf den offenen Leserahmen für das Wee1-Protein (Nukleotide 1 bis 1845 in Abbildung 18) und die restlichen 1969Bp auf eine umfangreiche 3'-UTR (Nukleotide 1846 bis 3814 in Abbildung 18). Innerhalb der 3'-UTR liegen zwei Polyadenylierungssignale (AATAAA, fettgedruckt in Abbildung 18; Fitzgerald und Shenk 1981). Das vermutete Start-Codon des *Platynereis* *wee1*-Transkripts ist sehr wahrscheinlich auch das tatsächliche, *in vivo* bei der Translation verwendete Initiations-Codon: erstens stimmt die umgebende Nukleotidsequenz in 7 von 10 Positionen mit der Kozak-Konsensussequenz für eukaryotische Initiations-Codons überein (Kozak 1986, 1987, 1991); zweitens schließt ein *in frame*-Stop-Codon in 5'-Richtung vom vermuteten Start-Codon weitgehend die Möglichkeit aus, daß der offene Leserahmen fehlende 5'-Sequenzbereiche mit einschließt. Eine ausführliche Diskussion zur sicheren Identifizierung von Start-Codons bietet Kozak (1996).

Der offene Leserahmen kodiert für ein Protein aus 614 Aminosäuren und mit einem berechneten Molekulargewicht von 69kDa. Das Protein weist eine Proteinkinase-Domäne (fettgedruckt in Abbildung 18) auf, welche sich nach Hanks und Hunter (1995) in 12 Subdomänen gliedern läßt (römische Zahlen in Abbildung 19). Die ATP-Bindungsstelle der Kinase-Domäne ist in Abbildung 18 einfach und das Aktive Zentrum doppelt unterstrichen. Das *Platynereis*-Protein hat die größten Ähnlichkeiten mit Serin/Threonin-Proteinkinasen der Wee1-Subfamilie. Diese Übereinstimmung zeigt sich insbesondere im Bereich der Proteinkinase-Domäne (Abbildung 19).

Im Vergleich mit der Kinase-Domäne des Wee1-Proteins des Seeigels *Strongylocentrotus purpuratus* sind 61% der Aminosäurereste identisch. Die Proteinkinase-Domänen der Wee1-Proteine des Menschen (*Homo sapiens*, 59%), von *Xenopus laevis* (59%) und von *Drosophila melanogaster* (57%) weisen eine etwas geringere Übereinstimmung mit dem *Platynereis*-Protein auf. Auch im Vergleich mit den Wee1-Proteinen der Hefen *Schizosaccharomyces pombe* und *Saccharomyces cerevisiae* sind immerhin noch 31% bzw. 25% der Aminosäuren gleich. Die Proteinkinase-Domänen der Wee1-Proteine weisen eine große Zahl von konservierten Aminosäuren auf, von denen die meisten allerdings auch in anderen Proteinkinasen vorkommen (Abbildung 19, Sternchen in der Konsensus-Zeile). An wenigstens 12 Positionen weist das *Platynereis*-Protein jedoch Aminosäuren auf, die für die Wee1-Kinasen, oder zumindest für die Wee1-Kinasen der höheren Eukaryoten (Abbildung 19, Großbuchstaben in der Konsensus-Zeile), spezifisch sind. An diesen

Aminosäurepositionen unterscheidet sich das *Platynereis*-Protein auch eindeutig von anderen Proteinkinasen der Wee1-Proteinfamilie, wie den Myt1-Kinasen des Menschen (34%) und von *Xenopus laevis* (32%) und der mik1-Kinase der Hefe *Schizosaccharomyces pombe* (25%) (im Alignment nicht gezeigt). Anhand der Wee1-spezifischen Aminosäuresequenzen wurden auch die degenerierten Primer entworfen, welche zur Amplifizierung des PCR-Fragmentes verwendet wurden (Abbildung 19, Pfeile unterhalb des Alignments).

Auch außerhalb der Kinase-Domäne ist das *Platynereis*-Protein anderen Wee1-Proteinkinasen am ähnlichsten. Im N-terminalen Bereich sind im Vergleich mit anderen Wee1-Kinasen jeweils etwa 23% bis 30% der Aminosäuren identisch. Weiterhin enthält die Aminosäuresequenz des *Platynereis*-Proteins im N-terminalen Bereich außerhalb der Kinase-Domäne drei sogenannte PEST-Sequenzen ([www.at.emblnet.org/embnet/tools/bio/PESTfind/](http://www.at.emblnet.org/embnet/tools/bio/PESTfind/), in Abbildung 18 gestrichelt unterstrichen). PEST-Sequenzen sind proteolytische Signalsequenzen. Sie erstrecken sich über 12 oder mehr Aminosäuren und sind reich an Prolin (P), Glutaminsäure (E), Serin (S), Threonin (T) und Asparaginsäure (D) (Rogers *et al.* 1986, Rechsteiner und Rogers 1996). PEST-Sequenzen wurden in den N-terminalen Domänen aller bekannten Wee1-Proteine gefunden (Nemer und Stuebing 1996). Weiterhin enthält die Aminosäuresequenz des *Platynereis*-Proteins 13 potentielle Phosphorylierungsstellen (in Abbildung 18 umrahmt). Die PEST-Sequenzen und die Phosphorylierungsstellen spielen möglicherweise bei der Regulation der Wee1-Aktivität eine Rolle (siehe Diskussion). Die Sequenzdaten zeigen deutlich, daß es sich bei der *Platynereis*-Nukleotidsequenz um das Gen (*Pdwee1*) für eine Wee1-Proteinkinase (*Wee1<sub>pd</sub>*) handelt.

*folgende Seite:*

**Abbildung 20: PCR-Amplifizierung eines Cyclin-Fragmentes (Cyclin 1, *Pdcyc1*) aus *Platynereis*-cDNA.**

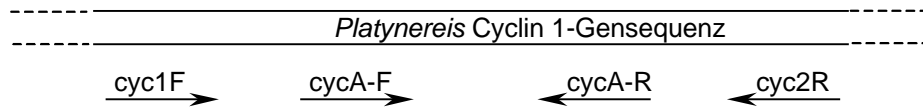
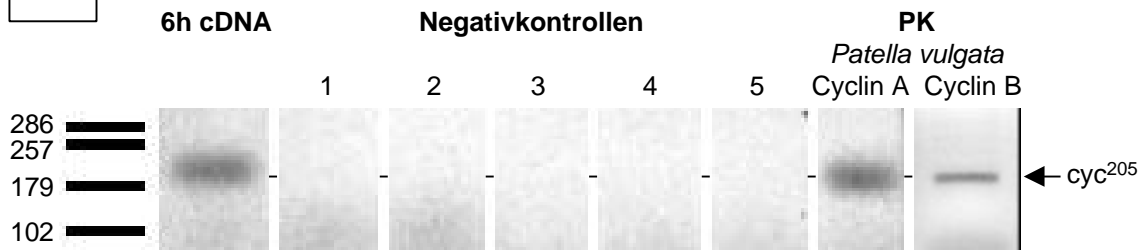
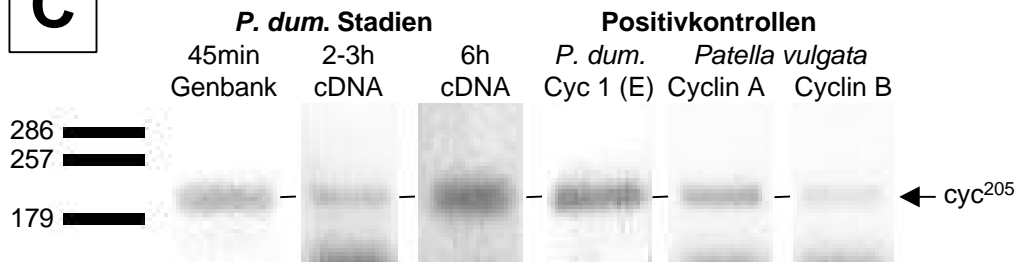
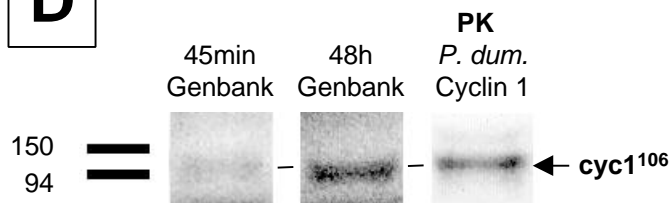
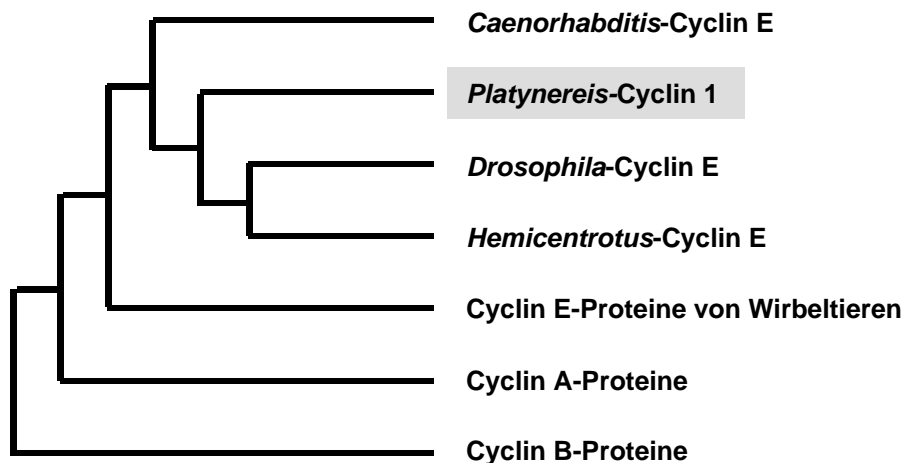
**A:** Schematische Darstellung des *Platynereis* Cyclin 1-Gens mit den Positionen der für alle Cyclin-Gene geeigneten degenerierten PCR-Primer *cyc1F* und *cyc2R* und den Positionen der für Cyclin 1 spezifischen Primer *cycA-F* und *cycA-R*.

**B:** Mit den degenerierten Primern *cyc1F* und *cyc2R* konnte aus 6h-cDNA von *Platynereis* ein 205Bp-Fragment amplifiziert werden (linke Spur). Fragmente gleicher Größe können mit diesen Primern auch aus den Genen für *Patella* Cyclin A und Cyclin B amplifiziert werden (Positivkontrollen). In keiner der Negativkontrollen (NK) ist ein solches 205Bp-Fragment zu finden. NK1: ohne cDNA-Matrize; NK2: ohne Polymerase; NK3: ohne die Primer *cyc1F* und *cyc2R*; NK3: ohne Primer *cyc2R*; NK5: ohne Primer *cyc1F*; Reaktionsbedingungen siehe Tabelle 9 auf Seite 39.

**C:** Mit den Primern *cyc1F* und *cyc2R* läßt sich ein 205Bp-Cyclin Fragment auch aus der 45min-cDNA-Bank und aus 2h- und 6h-cDNA amplifizieren (Reaktionsbedingungen wie in **B**). Als Positivkontrollen wurden die Gene für *Patella* Cyclin A und Cyclin B sowie das klonierte Fragment des *Platynereis* Cyclin 1 (**E**) mitamplifiziert. Die Negativkontrollen sind nicht gezeigt.

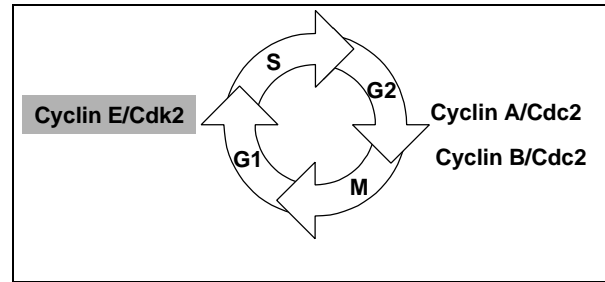
**D:** Mit den für das *Platynereis* Cyclin 1 spezifischen Primern *cycA-F* und *cycA-R* läßt sich ein 106Bp-Fragment sowohl aus der 45min-, als auch aus der 48h-cDNA-Bank amplifizieren. Als Positivkontrolle ist das gleiche Fragment auch aus dem klonierten *Platynereis* *cyc1*-Fragment amplifiziert worden.

**E:** *Platynereis* Cyclin 1 ist ein Cyclin E-Protein. Das Dendrogramm der Cyclin-Boxen verschiedener Cyclin-Gene wurde auf der Basis eines ClustalW-Alignment (2.11.3) erstellt und ist hier vereinfacht dargestellt. Das *Platynereis*-Cyclin 1 wird eindeutig mit Cyclin E-Proteinen gruppiert.

**A****Schematische Anordnung der degenerierten und spezifischen cyclin-Primer****B****PCR-Amplifikation eines 205Bp-langen Cyclin-Fragmentes (*cyc*<sup>205</sup>)****C****PCR-Amplifikation des *cyc*<sup>205</sup>-Fragmentes aus verschiedenen Stadien****D****PCR-Amplifikation eines 106Bp-Fragmentes des *P.dum* Cyclin 1 (*cyc*<sup>106</sup>)****E*****Platynereis* Cyclin 1 ist ein Cyclin E**

### 3.3.3 Amplifizierung und Klonierung eines PCR-Fragmentes des *Platynereis* Cyclin 1- (Cyclin E-) Gens

Der 5'-Primer „cyc1F“ wurde anhand des in allen Cyclin-Proteinen hoch konservierten Aminosäuremotivs MR(A/S)IL (V/I)DW<sup>7</sup> entworfen. Der 3'-Primer „cyc2R“ entspricht dem ebenfalls in allen



Cyclin-Proteinen konservierten Sequenzabschnitt KYEE(I/M)YPP<sup>7</sup>. Mit diesem Primerpaar hoffte ich in einer einzigen Reaktion Fragmente mehrerer verschiedener Cyclin-Gene amplifizieren und klonieren zu können (Vergleiche Abbildung 20A und Abbildung 23A).

Mit Hilfe dieser beiden PCR-Primer ließen sich aus den Genen für *Patella* Cyclin A und Cyclin B (van Loon *et al.* 1991, freundlicherweise überlassen von A. van Loon) jeweils Fragmente mit einer Länge von 205Bp amplifizieren (Abbildung 20B, Positivkontrollen). Fragmente gleicher Größe, und damit vermutliche Cyclin-Fragmente, ließen sich auch aus der cDNA von *Platynereis* amplifizieren (Abbildung 20B, linke Spur). Die Spezifität dieses Amplifikates wurde durch alle Negativkontrollen weiter bestätigt (Abbildung 20B, mittlere Spuren). Die *Platynereis*-Bande wurde aus dem Gel eluiert, kloniert und sequenziert (2.9.2). Insgesamt habe ich vier unabhängige Klone sequenziert (2.9.2), die alle die gleiche Sequenz enthielten. Die ermittelte Nukleotidsequenz des von mir als *Platynereis*-Cyclin 1 bezeichneten Gens (Pdcyc 1) kodiert für 65 Aminosäuren aus der Cyclin-Box (Abbildung 21).

Einen Vergleich dieser Aminosäuresequenz mit den Cyclin-Boxen anderer bekannter Cycline zeigt Abbildung 22. Im Vergleich der Cyclin-Boxen des *Platynereis*-Cyclin 1 mit Cyclin E-Proteinen sind jeweils 41-50 Aminosäuren identisch. Im Vergleich mit Cyclin A-Proteinen stimmen nur jeweils 31-41 und im Vergleich mit Cyclin B-Proteinen sogar nur 29-35 aller Aminosäuren überein. Noch geringer ist die Ähnlichkeit mit Cyclinen anderer Klassen. Darüber hinaus enthält das *Platynereis*-Cyclin 1 an 13 Positionen Cyclin E-spezifische Aminosäuren (Abbildung 22, oberste Zeile). Ein mit dem Programm „ClustalW“ erzeugtes Dendrogramm ordnet das *Platynereis*-Cyclin 1 ebenfalls eindeutig in die Klasse der Cyclin E-Proteine ein (Abbildung 20E).

<sup>7</sup> Einbuchstaben-Code der Aminosäuren nach Lehninger (1987), siehe auch Anhang 7.2

																	<u>ta atg</u>	-1
<u>atg</u>	<u>cgt</u>	<u>gca</u>	<u>ata</u>	<u>ctc</u>	<u>gtc</u>	<u>gac</u>	<u>tgg</u>	ttg	ata	gaa	gtg	tgt	<u>gaa</u>	<u>gtt</u>	<u>tac</u>	<u>cga</u>	<u>ttg</u>	54
M	R	A	I	L	V	D	W	L	I	E	V	C	E	V	Y	R	L	18
<u>cac</u>	<u>cga</u>	<u>gag</u>	acc	ttt	tat	ctg	gca	gtt	gac	ttt	gtt	gat	agg	tac	ctt	tca	cag	108
H	R	E	T	F	Y	L	A	V	D	F	V	D	R	Y	L	S	Q	36
acg	aaa	aac	atc	cag	aaa	cag	gtt	ctc	cag	tta	ata	gga	att	tca	gca	ctc	ttc	162
T	K	N	I	Q	K	Q	V	L	Q	L	I	G	I	S	A	L	F	54
<u>atc</u>	<u>gct</u>	<u>gcc</u>	<u>aag</u>	<u>tat</u>	<u>gaa</u>	<u>gaa</u>	<u>atc</u>	<u>tat</u>	<u>cca</u>	<u>ccc</u>	<u>ggt</u>	<u>ta</u>						200
I	A	A	K	Y	E	E	I	Y	P	P								65

**Abbildung 21: Die cDNA- und Aminosäuresequenz des *Platynereis*-Cyclin 1 PCR-Fragmentes.** Die dargestellte DNA-Sequenz entspricht dem inklonierten *cyc1*<sup>205</sup>-Fragment des Plasmides pUC18<sup>cyc205-5</sup> (EMBL-Acc.No.: AJ224983). Die Positionen der zur Amplifizierung verwendeten degenerierten PCR-Primer *cyc1*-F (5'-taa tgc atg cgn gcn ath ctn rth gay tgg-3') und *cyc2*-R (5'-taa ccc ggg kgg rta nat ytc ytc rta ytt-3') sind wellig unterstrichen. Die degenerierten Primersequenzen wurden an ihren jeweiligen 5'-Enden um einige Nucleotide erweitert (fettgedruckt), um Restriktionsschnittstellen anzufügen (*Sph* I=gcatgc für *cyc1*-F; *Xma* I=ccggg für *cyc2*-R). Diese kurzen artefiziellen Sequenzen (Nucleotide -5 bis -1 bzw. 196 bis 200, fettgedruckt) flankieren deshalb die eigentliche Cyclin-Sequenz (Nucleotide 1-195) an beiden Enden. Aufgrund eines Fehlers bei der Primersynthese (durch die Firma Life Technology) fehlte jedoch jeweils ein Nucleotid in den Erkennungssequenzen (hochgestellt geschrieben). Anhand der Nucleotidsequenz wurden zwei spezifische PCR-Primer entworfen (*cycA*-F und *cycA*-R, beide unterstrichen). Die Nummern am rechten Rand geben jeweils die Nucleotidpositionen an. Das erste Aminosäure-kodierende Triplet definiert dabei die Position 1. Die etwas eingerückten kursiven Nummern geben die Aminosäurepositionen an.

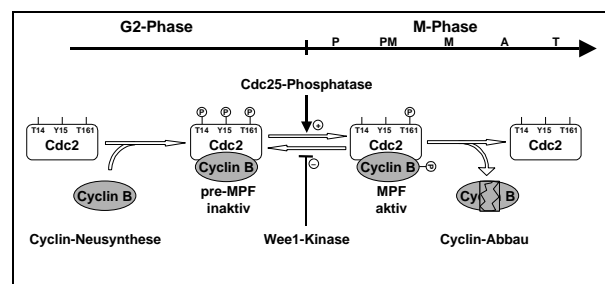
Fragmente von 205Bp-Länge ließen sich sowohl in der 45min-cDNA-Bank, als auch in 2-3h- bzw. 6h-cDNA von *Platynereis* nachweisen (Abbildung 20C). Es ist allerdings möglich, daß es sich bei diesen Fragmenten nicht, oder nicht ausschließlich um *Platynereis* Cyclin 1 handelt. Denn obwohl alle von mir sequenzierten Klone das *Platynereis*-Cyclin 1 enthielten, waren die verwendeten degenerierten PCR-Primer *cyc1*F und *cyc2*R prinzipiell geeignet, sowohl Cyclin A als auch Cyclin B und Cyclin E-Gene zu amplifizieren (Abbildung 20C, Positivkontrollen). Deshalb habe ich zwei für das *Platynereis*-Cyclin 1 spezifische PCR-Primer entworfen (*cycA*-F, *cycA*-R, Abbildung 21). Die Positionen von *cycA*-F und *cycA*-R innerhalb der Cyclin 1-Sequenz sind zusammen mit den Positionen der degenerierten Primer *cyc1*F und *cyc2*R in Abbildung 20A schematisch dargestellt. Mit diesen Primern ist es mir gelungen ein *Platynereis*-Cyclin 1-Fragment zumindest aus der 45min- und der 48h-cDNA-Bank zu amplifizieren. Aus einer dieser cDNA-Banken soll in Zukunft das vollständige Gen des *Platynereis*-Cyclin 1 isoliert werden.

Cyclin E spezifische Aminosäuren		C	v	h	r	ry	D		k	i	i	l	f	a
<i>Platynereis dumerilii</i>	cyc1	MR	AI	LD	WL	IE	VC	EV	YR	LH	RE	TF	YLA	VD
<i>Hemicentrotus pulcherrimus</i>	E	MR	AI	LD	WL	IE	VC	EV	YR	LH	RE	TF	YLA	VD
<i>Drosophila melanogaster</i>	E1	MR	AI	LD	WL	IE	VC	EV	YR	LH	RE	TF	YLA	VD
<i>Danio rerio</i>	E	MR	AI	LD	WL	IE	VC	EV	YR	LH	RE	TF	YLA	VD
<i>Gallus gallus</i>	E	MR	AI	LD	WL	IE	VC	EV	YR	LH	RE	TF	YLA	VD
<i>Xenopus laevis</i>	E1	MR	AI	LD	WL	IE	VC	EV	YR	LH	RE	TF	YLA	VD
<i>Homo sapiens</i>	E2	MR	AI	LD	WL	IE	VC	EV	YR	LH	RE	TF	YLA	VD
<i>Caenorhabditis elegans</i>	E	KR	RI	LD	WL	IE	VC	EV	YR	LH	RE	TF	YLA	VD
<i>Helobdella triserialis</i>	A	MR	SI	LD	WL	IE	VC	EV	YR	LH	RE	TF	YLA	VD
<i>Hemicentrotus pulcherrimus</i>	A	MR	CI	LD	WL	IE	VC	EV	YR	LH	RE	TF	YLA	VD
<i>Patella vulgata</i>	A	MR	SI	LD	WL	IE	VC	EV	YR	LH	RE	TF	YLA	VD
<i>Drosophila melanogaster</i>	A	MR	SI	LD	WL	IE	VC	EV	YR	LH	RE	TF	YLA	VD
<i>Carassius spec.</i>	A	MR	VI	LD	WL	IE	VC	EV	YR	LH	RE	TF	YLA	VD
<i>Xenopus laevis</i>	A1	MR	SI	LD	WL	IE	VC	EV	YR	LH	RE	TF	YLA	VD
<i>Homo sapiens</i>	A	MR	AI	LD	WL	IE	VC	EV	YR	LH	RE	TF	YLA	VD
<i>Gallus gallus</i>	A	MR	AI	LD	WL	IE	VC	EV	YR	LH	RE	TF	YLA	VD
<i>Caenorhabditis elegans</i>	A	MR	SI	LD	WL	IE	VC	EV	YR	LH	RE	TF	YLA	VD
<i>Chlorohydra viridissima</i>	A	MR	AI	LD	WL	IE	VC	EV	YR	LH	RE	TF	YLA	VD
<i>Drosophila melanogaster</i>	B	MR	AV	LD	WL	IE	VC	EV	YR	LH	RE	TF	YLA	VD
<i>Danio rerio</i>	B	MR	AI	LD	WL	IE	VC	EV	YR	LH	RE	TF	YLA	VD
<i>Caenorhabditis elegans</i>	B	MR	RI	LD	WL	IE	VC	EV	YR	LH	RE	TF	YLA	VD
<i>Chlorohydra viridissima</i>	B	MR	SI	LD	WL	IE	VC	EV	YR	LH	RE	TF	YLA	VD
<i>Patella vulgata</i>	B	MR	SI	LD	WL	IE	VC	EV	YR	LH	RE	TF	YLA	VD
<i>Homo sapiens</i>	B1	MR	AI	LD	WL	IE	VC	EV	YR	LH	RE	TF	YLA	VD
<i>Xenopus laevis</i>	B1	MR	AI	LD	WL	IE	VC	EV	YR	LH	RE	TF	YLA	VD
<i>Sphaerechinus granularis</i>	B	MR	SI	LD	WL	IE	VC	EV	YR	LH	RE	TF	YLA	VD
<i>Helobdella triserialis</i>	B3	MR	AI	LD	WL	IE	VC	EV	YR	LH	RE	TF	YLA	VD
<i>Gallus gallus</i>	B3	MR	AI	LD	WL	IE	VC	EV	YR	LH	RE	TF	YLA	VD
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	CLB1	NR	DI	LD	WL	IE	VC	EV	YR	LH	RE	TF	YLA	VD
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	CDC13	MR	CI	LD	WL	IE	VC	EV	YR	LH	RE	TF	YLA	VD
Konsensus (alle)		mR	iL	dWl	v	l	et	l	Dr			lQl	G	A K EE P

**Abbildung 22: Alignment der Cyclin Boxen bekannter Cyclin A, B und E-Proteine mit der Aminosäuresequenz des *Platynereis*-Cyclin 1.** Ausgehend von der *Platynereis*-Sequenz wurden alle identischen Aminosäuren (AS) weiß auf schwarz und alle ähnlichen AS schwarz auf grau hervorgehoben (2.11.3). Großbuchstaben kennzeichnen in der obersten Zeile solche AS, die ausschließlich und auch in allen Cyclin E-Proteinen vorkommen. Kleinbuchstaben hingegen bezeichnen AS, die in fast allen Cyclin E-Proteinen zu finden sind und nur in Einzelfällen auch in Cyclinen anderer Klassen. In der untersten Zeile des Alignments ist die Konsensussequenz aller Cyclin Boxen aufgeführt. Das Alignment wurde über Internet mit dem Programm CLUSTAL W (2.11.3) erzeugt. Die Cyclin-Sequenzen stammen aus der EMBL- und der Swissprot-Datenbank.

### 3.3.4 Amplifizierung eines PCR-Fragmentes des *Platynereis* Cyclin B-Gens

Da ich mit dem Primerpaar cyc1F und cyc2R nicht, wie erhofft, Fragmente unterschiedlicher Cyclin-Gene amplifizieren und klonieren konnte, habe ich anhand der für Cyclin B-Proteine spezifischen



Aminosäuresequenz HFLRR(N/A)SK<sup>8</sup> einen weiteren degenerierten 3'-PCR-Primer (cyc3R) entworfen. Die Position von cyc3R innerhalb der Cyclin B-Sequenz ist zusammen mit den Positionen der Primer cyc1F und cyc2R in Abbildung 23A schematisch dargestellt. Mit dem Primerpaar cyc1F und cyc3R konnte ich aus embryonaler cDNA (6h) ein Fragment von etwa 330Bp amplifizieren (Abbildung 23B). In keiner der Negativkontrollen war

<sup>8</sup> Einbuchstaben-Code der Aminosäuren nach Lehninger (1987), siehe auch Anhang 7.2

ein entsprechendes Fragment zu finden. Um zu prüfen, ob es sich bei dem amplifizierten Fragment tatsächlich um ein Cyclin-Fragment handelt und nicht um eine unspezifisch amplifizierte Nukleotidsequenz wurde das 330Bp-Fragment in einer Kontroll-PCR selbst als DNA-Matrize eingesetzt. Erwartungsgemäß konnte das Fragment mit dem Primerpaar cyc1F und cyc3R weiter amplifiziert werden (Abbildung 23C, linke Spur). Darüber hinaus konnte aber auch mit dem Primer cyc1F in Kombination mit dem internen (*nested*) Primer cyc2R ein etwa 205Bp langes Fragment gewonnen werden (Abbildung 23C, rechte Spur). Dieses Fragment wäre nicht zu erwarten gewesen, wenn das 330Bp-Fragment kein Cyclin wäre. Die Klonierung und Sequenzierung dieses Fragmentes, und damit seine sichere Identifizierung als Cyclin B, steht allerdings noch aus.

Das 330Bp-Fragment konnte sowohl aus cDNA unbesamter Oocyten, als auch aus cDNA von 45min, 2-3h und 6h alten Embryonen amplifiziert werden (Abbildung 23D). Das vermutliche Cyclin B-Transkript ist also bereits in der unbesamten Oocyte vorhanden und steht den Blastomeren auch später zur Verfügung. Es bleibt jedoch offen, ob durchgehend das maternale Transkript amplifiziert wurde, oder ob während der späteren Stadien bereits zygotische Transkripte hinzugekommen sind. Diese Frage kann in Zukunft unter Verwendung von Transkriptionshemmern beantwortet werden.

*folgende Seite:*

**Abbildung 23: PCR-Amplifizierung von Cyclin B- und Cdc25- (String-) Fragmenten.**

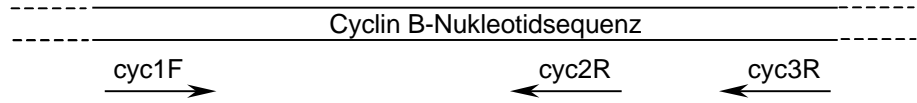
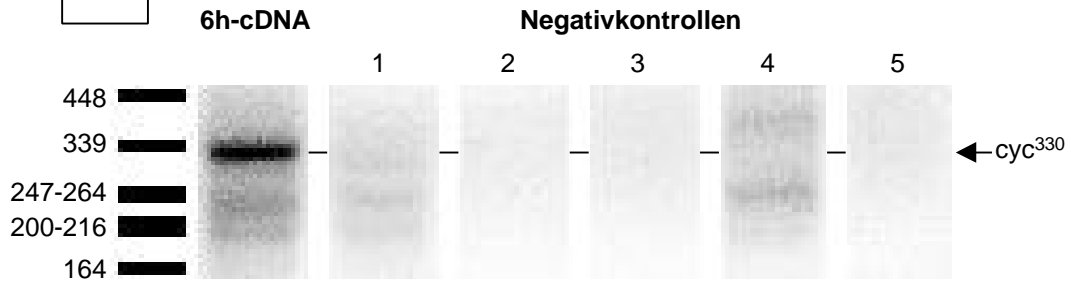
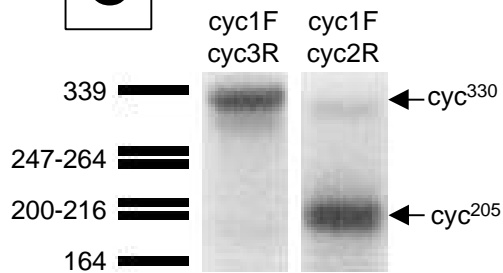
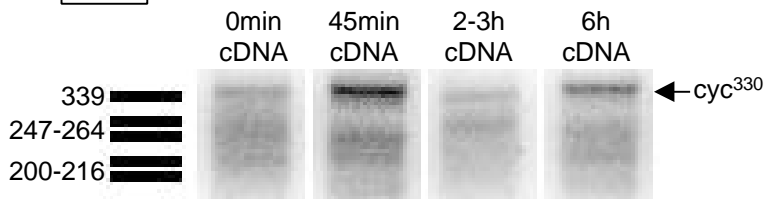
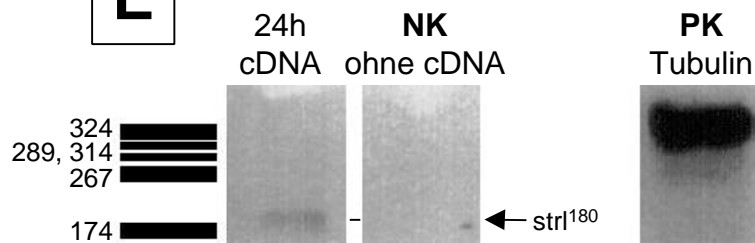
**A:** Schematische Darstellung eines Cyclin B-Gens mit den Positionen der verwendeten degenerierten PCR-Primer.

**B:** Mit den Primern cyc1F und cyc3R konnte aus 6h-cDNA von *Platynereis* ein 330Bp-Fragment amplifiziert werden (linke Spur), bei dem es sich vermutlich um Cyclin B handelt (Reaktionsbedingungen siehe Tabelle 10 auf Seite 39). Dieses Fragment taucht in keiner der Negativkontrollen (NK) auf. NK1: ohne cDNA-Matrize; NK2: ohne Polymerase; NK3: ohne die Primer cyc1F und cyc3R; NK4: ohne Primer cyc3R; NK5: ohne Primer cyc1F;

**C:** Kontroll-PCR mit dem 330Bp-Fragment aus **B** als DNA-Matrize. Sowohl das Primerpaar cyc1F/cyc3R, als auch cyc1F in Kombination mit dem internen (*nested*) Primer cyc2R führten zur Amplifizierung von PCR-Fragmenten (Reaktionsbedingungen siehe Tabelle 11 auf Seite 40).

**D:** Das 330Bp-Fragment läßt sich aus cDNA verschiedener Entwicklungsstadien amplifizieren (Reaktionsbedingungen wie in **B**).

**E:** Mit den Primern str11F und str13R konnte aus 24h-cDNA von *Platynereis* ein 180Bp-Fragment amplifiziert werden (linke Spur), bei dem es sich vermutlich um cdc25 handelt (Reaktionsbedingungen siehe Tabelle 12 auf Seite 40). Dieses Fragment taucht nicht in der Negativkontrolle (ohne DNA-Matrize) auf. Um die Qualität der eingesetzten cDNA zu prüfen wurde als Positivkontrolle auch ein Tubulin-Fragment („Haushaltsgen“) mitamplifiziert.

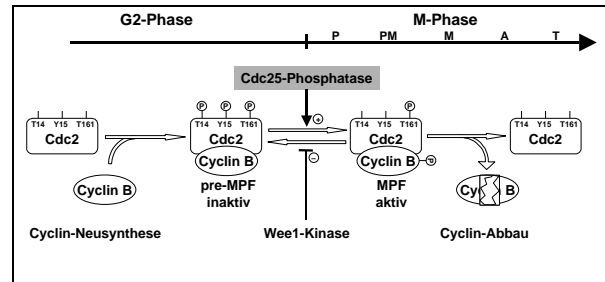
**A****Schematische Anordnung der degenerierten Cyclin-Primer****B****PCR-Amplifikation eines 330Bp-langen Cyclin B (?) Fragmentes (*cyc*<sup>330</sup>)****C****Reamplifizierung des *cyc*<sup>330</sup>-Fragmentes mit verschiedenen Primerpaaren****D****Nachweis des *cyc*<sup>330</sup>-Fragmentes in verschiedenen -Entwicklungsstadien****E****PCR-Amplifikation eines 180Bp-langen *cdc25/string* (?) Fragmentes (*str1*<sup>180</sup>)**



### 3.3.5 Amplifizierung eines PCR-Fragmentes des *Platynereis* cdc25- (string-) Gens

Von Dr. van Loon aus Utrecht erhielt ich zwei Cdc25-spezifische degenerierte Primer (str11F, str13R, benannt nach dem *Drosophila* Cdc25-Homolog *string*). Auch mit diesem Primerpaar konnte ich in einem

ersten Versuch aus *Platynereis*-cDNA ein Fragment von 180Bp amplifizieren (Abbildung 23E). Dieses Fragment soll zu einem späteren Zeitpunkt ebenfalls kloniert werden.



## 4 Diskussion

### 4.1 Determination des D-Quadranten und der dorsoventralen Körperachse bei *Aplysia californica*

#### 4.1.1 Autonome versus induktive Determination

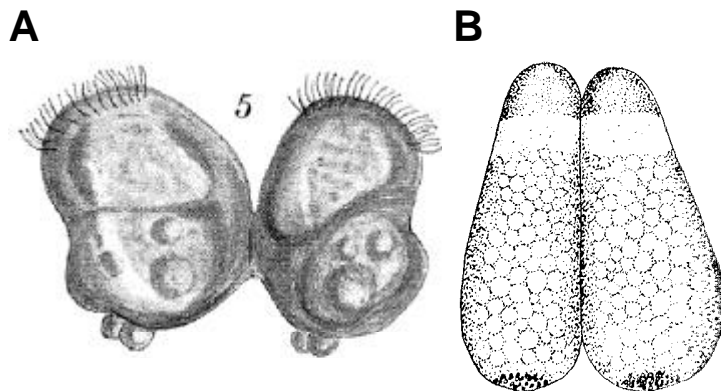
Die Zygote der zu den Opisthobranchiern gehörenden Meeresschnecke *Aplysia* teilt sich extrem inäqual. Nach der zweiten, äqualen Furchungsteilung besteht der Keim von *Aplysia* deshalb aus zwei großen und zwei kleineren Blastomeren. Im Gegensatz zu *Platynereis* und den meisten anderen inäqual furchenden Spiraliern ist bei *Aplysia* jedoch nicht die größte, sondern eine der kleineren Blastomeren des 4-Zellstadiums die Vorläuferzelle des Mesentoblasten 4d (Carazzi 1905/6). Freeman und Lundelius (1992) nehmen allein aufgrund der inäqualen ersten Furchungsteilung und im Analogieschluß zu anderen inäqual furchenden Spiraliern an, daß bei *Aplysia* der D-Quadrant, wie bei anderen Spiraliern mit inäqualer erster Furchung (Einleitung), bereits im 4-Zellstadium determiniert ist. Bei dieser Auffassung wird aber implizit angenommen, daß morphogenetische Faktoren bei der zweiten Furchungsteilung spezifisch in die zukünftige D-Blastomere verlagert werden und diese demzufolge determinieren. Dieser Prozeß der autonomen Determinierung<sup>9</sup> des D-Quadranten ist bei inäqual furchenden Spiraliern eng mit der quantitativ höheren Ausstattung der D-Zelle mit dotterfreiem Zytoplasma verknüpft. Meine volumetrischen Daten bestätigen diese Annahmen für *Aplysia* aber nur zum Teil.

Ich konnte zeigen, daß bei der ersten Furchungsteilung von *Aplysia californica* zwei in ihrem Volumen und in ihrer zytoplasmatischen Zusammensetzung unterschiedliche Blastomeren entstehen (3.1.1, Tabelle 16). Die kleinere CD-Blastomere besteht fast ausschließlich (86%), die AB-Blastomere hingegen nur etwa zur Hälfte (47%) aus dotterfreiem Zytoplasma. Die Unterschiede in der zytoplasmatischen Zusammensetzung dieser beiden Blastomeren werden erreicht, indem der CD-Blastomere bei der ersten Furchungsteilung im Verhältnis zu ihrem Volumen (27% des Eivolumens) überproportional viel dotterfreies Zytoplasma zugeteilt wird (40% des gesamten dotterfreien Zytoplasmas). Frühe Experimente von Peltera (1940) legen nahe, daß die

---

<sup>9</sup> Die autonome Determinierung beruht ausschließlich auf der asymmetrischen Verteilung maternaler zytoplasmatischer Faktoren, ist also vollkommen unabhängig von jeglichen Zell-Zell-Interaktionen.

asymmetrische Plasmaaufteilung bei der ersten Furchungsteilung für die normale Musterbildung im Keim notwendig ist. Peltera zentrifugierte Keime von *Aplysia limacina* während der ersten Furchungsteilung und veränderte so die Furchungsgeometrie. Einige der zentrifugierten Keime entwickelten sich zu Veligerlarven deren dorsoventrale Körperachse dupliziert war (Abbildung 24A).



**Abbildung 24: Zentrifugation während der ersten Furchungsteilung kann bei *Aplysia limacina* zu einer Duplikation der dorsoventralen Körperachse und zur Bildung von „Janus-Monstern“ führen.** Diese Zeichnungen aus der Arbeit von Peltera (1940) zeigen Keime von *Aplysia limacina*, die während der ersten Furchungsteilung zentrifugiert wurden. Weitere Erläuterungen im Text.

Vermutlich entstanden diese „Doppelmonster“ aus Keimen, deren erste Teilungsspindel als Folge der Zentrifugation die Zygote senkrecht zur Plasmaschichtung äqual teilten, so daß zwei gleich große Blastomeren mit gleichen Portionen an dotterfreiem Zytoplasma entstanden (Abbildung 24B). Als Folge davon wurden dann wahrscheinlich zwei D-Quadranten und damit auch zwei dorsoventrale Körperachsen im Keim determiniert. Peltera konnte aber die Entwicklung dieser experimentell veränderten Keime nicht individuell bis zur Veligerlarve verfolgen, so daß sich seine Resultate nicht zweifelsfrei interpretieren lassen. Das Experiment von Peltera (1940) steht aber zumindest nicht im Widerspruch mit der Annahme von Freeman und Lundelius (1992), daß morphogenetische Faktoren aus der Oocyte asymmetrisch auf die Zellen verteilt werden und so die CD-Blastomere als Vorläuferzelle des D-Quadranten und damit auch des Mesentoblasten spezifizieren. Meine eigenen volumetrischen Daten zeigen jedenfalls sehr deutlich, daß die erste Furchungsteilung von *Aplysia californica* zu einer zytoplasmatischen Diversifizierung der Blastomeren führt.

Freeman und Lundelius postulieren, daß der D-Quadrant von *Aplysia* bereits im 4-Zellstadium determiniert ist. Das würde aber bedeuten, daß die morphogenetischen Faktoren aus der CD-Blastomere auch bei der zweiten Furchung asymmetrisch aufgeteilt werden, was qualitative Unterschiede zwischen den Blastomeren C und D hervorrufen

würde. Meine Untersuchungen ergaben jedoch keine Anhaltspunkte, daß sich die D-Blastomere von *Aplysia* bereits im 4-Zellstadium quantitativ und qualitativ von der C-Blastomere unterscheidet. Bei der zweiten Furchungsteilung von *Aplysia* werden offenbar die Ressourcen von CD gleichmäßig auf beide Tochterzellen - C und D - aufgeteilt<sup>10</sup> (3.1.1, Tabelle 16). Ich konnte bei *Aplysia* auch keine Unterschiede im Furchungsverhalten der Blastomeren C und D erkennen (3.1.2, Abbildung 6D, E), wie es für inäqual furchende Spiraler sonst typisch ist: „üblicherweise“ teilt sich die D-Makromere bei der dritten und auch den folgenden Furchungen zeitlich vor den Blastomeren A, B und C und schnürt bei der vierten und sechsten Furchung die besonders großen Mikromeren 2d (Somatoblast) und 4d (Mesentoblast) ab (z.B. Dorresteijn 1990 für *Platynereis*). Die symmetrische Aufteilung des dotterfreien Zytoplasmas bei der zweiten Furchungsteilung von CD schließt natürlich nicht von vorne herein aus, daß morphogenetische Faktoren innerhalb dieses Plasmas dennoch asymmetrisch verteilt werden könnten.

Das Furchungsgeschehen bei *Aplysia* läßt sich aber auch noch anders interpretieren. So gehen van den Biggelaar und Haszprunar (1996) davon aus, daß die Blastomeren C und D bei ihrer Entstehung noch das gleiche Entwicklungspotential haben, so daß erst zu einem späteren Zeitpunkt der definitive D-Quadrant und damit die Lage der dorsoventralen Körperachse determiniert wird. Diese Autoren postulieren deshalb, aus Analogie zu der Situation bei äqual furchenden Spiraliern (Einleitung), bei *Aplysia* eine induktive Determination des D-Quadranten während des Intervalls zwischen der fünften und sechsten Furchungsteilung. Auch beim Embryo von *Aplysia* läßt sich nämlich nach der fünften Furchungsteilung eine längere „Ruhephase“ (*resting stage*) beobachten. Eine der beiden kleineren Makromeren nimmt dann eine zentrale Position im Keim ein und erhält so Kontakt mit den am animalen Pol liegenden Mikromeren (van den Biggelaar 1996a). Van den Biggelaar und Haszprunar nehmen an, daß diese Makromere nun aufgrund der Interaktion mit den Mikromeren als 3D-Makromere determiniert wird. Bei der sechsten Furchungsteilung verhält sich die 3D-Makromere dann anders als die 3C-Makromere, indem sie sich früher teilt und den verhältnismäßig großen Mesentoblasten 4d abschnürt. Bei dem Keim eines anderen Opisthobranchiers, *Haminoea callidegenita*, dessen Keim

---

<sup>10</sup> Bei individuellen Keimen wurden minimale Größenunterschiede zwischen den Blastomeren C und D gemessen. Dabei war bei einem Keim C und bei dem nächsten Keim D die etwas größere Zelle, so daß sich die Unterschiede im Mittel ausgeglichen haben.

sich allerdings äqual furcht, konnte Boring (1989) die induktive Wechselwirkung, die zur Determination des D-Quadranten führt, experimentell belegen.

Der Furchungsmodus von *Aplysia californica* weist sowohl Übereinstimmungen mit äqual furchenden Spiraliern, als auch mit inäqual furchenden Spiraliern auf (Tabelle 20). Letztendlich kann nur experimentell geklärt werden, ob der D-Quadrant und damit die dorso-ventrale Körperachse bei *Aplysia* bereits im 4-Zellstadium zellautonom, oder erst nach der fünften Furchungsteilung aufgrund eines induktiven Signals determiniert wird. Eine Möglichkeit bestünde darin die Zentrifugationsexperimente von Peltera (1940) zu wiederholen. So ließe sich verifizieren, ob als Folge der Gleichverteilung der zytoplasmatischen Bestandteile bei der ersten Furchungsteilung tatsächlich zwei D-Quadranten innerhalb eines Keimes determiniert werden und ob aus solchen Keimen die von Peltera beschriebenen Doppelmonster entstehen. Damit wäre nachgewiesen, daß unter normalen Umständen die Potenz zur Ausprägung des für den D-Quadranten spezifischen Entwicklungsschicksals bei der ersten Furchungsteilung nur auf eine, nämlich die CD-Blastomere weitergegeben würde. Bei vielen anderen inäqual furchenden Spiraliern wurde aus solchen Zentrifugationsexperimenten sogar geschlossen, daß unter normalen Umständen der definitive D-Quadrant bereits nach der zweiten Furchung, also im 4-Zellstadium determiniert ist (für *Platynereis* siehe Dorresteyn *et al.* 1987, Dorresteyn und Eich 1991). Selbst wenn unter normalen Umständen nur eine der Blastomeren im 4-Zellstadium die Entwicklungspotenz des D-Quadranten besitzt, bestünde immer noch die Möglichkeit, daß zusätzlich ein induktives Signal zu einem späteren Entwicklungszeitpunkt notwendig ist, um diese Entwicklungspotenz auch tatsächlich zu entfalten. Eine derartige induktive Interaktion zwischen den Mikromeren und einer oder mehrerer Makromeren kann nur durch Deletion der Mikromeren nachgewiesen werden (Boring 1989 für einen Opisthobranchier). Solche Deletionsexperimente stehen bei *Aplysia* noch aus. Sie sind allerdings wegen der geringen Größe des Keimes nur schwer durchzuführen. Die sorgfältige und detaillierte Beobachtung der Normalentwicklung, wie sie in dieser Arbeit begonnen wurde, wird möglicherweise der einzige Weg bleiben, frühe Indizien für das Determinationsgeschehen des D-Quadranten bei *Aplysia* zu erhalten. Beobachtbare Unterschiede im Furchungsverhalten der Blastomeren (Volumen, zytoplasmatische Zusammensetzung, Zellzyklusdauer) belegen, sofern sie mit bestimmten Entwicklungsschicksalen korrelieren, eine bestehende Spezifizierung der Blastomeren und liefern so Hinweise auf den Determinationsprozeß. Meine volumetrischen Daten zeigen,

daß mit der ersten inäqualen Furchungsteilung die CD-Blastomere von *Aplysia* als Vorläuferzelle des D-Quadranten spezifiziert und so eine Vorauswahl getroffen wird. Nicht mehr alle vier, sondern nur noch die zwei der CD-Zelle entstammenden Quadranten kommen als potentielle D-Quadranten in Frage.

**Tabelle 20: Vergleich der frühen Furchungscharakteristika von *Aplysia californica* mit äqual- und inäqual furchenden Spiraliern.** Alle volumetrischen Zahlenangaben sind in Prozent angegeben und stammen für *Aplysia californica* aus dieser Arbeit, für *Platynereis dumerilii* aus Dorresteijn (1990) und für äqual furchenden Spiraliere aus van den Biggelaar und Guerrier (1983). Übereinstimmungen zwischen *Aplysia* einerseits und äqual bzw. inäqual furchenden Spiraliern andererseits sind jeweils fett hervorgehoben.

	äqual furchende Spiralier <sup>1)</sup>	<i>Aplysia californica</i>	inäqual furchende Spiralier ( <i>P. dumerilii</i> )
<b>1. FURCHUNGSTEILUNG</b>	<b>äqual</b>	<b>inäqual</b>	<b>inäqual</b>
Blastomerenvolumen	AB = CD	AB (73) > CD (27)	CD (73) > AB (27)
Plasmaaufteilung	symmetrisch	<b>asymmetrisch</b>	<b>asymmetrisch</b>
Anteil am gesamten dotterfreien Plasma	AB = CD	AB (60) > CD (40)	CD (78) > AB (22)
Anteil des dotterfreien Plasmas am Zellvolumen	AB = CD	<b>CD (86) &gt; AB (47)</b>	<b>CD (38) &gt; AB (28)</b>
<b>2. FURCHUNGSTEILUNG</b>	<b>äqual in AB + CD</b>	<b>äqual in AB + CD</b>	inäqual in CD
Blastomerenvolumen	A = B = C = D	A, B <sup>2)</sup> (34-40) > C=D (14)	D (51) > C (22) > A=B (14)
Plasmaaufteilung	<b>symmetrisch</b>	<b>symmetrisch</b>	asymmetrisch
Anteil am gesamten dotterfreien Plasma	A = B = C = D	A, B <sup>2)</sup> (29-31) > C=D (14)	D (60) > C (18) > A=B (11)
Anteil des dotterfreien Plasmas am Zellvolumen	A = B = C = D	<b>C=D (88) &gt; A, B<sup>2)</sup>(42-45)</b>	D (41) > C = A=B (27-30)
Teilungsabfolge	AB synchron mit CD	<b>CD vor AB</b>	<b>CD vor AB</b>
<b>ANDERE KENNZEICHEN</b>			
„Resting stage“ <sup>3)</sup>	<b>ja</b> (24-64 Zellstadium)	<b>ja</b> (24-Zellstadium)	nein <sup>4)</sup>
Teilungsvorsprung von D gegenüber C	ab der 6. Furchung	ab der 5. Furchung <sup>5)</sup>	ab der 3. Furchung
D-Quadrant Determination	nach 5. Furchung durch Induktion	(?) (?)	nach 2. Furchung durch Determinanten

<sup>1)</sup> Die Blastomerenbezeichnungen lassen sich bei äqual furchenden Spiraliern erst nach der fünften Furchungsteilung retrospektiv benennen; <sup>2)</sup> Volumenrelationen von A und B unsicher, da nur ein einzelnes 4-Zellstadium vermessen wurde; <sup>3)</sup> viele äqual furchende Spiraliere weisen ein sogenanntes „resting stage“ auf, während dessen die Furchungen für einen längeren Zeitraum unterbrochen sind; <sup>4)</sup> auch bei *Platynereis* verlängern sich aber die Zellzyklen der meisten Blastomeren nach der fünften Furchung dramatisch; <sup>5)</sup> laut Carazzi (1905/6);

#### 4.1.2 Zellzyklusregulatoren als mögliche Determinanten

Bei *Aplysia* weisen die Blastomeren im 2-Zellstadium eine unterschiedliche plasmatische Zusammensetzung auf und sind dadurch auf ungleiche Entwicklungsschicksale spezifiziert. Ähnlich wie bei *Aplysia californica* erhält auch bei dem inäqual furchenden Keim des Anneliden *Platynereis dumerilii* die CD-Blastomere (73% des Eivolumens) überproportional viel dotterfreies Zytoplasma zugeteilt (80% des gesamten dotterfreien Zytoplasmas) (Dorresteijn 1990). Dennoch besteht ein wichtiger Unterschied zwischen der Plasmaaufteilung bei *Aplysia* und bei *Platynereis*. Anders als bei *Platynereis* enthält die CD-Blastomere von *Aplysia* aufgrund ihrer geringeren Größe absolut gesehen weniger (40%) des gesamten dotterfreien Zytoplasmas als die AB-Blastomere (60%). Dorresteijn und Eich (1991) postulieren für *Platynereis*, daß die CD-Blastomere aufgrund der absolut größeren Menge an dotterfreiem Zytoplasma und der darin enthaltenen „Determinanten“ als Vorläuferzelle des D-Quadranten spezifiziert wird. Bei *Aplysia* hingegen scheint vielmehr das Mengenverhältnis von dotterfreiem Zytoplasma zu Dotter bzw. zum Blastomerenvolumen für die Spezifizierung der CD-Blastomere kritisch zu sein. Möglicherweise besteht die wesentliche spezifizierende Wirkung der ersten Furchungsteilung darin, zunächst den Zellzyklus von CD gegenüber dem von AB zu beschleunigen. Sowohl bei *Aplysia* (3.1.2, Abbildung 6B, C) als auch bei *Platynereis* (Dorresteijn 1990, Heimann 1994) teilt sich nämlich die CD-Blastomere stets vor der AB-Blastomere. Die Zellzyklusdauer wird dabei von mehreren Faktoren bestimmt. Einmal kann der Dotter, wenn er in großen Mengen vorliegt und bei der Teilung durchschnürt werden muß, die Furchung mechanisch hemmen. Bei *Aplysia* ist von der furchungshemmenden Wirkung des Dotters ausschließlich die AB-Blastomere betroffen, während bei *Platynereis* die Blastomeren AB und CD mit 71% bzw. 62% ähnliche Mengen an Dotter enthalten. Weiterhin können extreme Unterschiede im Blastomerenvolumen zu Zellzyklusasynchronien führen, weil in der jeweils größeren Blastomere mehr Zeit für die Synthese- und Polymerisation der Filamente beim Aufbau der Teilungsspindel und des kontraktiven Ringes aufgewendet werden muß. Die Volumenproportionen zwischen den Blastomeren AB und CD sind bei *Aplysia* und *Platynereis* genau umgekehrt, so daß einmal AB und das andere mal CD einen umfangreicheren Teilungsapparat aufbauen muß. Eine reiche Ausstattung mit dotterfreiem Zytoplasma scheint eine rasche Proliferation zu begünstigen (Dorresteijn 1990, Schneider *et al.* 1992, Luetjens und Dorresteijn 1994), möglicherweise indem die Synthesekapazität der Blastomeren für Proteine des

Teilungsapparates und der Zellzykluskontrolle (z.B. Cycline) erhöht wird. Das dotterfreie Zytoplasma enthält nämlich große Mengen an Ribosomen (Dorresteyn 1990). Bei *Platynereis* wird der negative Einfluß des großen Volumens auf die Zellzyklusdauer von CD durch den im Vergleich mit AB etwas geringeren Dottergehalt und den absolut höheren Anteil an dotterfreiem Zytoplasma überkompensiert. Bei *Aplysia* hingegen addieren sich in der AB-Blastomere die hemmenden Wirkungen des Dotters und des größeren Volumens, wohingegen die kleinere und nahezu dotterfreie CD-Zelle auch mit einem geringeren Anteil des dotterfreien Zytoplasmas den Zellzyklus in kürzerer Zeit durchlaufen kann.

Nach der zweiten Furchungsteilung konnte ich zwischen den beiden Tochterzellen der CD-Blastomere keine signifikanten Unterschiede im Volumen und in der Zellzyklusdauer nachweisen. Es ergaben sich also keine Hinweise für eine Spezifizierung oder sogar Determinierung des D-Quadranten im 4-Zellstadium. Dennoch entwickelt sich unter normalen Umständen bei *Aplysia* immer der im Uhrzeigersinn rechte der beiden kleineren Quadranten zum D-Quadranten (Lankester 1875, Blochmann 1883, Carazzi 1900, 1905/6, Saunders und Poole 1910, van den Biggelaar 1996a). Auch unter der Prämisse, daß die beiden kleineren Quadranten im Keim von *Aplysia* zunächst äquipotent sind, scheinen also ihre Chancen tatsächlich als D-Quadrant determiniert zu werden nicht gleich zu sein. Möglicherweise hat die im Uhrzeigersinn rechte der beiden kleinen Makromeren einen sterischen Vorteil, weil sie an der vegetalen Kreuzfurche<sup>11</sup> beteiligt (3.1.2) ist. Dadurch nimmt diese Blastomere, im Vergleich mit ihrer Geschwisterzelle, eine zentralere Position im Keim ein und kann so mit einer größeren Zahl an animalen Mikromeren in Kontakt treten. Auch bei äqual furchenden Spiraliern, bei denen ja zunächst alle vier Quadranten äquipotent sind, wird nämlich unter natürlichen Umständen stets eine der beiden an der vegetalen Kreuzfurche beteiligten Makromeren zur D-Zelle induziert (van den Biggelaar und Guerrier 1983).

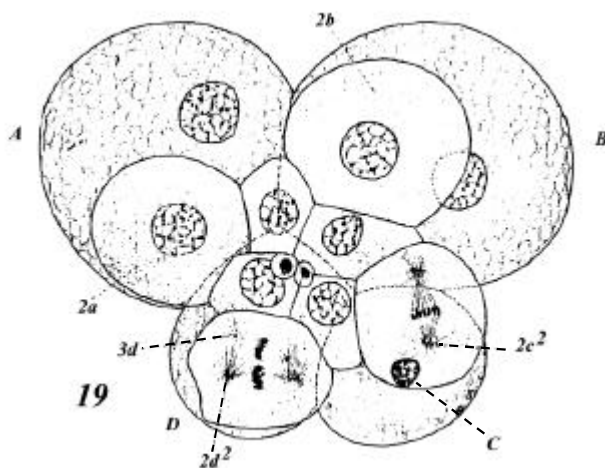
Vielleicht bestehen aber doch minimale und regelmäßig auftretende Unterschiede im Volumen der beiden kleineren Makromeren, die erst durch eine größere Anzahl vermessener Keime als signifikant erkannt werden können. Solche minimalen Volumenun-

---

<sup>11</sup> Die Makromeren liegen nicht präzise in einer Ebene, so daß sich nur zwei der vier Makromeren am vegetalen Pol berühren. Die Kontaktlinie zwischen diesen beiden sich gegenüberliegenden Zellen wird als vegetale Kreuzfurche bezeichnet. Nach Wilson (1928, Seite 990) berühren sich bei Spiraliern in der vegetalen Kreuzfurche am vegetalen Pol stets die Makromeren B und D.



terschiede könnten minimale Unterschiede in der Dauer der Zellzyklen zur Folge haben und so zu einem zeitlichen Vorteil einer der beiden Blastomeren führen. Diese geringen Unterschiede in der Dauer der Zellzyklen könnten sich von Furchung zu Furchung verstärken, so daß schließlich eine der beiden kleineren Makromeren vor der anderen die fünfte Furchungsteilung durchläuft. Diese Makromere wäre dann nach der fünften Furchung als erste in der Lage, mit den animalen Mikromeren in Kontakt zu treten und so determiniert zu werden. Carazzi (1905/6) hat bei *Aplysia limacina* tatsächlich einen zeitlichen Vorsprung der D-Makromere gegenüber der C-Makromere bei der fünften Furchung beobachtet<sup>12</sup> (Abbildung 25). Bei der Fortführung dieses Projektes soll die genauen Teilungsabfolge mit Hilfe des DNA-spezifischen Fluoreszenzfarbstoffes Hoechst 33258 auch an lebenden Keimen analysiert werden. Damit ließen sich auch kleinste Asynchronien zwischen den Blastomeren nachweisen. Außerdem soll eine größere Anzahl von Keimen volumetrisch vermessen werden.



**Abbildung 25: Bei *Aplysia limacina* hat die D-Makromere bereits bei der fünften Furchungsteilung einen zeitlichen Vorsprung vor der C-Makromere.** Diese Abbildung ist einer Beschreibung der Normalentwicklung von *Aplysia limacina* (Carazzi 1905/6) entnommen. Sie zeigt die Metaphasen der beiden Mikromeren 2c und 2d. Durch die 2d-Mikromere hindurch ist auch die Metaphase der D-Makromere (eigentlich 2D) zu sehen, die sich anschickt, bei der fünften Furchung die Mikromere 3d abzuschneiden. Der Kern der C-Makromere hingegen befindet sich noch in der Prophase der fünften Mitose.

Wie bei *Platynereis* (Dorresteijn 1990) werden auch bei *Aplysia* die Zellzyklen der Blastomeren primär durch eine differentielle Zuteilung von Plasmen unterschiedlich lang. Vermutlich beruhen diese Unterschiede auf einer asymmetrischen Zuteilung zellzyklusregulierender Faktoren. Möglicherweise sind die Zellzyklusasynchronien bei *Aplysia* und anderen inäqual furchenden Spiraliern sogar eine notwendige Voraussetzung für die Determination des D-Quadranten und für die Festlegung der dorsoventralen Körperachse. Im folgenden Kapitel der Diskussion werde ich diese Überlegungen unter evolutiven Gesichtspunkten ausführlich erläutern.

<sup>12</sup> Dopo un'altra pausa D ha il nucleo in mitosi (fig. 19) per dare 3d, C ha il nucleo contratto per entrare in divisione, ... (Carazzi 1905/6, Seite 267, fig. 19; siehe Abbildung 25 dieser Arbeit)

## 4.2 Mögliche Bedeutung der differentiellen Zellzyklusregulation bei der Evolution der Spiraler

Seit etwa zehn Jahren interessieren sich Entwicklungsbiologen zunehmend dafür, wie man die ancestralen Merkmale des Furchungsmusters bei Spiraliern definieren könnte. Man erhofft sich davon Auskünfte über die stammesgeschichtliche Verwandtschaft der Spiraler. Einige Autoren nehmen an, daß sich die Keime der ursprünglichsten Gastropoden (van den Biggelaar 1996a, van den Biggelaar und Haszprunar 1996) bzw. der Mollusken insgesamt und möglicherweise auch der Anneliden (Freeman und Lundelius 1992, van den Biggelaar *et al.* 1997) äqual furchten. Dabei entstehen gleich große und, wie in Einzelfällen experimentell gezeigt (van den Biggelaar und Guerrier 1979, Arnolds *et al.* 1983, Boring 1989), zunächst äquipotente embryonale Quadranten. Der D-Quadrant und damit die dorsoventrale Körperachse wird nach der fünften Furchung, also relativ spät, durch eine induktive Interaktion zwischen Mikro- und Makromeren determiniert. Nach dieser Auffassung entstanden in den verschiedenen Taxa mit Spiralfurchung erst später und mehrfach unabhängig voneinander Formen, bei denen die ersten beiden Furchungen nicht länger äqual, sondern inäqual verlaufen, so daß unterschiedlich große embryonale Quadranten entstehen. Einer der Quadranten (in der Regel der größte) wird bereits im 4-Zellstadium aufgrund der spezifischen Segregation zytoplasmatischer Faktoren als D-Quadrant determiniert (Einleitung). Die genannten Autoren sehen hinter dieser Entwicklung einen evolutiven Trend zur zeitlichen Vorverlegung der Determination des D-Quadranten und damit auch zu einer frühzeitigen Festlegung der dorsoventralen Körperachse. Freeman und Lundelius (1992) sehen den selektiven Vorteil dieser Entwicklung darin, daß ein früh determinierter D-Quadrant zum einen das Schicksal benachbarter Zelllinien früher beeinflussen kann und zum anderen bereits bei der vierten Furchung eine besonders große und spezialisierte Mikromere (2d, Somatoblast) abschnüren kann. Die beiden Autoren glauben, daß dadurch die Bildung adulter Strukturen (gebildet von 2d) beschleunigt und die Larvalphase insgesamt verkürzt würde. In den folgenden Abschnitten werde ich darlegen, daß bei der Realisierung dieses evolutiven Trends die differentielle Zellzykluskontrolle eine entscheidende Rolle gespielt haben könnte.

#### 4.2.1 Zellzyklusasynchronien und D-Quadrant Determination bei äqual furchenden Spiraliern

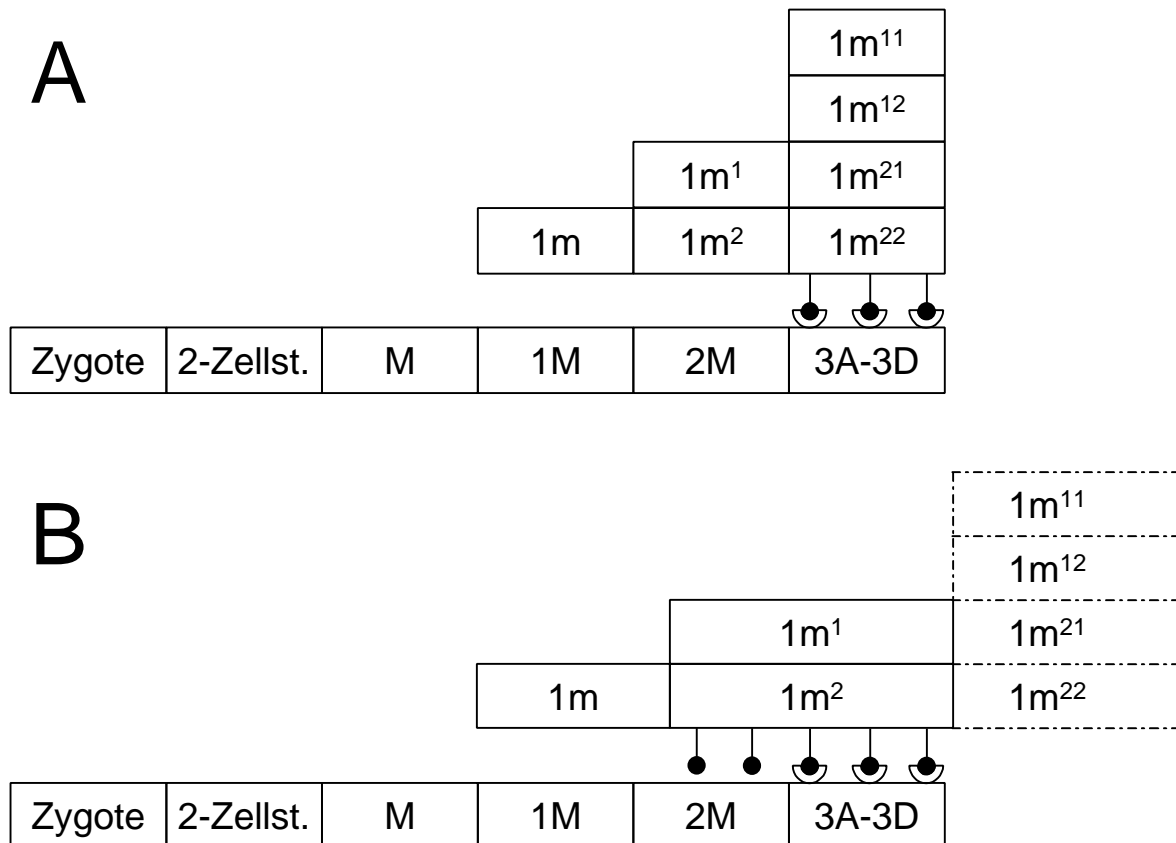
Im Verlauf der Evolution äqual furchender Mollusken wurde nach van den Biggelaar und Haszprunar (1996) die Determination des D-Quadranten „zeitlich“ vorverlegt. Bei den ursprünglichen Vertretern der äqual furchenden Mollusken, wie der Napfschnecke *Patella vulgata*, teilen sich zunächst sämtliche Makro- und Mikromeren synchron (van den Biggelaar 1977). Nach fünf Furchungsteilungen, also im 32-Zellstadium, wird eine der Makromeren durch eine Interaktion mit den animalen Mikromeren als 3D-Zelle (Mesentoblast-Mutterzelle) determiniert (van den Biggelaar und Guerrier 1979). Bei der äqualen Spiralfurchung der moderneren Lungenschnecken, wie der Schlammschnecke *Lymnaea*, treten hingegen bereits bei der vierten Furchungsteilung Zellzyklusasynchronien zwischen den animalen Mikromeren und den vegetalen Makromeren auf. Die Makromeren haben dabei kürzere Zellzyklen als die Mikromeren und teilen sich daher schneller (van den Biggelaar 1971a, b). Zum Zeitpunkt der Interaktion zwischen den Mikro- und Makromeren liegen deshalb im Keim von *Lymnaea* nur 24-Zellen vor (Arnolds *et al.* 1983). Die 3D-Makromere wird bei *Lymnaea* also in einem Furchungsstadium mit weniger Blastomeren („früher“) als bei *Patella* determiniert. Folglich beeinflußt die Blastomere 3D als Organisator der dorsoventralen Achse bei *Lymnaea* verhältnismäßig jüngere Blastomeren als bei *Patella* (einen direkten Vergleich der Zellstammbäume von *Patella* und *Lymnaea* bieten van den Biggelaar und Haszprunar 1996).

Die Teilungsasynchronien zwischen Mikro- und Makromeren bei *Lymnaea* haben aber noch eine weitere wichtige Konsequenz für die Determination der Zelle 3D. Grundsätzlich liefern bei äqual furchenden Spiraliern die Nachkommen des ersten Mikromerenquartetts, also die Nachkommen der Zellen 1a-1d (=1m), das induktive Signal<sup>13</sup>, welches eine der vier bis dahin äquipotenten Makromeren als 3D-Makromere und damit als Mutterzelle des Mesentoblasten spezifiziert (van den Biggelaar und Guerrier 1979, Arnolds *et al.* 1983, Martindale *et al.* 1985, Boring 1989, van den Biggelaar 1996b). Während aber bei *Patella* das Induktionssignal von der zweiten Nachkommengeneration der ersten Mikromeren (1m<sup>11</sup>, 1m<sup>12</sup>, 1m<sup>21</sup>, 1m<sup>22</sup>, Abbildung 26A) ausgeht, so muß das Induktionssignal bei *Lymnaea* von der ersten Nachkommengeneration (1m<sup>1</sup>, 1m<sup>2</sup>, Abbildung 26B) stammen.

---

<sup>13</sup> Auch wenn die induktive Wirkung der Mikromeren bei einer Reihe von äqual furchenden Spiraliern klar nachgewiesen wurde liegt die Natur des induktiven Signals noch völlig im dunkeln.

Die Verlangsamung der Zellzyklen der ersten Mikromeren muß also mit einer vorzeitigen Bereitstellung des induktiven Signals durch eine frühere Nachkommengeneration einhergegangen sein. Dennoch wird nicht eine der 2M-Makromeren, sondern erst eine der 3M-Makromeren als Mesentoblast-Mutterzelle determiniert. Offenbar ist in den Makromeren ein Abzählmechanismus wirksam, der sicherstellen soll, daß die Makromeren erst nach der



**Abbildung 26: Schematische Darstellung der Induktion der 3D-Makromere bei äqual furchenden Spiraliern. A:** Bei *Patella* teilen sich alle Blastomeren bis zur sechsten Furchung synchron. Die zweite Nachkommengeneration der ersten Mikromeren stellt ein induktives Signal (♣) bereit, für welches die Makromeren einen Rezeptor (☺) besitzen. Eine der Makromeren wird aufgrund einer lang andauernden Interaktion mit den Mikromeren ausgewählt und als 3D-Makromere determiniert. **B:** Bei *Lymnaea* teilen sich die Mikromeren langsamer als die Makromeren, so daß 3D durch Interaktion mit der ersten Nachkommengeneration der ersten Mikromeren determiniert wird. Zur besseren Übersichtlichkeit werden die zweiten und dritten Mikromeren, die sich an der Interaktion nicht beteiligen, hier nicht gezeigt. Weitere Erläuterungen im Text.

fünften Furchungsteilung auf das induktive Signal reagieren können. Ein ähnlicher 'clock'-Mechanismus wurde für Ascidien-Keime beschrieben: die Muskelvorläuferzellen müssen acht DNA-Replikationsrunden durchlaufen, damit das Acetylcholinesterase-Gen exprimiert werden kann (Sato 1979, 1982; Sato und Ikegami 1981a, b). Bei dem Keim des Nematoden *Caenorhabditis elegans* hängt die Expression zweier Marker der Darmzelle davon ab, ob eine spezifische „quantale“ DNA-Replikationsrunde durchlaufen wird (Edgar und McGhee 1988). Die Ciliogenese in den Trochoblasten der

Polychaeten *Nereis virens* und *Platynereis dumerilii* ist ebenfalls von einer kritischen DNA-Replikationsrunde abhängig (Dondua *et al.* 1996). Das Konzept des „quantalen“ Zellzyklus geht auf Holtzer und seine Mitarbeiter zurück (Holtzer *et al.* 1973, 1975) und besagt, das Zellen ihren Determinierungs- oder Differenzierungsstatus nur ändern können, indem sie die S-Phase eines kritischen „quantalen“ Zellzyklus durchlaufen. In diesem Sinne wäre der fünfte Zellzyklus für die Makromeren in Keimen von äqual furchenden Spiraliern „quantal“, weil sie erst nach Abschluß dieser Teilungsrunde zur Wechselwirkung und Beantwortung des induktiven Signals der Mikromeren befähigt sind (siehe auch Abbildung 27A).

Die Kompetenz, das induktive Signal zu empfangen und als Folge davon ein (3D-) spezifisches genetisches Programm zu aktivieren (Mesentoblastbildung, Etablierung der d/v-Achse) scheint auch bei äqual furchenden Spiraliern durch morphogenetische Faktoren vermittelt zu werden, welche bereits im vegetalen Zytoplasma des Eies lokalisiert sind. So hat Morrill (1964) bei *Lymnaea* das vegetale Plasma durch Zentrifugation aus den Eiern entfernt mit der Folge, daß sich die Keime nur bis zu (radialisierten?) Exogastrulae entwickelten. Keime denen eine vergleichbare Portion animalen Plasmas fehlte, entwickelten sich hingegen weitgehend normal. Die Resultate von Morrill wurde von mehreren Autoren (Verdonk und Cather 1983, Freeman und Lundelius 1992) in dem Sinn interpretiert, daß im vegetalen Zytoplasma der Eier von äqual furchenden Spiraliern morphogenetische Determinanten vorliegen, welche für die Spezifizierung des D-Quadranten, der dorsoventralen Körperachse und damit auch für die Morphogenese des gesamten Keimes notwendig sind. Im Gegensatz zu inäqual furchenden Spiraliern gelangen diese Faktoren aber gleichermaßen in alle vier Makromeren. Ein induktives Signal von den Mikromeren aktiviert diese Faktoren schließlich in einer der Makromeren, so daß letztendlich nur diese Makromere als 3D-Makromere determiniert wird. Die postulierten morphogenetischen Faktoren sind dabei an eine „Zellzyklusuhr“ gebunden, die sicherstellt, daß diese Faktoren erst nach exakt fünf Furchungsteilungen aktiviert werden können (Abbildung 27A).

#### 4.2.2 Zellzyklusasynchronien und D-Quadrant Determination bei inäqual furchenden Spiraliern

Bei inäqual furchenden Spiraliern wird der D-Quadrant bereits im 4-Zellstadium determiniert, also noch früher, als bei den „modernen“ äqual furchenden Spiraliern. Im Folgenden will ich ein Modell darstellen, wie sich aus einem induktiven Mechanismus zur Determination des D-Quadranten (Abbildung 27A), wie er bei äqual furchenden Spiraliern nachgewiesen ist (s.o.), ein auf der Lokalisation zytoplasmatischer Determinanten beruhender Mechanismus entwickelt haben könnte, wie man ihn bei inäqual furchenden Spiraliern vorfindet (Abbildung 27C, D). Bei dieser Entwicklung könnten ebenfalls Zellzyklusasynchronien zwischen den Blastomeren eine wesentliche Rolle gespielt haben. Mein Modell basiert auf dem Vergleich der Embryonalentwicklung des Polychaeten *Platynereis* und des Gastropoden *Aplysia*. Der Polychaet *Platynereis dumerilii* eignet sich für diesen Vergleich deshalb gut, weil das Furchungsmuster dieses „typischen“ inäqual furchenden Spiraliers sowohl zeitlich, als auch räumlich besonders präzise untersucht wurde (Dorresteijn 1990). Zum einen wurde zur Bestimmung der zeitlichen Abfolge der Furchungsteilungen und der Asynchronien zwischen den Blastomeren nicht das Auftreten der Teilungsfurche, sondern die Auflösung der Kernhülle in der Mitose herangezogen. Während die Teilungsfurche sich einseitig einschneidet und mehrere Minuten existiert löst sich die Kernhülle innerhalb von wenigen Sekunden auf, so daß sich auch minimale Zellzyklusasynchronien zwischen den Blastomeren klar erkennen und präzise bestimmen lassen. Zum anderen wurden nicht nur die Volumina der Blastomeren, sondern auch die Plasmabestandteile (Dotter, dotterfreies Zytoplasma) präzise vermessen. Nur so konnte der Prozeß der asymmetrischen Plasmaaufteilung quantifiziert werden. *Aplysia californica* wiederum eignet sich für den Vergleich besonders gut, gerade weil ihr Furchungsmuster von demjenigen „typischer“ inäqual furchender Spiraliere abweicht. Nicht der größte, sondern einer der kleineren Quadranten wird beim Keim dieser Schnecke zum D-Quadranten. Durch den Vergleich der Furchungsmuster eines typischen mit dem eines untypischen inäqual furchenden Spiraliere, wird der Blick frei für die wirklich wesentlichen Übereinstimmungen im Furchungsgeschehen.

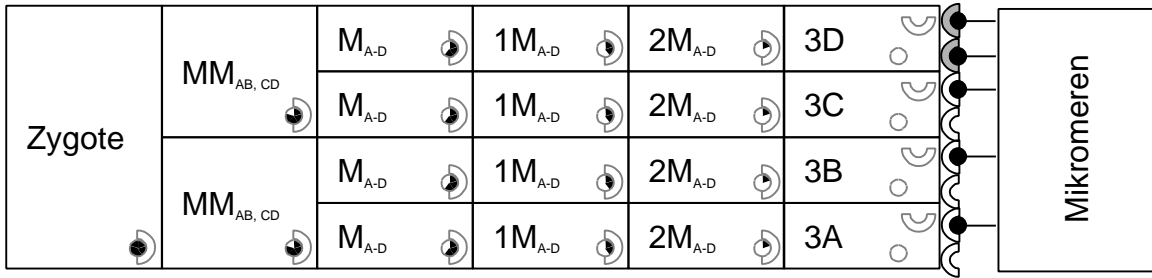
Wie ich in einem vorhergehenden Kapitel ausführlich dargelegt habe (4.1.2), besteht das gemeinsame spezifizierende Motiv hinter der ersten inäqualen Furchungsteilung von *Platynereis* und *Aplysia* in einer Beschleunigung des Zellzyklus der CD-Blastomere gegenüber dem der AB-Blastomere. Ich erkenne in der differentiellen Zellzykluskontrolle

einen Weg, wie sich aus äqual furchenden Spiraliern, mit zunächst äquipotenten Quadranten, inäqual furchende Spiraliern mit unterschiedlich determinierten Quadranten entwickelt haben könnten. Meine Hypothese knüpft unmittelbar an mein Modell zur Determination äqual furchender Spiraliern an (Abbildung 27A, siehe auch vorhergehender Abschnitt). Aus zunächst zufälligen und geringfügigen Zellzyklusasynchronien zwischen den Blastomeren im 4-Zellstadium eines ancestralen äqual furchenden Spiraliern hat sich zuerst eine feste Teilungsabfolge der embryonalen Quadranten evolviert, ohne daß damit unmittelbar ein Wechsel im Determinationsmodus verbunden gewesen war. Obwohl bei dieser hypothetischen Zwischenform die Blastomeren im 4-Zellstadium zwar bereits unterschiedlich lange Zellzyklen hatten, wurde der D-Quadrant erst nach der fünften Furchungsteilung per Induktion determiniert (Abbildung 27B). Bei dieser hypothetischen Zwischenform bedeuteten die Zellzyklusasynchronien zwischen den Blastomeren aber dennoch eine Vorauswahl (Spezifikation) des zukünftigen D-Quadranten. Die Makromere des am raschesten proliferierenden Quadranten durchläuft in diesem Modell nämlich die fünfte Furchungsteilung als erste und hat demnach auch als erste die Chance mit den Mikromeren in Kontakt zu treten und das induktive Signal zu empfangen (Abbildung 27B). Für diese hypothetische Zwischenform läßt sich, wenn man den Überlegungen von

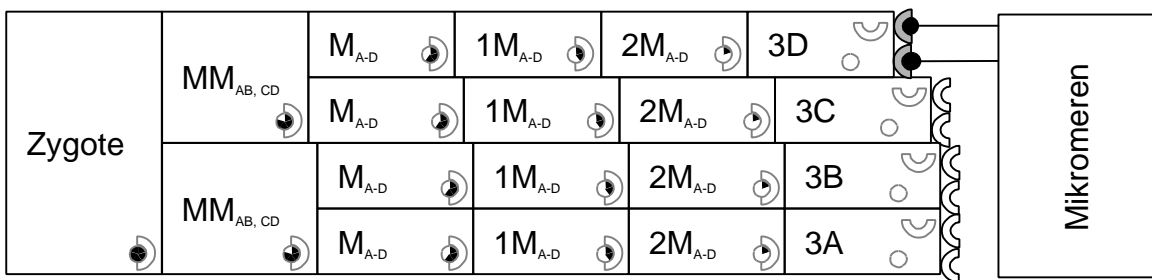
*folgende Seite:*

**Abbildung 27: Modell zur Evolution inäqual furchender Spiraliern aus äqual furchenden Vorfahren.** In den Skizzen sind jeweils von links nach rechts die ersten fünf Furchungsteilungen für die Makromeren dargestellt, wobei jedes Kästchen eine Zelle bedeutet. Die Breite der Kästchen symbolisiert die Zellzyklusdauer der jeweiligen Blastomere. Dabei bezeichnet „MM“ eine undeterminierte Blastomere im 2 Zellstadium, „M“ eine undeterminierte Makromere ab dem 4-Zellstadium. Der Index gibt jeweils an, welche potentiellen Schicksale die jeweilige Blastomere annehmen kann. Mit „CD, AB, A, B, C, D“ werden diejenigen Blastomeren bezeichnet, deren Entwicklungsschicksal bereits determiniert ist. **A:** Bei äqual furchenden Spiraliern gelangt die Kompetenz sich D-Quadrant typisch zu entwickeln (D), D-Kompetenz) in alle Makromeren gleichermaßen. Eine „Zellzyklusuhr“ (●●...○) stellt sicher, daß der Empfänger (C) für das induktive Signal der Mikromeren (●) erst nach Ablauf von fünf Zellteilungen exprimiert wird. Durch Interaktion zwischen den Mikro- und Makromeren (●) wird schließlich eine Makromere ausgewählt (●) in der dann das 3D-spezifische Entwicklungsprogramm aktiviert wird. Die anderen drei Makromeren nehmen dann in Abhängigkeit von ihrer Lage zur 3D-Zelle das A, B oder C-Schicksal an. **B:** Hypothetisches Zwischenstadium bei dem alle Makromeren noch potentiell in der Lage sind als 3D-Zelle determiniert zu werden. Eine Makromere exprimiert aber aufgrund ihres kürzeren Zellzyklus als erste den Signalrezeptor und wird deshalb unter normalen Umständen stets als 3D-Blastomere determiniert. **C:** Weiteres hypothetisches Zwischenstadium, bei dem die D-Kompetenz nur noch in eine der vier Makromeren gelangt. Das D-Quadrant spezifische Entwicklungsprogramm wird aber erst nach Interaktion mit den Mikromeren aktiviert. Bei diesem Stadium ist zwar die Potenz der Makromeren bereits im 4-Zellstadium auf ein einziges mögliches Schicksal eingeschränkt. Ob diese Schicksale auch tatsächlich angenommen werden hängt aber weiterhin von Zell-Zell-Interaktionen ab. **D:** Bei inäqual furchenden Spiraliern schließlich wird das D-Quadrant spezifische Entwicklungsprogramm in der kompetenten Makromere automatisch aktiviert (C). Da es keiner Zell-Zell-Interaktionen mehr bedarf, sind hier die Blastomeren bereits im 4-Zellstadium determiniert.

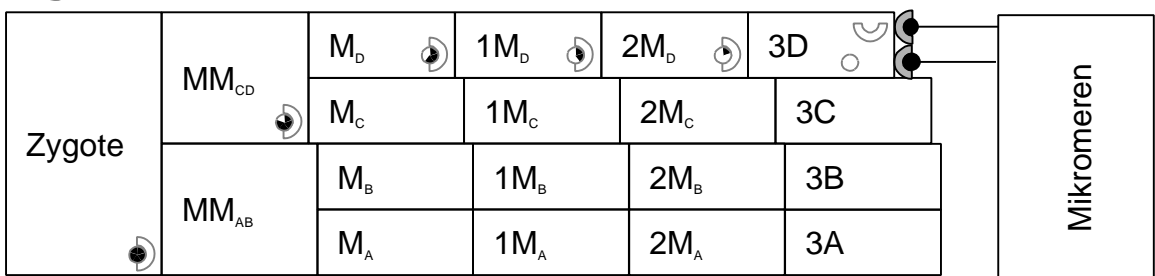
# A



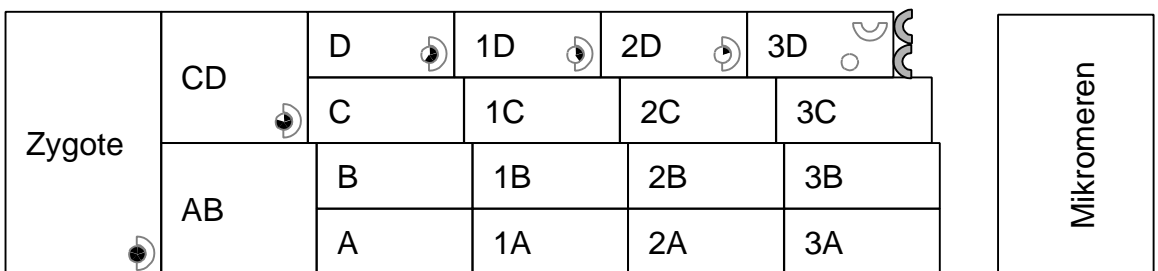
# B



# C



# D





Freeman und Lundelius (1992) folgt, ein unmittelbarer Selektionsvorteil ausmachen, der aus der rascheren Proliferation eines Quadranten erwächst. Als Folge der früheren Determination des Organisators 3D können auch die Schicksale der benachbarten Zellen eher festgelegt werden, so daß die Larvalentwicklung insgesamt beschleunigt wird (Freeman und Lundelius 1992, siehe auch Seite 106). Ausgehend von der eben postulierten Zwischenform, bei der unter natürlichen Umständen stets ein bestimmter (der am raschesten proliferierende) der ansonsten äquipotenten Quadranten als D-Quadrant determiniert wird, haben dann im weiteren Verlauf der evolutiven Entwicklung die anderen drei Quadranten die Kompetenz verloren, auf das induktive Signal zu reagieren (Abbildung 27C). Ultimativ ist könnte sogar die Notwendigkeit für die induktive Interaktion selbst verloren gegangen sein (Abbildung 27D).

In der Literatur findet sich nur bei Freeman und Lundelius (1992) eine vergleichbare Hypothese zur Evolution inäqual furchender Spiralier aus äqual furchenden Vorfahren. In einem Experiment haben sie beim normalerweise äqual furchenden Keim von *Lymnaea* durch mechanische Manipulation extreme Größenunterschiede zwischen den Blastomeren des 4-Zellstadiums erzeugt. Bei den behandelten Embryonen ging der D-Quadrant anschließend stets aus der größten der vier Blastomeren hervor. Durch zusätzliche Deletion der animalen Mikromeren konnte die Autoren zeigen, daß die Determination des D-Quadranten auch bei den experimentell inäqualisierten Keimen eines induktiven Signals bedarf. Aufgrund ihrer Befunde und im Unterschied zu meiner These sehen Freeman und Lundelius zufällige und variable Größenunterschiede zwischen den Blastomeren als Ausgangspunkt für die Evolution inäqual furchender Spiralier. Sie postulieren eine hypothetische Zwischenform, bei der nicht Zellzyklusasynchronien, sondern Volumenunterschiede im 4-Zellstadium eine Vorauswahl des definitiven D-Quadranten bedeuten. Die Makromere des größten Quadranten hat demnach aufgrund ihres größeren Volumens auch die besten Chancen, Kontakt mit den animalen Mikromeren aufzunehmen und so das determinierenden Signal zu empfangen.

Auch wenn die Experimente von Freeman und Lundelius die Bedeutung von Volumenunterschieden für die Auswahl des definitiven D-Quadranten eindrucksvoll zu belegen scheinen, fehlt ihrer Darstellung aber eine überzeugende Erklärung, welchen initialen Selektionsvorteil die Inäqualisierung der Quadranten gehabt haben soll. Ihre These vermag auch nicht zu erklären, wieso bei *Aplysia californica* ausgerechnet einer der kleineren Quadranten zum D-Quadranten wird. Von einer hypothetischen Zwischenform mit asynchronen

Zellzyklen hingegen, ließen sich auch die Gegebenheiten bei *Aplysia* ableiten (vgl. Kapitel 4.1), da ja die Blastomere mit den kürzesten Zellzyklus nicht notwendigerweise auch die größte Blastomere sein muß, wie ich bereits an anderer Stelle ausführlich dargelegt habe (4.1.2 Seite 103). In jedem Fall sind die Zellzyklusasynchronien mit inäqualen Furchungen korreliert. Freeman und Lundelius (1992) erwähnen leider nicht, ob in den experimentell inäqualisierten 4-Zellstadien von *Lymnaea* die größten Blastomeren, aufgrund eines höheren Anteils am dotterfreien Zytoplasma sich schneller als die kleineren Blastomeren teilten. Dann hätten die größeren Blastomeren nämlich neben ihrem räumlichen Vorteil zusätzlich einen zeitlichen Vorsprung gehabt. Minimale Zellzyklusasynchronien werden (insbesondere bei undurchsichtigen Keimen wie *Lymnaea*) oft übersehen, wenn man nur die Teilungsfurchen, anstatt die Kernhüllauflösung als Bezugspunkte verwendet (Dorresteijn 1990). Bei genauer Betrachtung erkennt man nämlich auch schon beim unbeeinflussten Keim von *Lymnaea* minimale Zellzyklusasynchronien zwischen den Blastomeren (Fig. 1D-F in Zivkovic *et al.* 1991). Die These von Freeman und Lundelius (1992) läßt auch die Frage nach der molekularen Natur der morphogenetischen Determinanten völlig offen. Meine Überlegungen hingegen sehen zellzyklusregulierende Proteine als wesentliche Bestandteile des Determinationsgeschehens und somit auch als Determinanten. Zellinienspezifische Entwicklungsprogramme werden also als Folge der differentiellen Zellzykluskontrolle aktiviert.

Bei anderen Organismen kennen wir Beispiele, bei denen die Aktivierung zellinienspezifischer Entwicklungsprogramme tatsächlich in Abhängigkeit von der Zellzykluskontrolle erfolgt. In Aggregaten des Schleimpilzes *Dictyostelium* entwickeln sich die Zellen als Reaktion auf ein Differenzierungssignal entweder in Stiel- oder Sporenzellen. Dabei bestimmt die Zellzyklussubphase in der sich die Zellen zum Zeitpunkt der Induktion befinden, welches der beiden alternativen Entwicklungsschicksale angenommen wird (Wecks und Weijer 1994). Bei dem Nematoden *Caenorhabditis elegans* hängt die Entscheidung, ob die Vulva-Vorläuferzellen das primäre, sekundäre oder tertiäre Entwicklungsschicksal annehmen davon ab, zu welchem Zeitpunkt im Zellzyklus ein *lin-12*-Signal die Zellen erreicht (Ambros 1999). Die *mid blastula transition* von *Drosophila* beruht auf einem zygotischen Entwicklungsprogramm, welches u.a. die Zellularisierung des Keimes und die Aktivierung von Segmentierungsgenen beinhaltet. Die Aktivierung dieses Programmes hängt unmittelbar davon ab, daß während der letzten maternal kontrollierten synzytialen Zellzyklen die Interphase graduell immer länger wird (Sibon *et al.* 1997). Die Autoren nehmen an, daß zur Aktivierung dieses zygotischen Programmes

bestimmte besonders lange Transkripte notwendig sind, welche nur dann vollständig synthetisiert werden können, wenn die Interphase länger andauert.

#### 4.2.3 Künftige Experimente zur Überprüfung der Rolle der Zellzyklusregulation bei der Determination der Blastomeren

Die Plausibilität der in den vorangegangenen Abschnitten vorgestellten Hypothese zur evolutiven Entstehung inäqual furchender Spiraler aus äqual furchenden Vorfahren muß natürlich mit Experimenten untermauert werden. Im folgenden will ich deshalb einige Experimente vorschlagen mit denen meine Modelle in naher Zukunft überprüft werden sollen. Eine meiner Prämissen besagt, daß es bei äqual furchenden Spiraliern ausreicht, Zellzyklusasynchronien zwischen den Blastomeren des 4-Zellstadiums zu induzieren, um eine Vorauswahl des zukünftigen D-Quadranten zu bewirken (4.2.2, Abbildung 27B). Die Injektion zellzyklusbeschleunigender Faktoren in eine der vier Makromeren eines äqual furchenden Spiralers müßte dann genügen, um die dorsoventrale Körperachse festzulegen. Durch Injektion zellzyklusregulierender Faktoren ließen sich auch die Folgen einer Änderung der Zellzyklusdauer klar von den Folgen einer Volumenänderung trennen. Möglicherweise haben Freeman und Lundelius (1992) bei ihren Experimenten, nicht nur das Volumen eines der Quadranten im *Lymnaea*-Keim vergrößert, sondern gleichzeitig auch dessen Proliferationsrate erhöht (vgl. Abschnitt 4.2.2).

Mein Modell sieht drei mögliche Mechanismen für die Determination des D-Quadranten bei inäqual furchenden Spiraliern (4.2.2, Abbildung 27B, C, D). Einmal besteht die Möglichkeit, daß einer der Quadranten aufgrund spezifischer Determinanten und unabhängig von Zell-Zell-Interaktionen bereits im 4-Zellstadium als D-Quadrant determiniert wird (Abbildung 27D). Es besteht aber auch die Möglichkeit, daß es für die Determination des D-Quadranten sehr wohl eines induktiven Signals von den Mikromeren bedarf. Dabei kann die Kompetenz auf das induktive Signal zu reagieren (D-Kompetenz), entweder nur in einer Makromere (Abbildung 27C), oder aber in allen Makromeren (Abbildung 27B) vorhanden sein. Im letzteren Falle wäre einer der Quadranten allein aufgrund seiner höheren Proliferationsrate für die Determination zum D-Quadrant vorbestimmt. Die meisten der in der Literatur genannten Experimente zur Determination des D-Quadranten bei inäqual furchenden Spiraliern, sind nicht geeignet, um die drei von mir beschriebenen alternativen Determinations-Mechanismen klar zu unterscheiden.

Bei Pollappen-bildenden Spiraliern wird durch Entfernen des Pollappens die D-Kompetenz insgesamt aus dem Keim entfernt, und damit unterbleibt auch die Etablierung der

dorsoventralen Körperachse. Der Embryo bleibt radiärsymmetrisch (Cather und Verdonk 1974, van Dongen und Geilenkirchen 1975). Durch Zentrifugation (Dorresteiin und Eich 1991), Cytochalasin B-Behandlung (Dorresteiin *et al.* 1987) oder durch leichtes Pressen der Keime während der ersten Furchungsteilung (Henry und Martindale 1987) läßt sich erreichen, daß die für die Determination des D-Quadranten relevanten Faktoren in zwei statt nur in einen Quadranten gelangen. In solchen Keimen werden anschließend zwei D-Quadranten determiniert und es entstehen Embryonen mit einer duplizierten dorsoventralen Körperachse. Bei all diesen Experimenten bleibt aber unklar, ob es zur Aktivierung des D-Quadrant spezifischen Entwicklungsprogrammes eines induktiven Signals bedarf oder ob das D-Quadrant spezifische Muster autonom entfaltet wird. Außerdem erfährt man bei diesen Experimenten nichts über die Natur der morphogenetischen Faktoren. Möglicherweise handelt es sich dabei um zellzyklusbeschleunigende Faktoren, welche in einen der embryonalen Quadranten in größerer Menge gelangen. Die Makromere dieses Quadranten kann dann die fünfte Furchung als erste durchlaufen und wird anschließend als 3D-Zelle determiniert (Abbildung 27B). Gelangen aber die zellzyklusbeschleunigenden Faktoren aufgrund eines Experimentes in zwei Quadranten, so durchlaufen zwei Makromeren gleichzeitig die fünfte Furchung und werden beide als 3D-Zellen determiniert. Es fehlte ihnen der zeitliche Vorsprung, um die jeweils konkurrierende Makromere am Eintritt in das D-Schicksal zu hindern.

Nur durch die experimentelle Entfernung der ersten Mikromeren, den potentiellen Signalgebern, konnte für die beiden Pollappen bildenden Spiralier *Ilyanassa* (Clement 1963, 1967) und *Bithynia* (van Dam und Verdonk 1982) klar gezeigt werden, daß bei ihnen der D-Quadrant und die dorsoventrale Körperachse tatsächlich ohne eine Zell-Zell-Interaktionen zwischen den Mikro- und Makromeren determiniert wird.

Ein alternatives Experiment könnte sein, die normale Zellteilungsabfolge der Makromeren durch Injektion zellzyklusregulierender Faktoren zu verändern. So könnten Keime erzeugt werden, bei denen eine der kleineren Makromeren (normalerweise A, B oder C) gleichzeitig, oder sogar vor der größten Makromere (normalerweise D) die fünfte Furchungsteilung durchläufe. Mit diesem Experiment ließe sich nachweisen, ob der von mir in Abbildung 27B skizzierte Determinations-Mechanismus, bei dem alle Makromeren über die D-Kompetenz verfügen, in der Realität vorkommt. Als Folge des Experiments müßte dann die kleinere aber rascher proliferierende Makromere als 3D-Zelle determiniert werden, weil

bei diesem Mechanismus nur die Proliferationsrate darüber entscheidet, welcher Quadrant als D-Quadrant determiniert wird.

Die von mir skizzierten Kontrollexperimente erfordern, daß zellzyklusregulierende Faktoren als Protein oder mRNA verfügbar sind. Die Proteine oder mRNA's müßten dann in individuelle Blastomeren injiziert werden, um deren Zellzyklusdauer gegenüber den Zellzyklen der anderen Blastomeren im Keim zu beschleunigen oder zu verlangsamen. Anschließend könnten dann die Effekte dieser Manipulation auf die Morphogenese des Keimes Aufschluß darüber geben, welche Rolle die Zellzyklusregulation bei der Determination der Blastomeren spielt. Damit solche Experimente erfolgreich durchgeführt werden können, müßten auch die normalen Mechanismen der Zellzykluskontrolle aufgeklärt werden. In den folgenden Kapiteln der Diskussion werde ich meine Fortschritte bei der Aufklärung der Zellzykluskontrolle im *Platynereis*-Keim diskutieren. Diese Arbeiten habe ich soweit voran gebracht, daß die genannten Experimente für diesen Keim nun ins Auge gefaßt werden können.

#### **4.3 Die molekulare Regulation der embryonalen Furchungsteilungen von *Platynereis dumerilii***

Die Blastomeren im Keim von *Platynereis* teilen sich bereits ab dem 2-Zellstadium asynchron (Dorresteyn 1990). Die strikt eingehaltenen Abfolge der Furchungsteilungen muß das Resultat einer differentiellen Zellzykluskontrolle sein. Mit Hilfe des Zellzyklusinhibitors Olomoucine konnte ich zeigen, daß diese festgelegte Teilungssequenz nicht ohne Folgen für das Determinationsgeschehen gestört werden kann und somit eine notwendige Voraussetzung für die korrekte Determination der Blastomeren ist (4.3.1). Die Dauer der embryonalen Zellzyklen wird bei *Platynereis* sehr wahrscheinlich über die Regulation des G<sub>2</sub>/M-Phasenübergangs bestimmt (Heimann 1994). Ich konnte im Rahmen dieser Arbeit die wichtigsten molekularen Komponenten des G<sub>2</sub>/M-Kontrollpunktes nachweisen (4.3.2, 4.3.7). Damit kann man erstmalig ein Bild von der (differentiellen) Regulation der embryonalen Zellzyklen während der frühen Furchungsphase dieses Polychaetenkeims skizzieren. Auf der Grundlage dieser Resultate werden wir in Zukunft die Zellzyklusdauer individueller Blastomeren im Keim von *Platynereis dumerilii* manipulieren können, so daß wir die Bedeutung der normalen Teilungsabfolge für die Determination der Blastomeren noch präziser als bisher (4.3.1) untersuchen können.

#### 4.3.1 Änderungen in der Teilungsabfolge der Blastomeren führen zu schweren Störungen des Determinationsprozesses

Olomoucine ist ein substituiertes Purin und wurde über einen *in vitro*-Test als potenter und spezifischer Inhibitor der Proteinkinasen Cdc2 (=Cdk1, *cyclin dependent kinase*) und Cdk2 identifiziert (Vesely *et al.* 1994). Die Strukturanalyse eines Cdk2/Olomoucine-Kokristalls ergab, daß Olomoucine die ATP-Bindungsstelle des Cdk-Proteins besetzt und somit als kompetitiver Inhibitor des Phosphatdonors ATP wirkt (Schulze-Gahmen *et al.* 1995). In einem breiten Spektrum von Organismen, von einzelligen Algen, über Embryonen von Invertebraten und Vertebraten bis hin zu humanen Zellkulturzellen, blockiert Olomoucine effektiv sowohl meiotische als auch mitotische Zellteilungen (Abraham *et al.* 1995). Einige der untersuchten Zellsysteme wurden in der G1-Phase des Zellzyklus arretiert, was auf die Hemmung von Cdk2 zurückzuführen ist. Cdk2 ist im Komplex mit Cyclin E und Cyclin A ein zentraler Regulator des G1/S-Phasenübergangs (van den Heuvel und Harlow 1993). Die Blastomeren der untersuchten embryonalen Organismen wurden hingegen ausnahmslos in der G2-Phase der Furchungszyklen arretiert, also durch Inhibierung der Cdc2-Kinase (Abraham *et al.* 1995). Den Furchungszyklen vieler Embryonen fehlt eine G1-Phase (Azzaria und McGhee 1992, Edgar und McGhee 1988, Edgar *et al.* 1986, Hinegardner *et al.* 1964), so daß Cdk2 beim Eintritt in die S-Phase, anders als bei differenzierten Zellen, möglicherweise nur eine untergeordnete Rolle spielt. Für Seeigel-Embryonen konnte explizit gezeigt werden, daß die Aktivität von Cdk2 für die DNA-Replikation während der frühen Furchungsteilungen nicht notwendig ist (Moreau *et al.* 1998). Nach Olomoucine-Behandlung verharren bei *Platynereis* die gesamten Oocyten in der G2-Phase der ersten meiotischen Teilung (3.2.3 Seite 70) und die Blastomeren in der Interphase des vierten mitotischen Zellzyklus (3.2.3 Seite 71). Auch wenn im Augenblick nicht ausgeschlossen werden kann, daß die Blastomeren dabei in der S-Phase verharren, machen es die oben genannten Befunde aus Embryonen anderer Organismen wahrscheinlich, daß die Zellzyklen in der G2-Phase arretiert sind. Das würde bedeuten, daß im Keim von *Platynereis* die Aktivität der Cdc2/Cyclin-Kinasen, genauer die Aktivität des MPF (Cdc2/Cyclin B-Kinase) den Takt für die meiotischen und mitotischen Zellzyklen angibt. Dieser Befund stimmt gut mit den Ergebnissen meiner Diplomarbeit überein, in der ich zeigen konnte, daß den frühen Furchungsteilungen von *Platynereis* eine G1-Phase fehlt (Heimann 1994).

Obwohl die Behandlung der *Platynereis*-Keime mit Olomoucine unmittelbar nach der zweiten Furchungsteilung begonnen wurde, wurde der Ablauf der Zellzyklen erst im

8-Zellstadium blockiert. Die dritte Furchung wurde trotz der Anwesenheit von Olomoucine eingeleitet und beendet. Vermutlich benötigte das Olomoucine nach Inkubationsbeginn noch einige Minuten, um in die Zellen zu diffundieren. Die dritte Mitose war vermutlich bereits eingeleitet, bevor die intrazelluläre Olomoucine-Konzentration hoch genug war, um die Cdc2/Cyclin-Kinasen vollständig zu inhibieren. Die Vitellinhülle, welche die Keime umgibt, scheint eine starke Diffusionsbarriere darzustellen, denn auch Bromdesoxyuridin benötigt einige Minuten, um in die Zelle einzudringen (Heimann 1994).

Der durch Olomoucine vermittelte Zellzyklusblock war reversibel. Nachdem Olomoucine aus dem Seewasser wieder entfernt worden war, setzten die Blastomeren ihre Furchungen fort. Allerdings war die Abfolge der Zellteilungen zwangsläufig stark gestört. Im normalen Keim erfolgt die vierte Furchungsteilung asynchron (Dorresteijn 1990). Nach der Olomoucine-Behandlung traten die Blastomeren jedoch synchron in die vierte mitotische M-Phase ein. Aus den mit Olomoucine behandelten Keimen entwickelten sich Trochophorae mit schweren Mißbildungen. Während normale Trochophorae in ihrer Episphäre exakt fünf larvale Drüsenzellen aufweisen, waren in den mit Olomoucine behandelten Keimen regelmäßig sehr viel mehr Drüsenzellen nachweisbar. Aus früheren Untersuchungen über das drüsenzellspezifische Antigen OI64 wissen wir, daß die larvalen Drüsen im normalen Keim den Mikromeren 1a und 1b entstammen (Dorresteijn *et al.* 1993, Dorresteijn und Graffy 1993). Wie viele der fünf Drüsenzellen jede dieser beiden Mikromeren beisteuert, ist bislang völlig offen. Möglicherweise erhalten mehr als nur fünf Nachkommenzellen die Kompetenz, das Drüsenzellantigen OI64 zu exprimieren. Zell-Zell-Interaktionen würden dann festlegen, welche fünf der kompetenten Zellen sich tatsächlich zu Drüsenzellen differenzieren. Die Veränderung der normalen Teilungsabfolge durch Olomoucine bewirkt möglicherweise, daß die an den Zell-Zell-Interaktionen beteiligten Blastomeren zeitlich nicht zusammentreffen. Als Folge davon würden sich sämtliche kompetenten Zellen zu Drüsenzellen differenzieren (Abbildung 14).

Die mit Olomoucine behandelten Keime sind insgesamt durch eine verkümmerte dorso-ventrale Polarität charakterisiert. Die larvalen Drüsenzellen sind nicht, wie im normalen Keim, nur an der Ventralseite der Episphäre lokalisiert, sondern entlang des gesamten Prototrochs zu finden (Abbildung 14A, B). Das Enzym Acetylcholinesterase ist in normalen Trochophorae im larvalen Gehirn und im ventralen Nervensystem nachweisbar (Abbildung 15A, B). In Olomoucine-behandelten Keimen läßt das Expressionsmuster dieses neuronalen Markers hingegen keine dorsoventrale Ordnung im zentralen Nervensystem erkennen (Abbildung 15C - F). Ein Stomodaeum konnte in keinem Fall beobachtet werden.

Bis auf zwei Einzelfälle wurden auch nie Parapodienanlagen ausgebildet, die in normalen Trochophorae die dorsoventrale Polarität des Rumpfes klar erkennen lassen. Wo Parapodien erkennbar waren, da schienen sie ringförmig um den Rumpf angeordnet zu sein (Abbildung 14D). Das dorsoventrale Muster entsteht im ungestörten Keim durch eine Interaktion zwischen dem D-Quadranten und den anderen Quadranten. Dabei wirken insbesondere die Zellen 3D und 4d (für Literatur siehe Einleitung) und bei *Platynereis* sehr wahrscheinlich auch 2d (Dorresteijn und Eich 1991, Dorresteijn 1997/98) als Organisatoren, die das Schicksal der benachbarten Zellen durch Zell-Zell-Interaktion bestimmen. Im Normalfall proliferieren die Zellen des D-Quadranten im Keim von *Platynereis* rascher als die anderen Blastomeren (Dorresteijn 1990). Die veränderte Teilungsabfolge in den mit Olomoucine behandelten Keimen ist sehr wahrscheinlich dafür verantwortlich, daß die Zellen des D-Quadranten die Kompetenz, als Induktoren zu wirken, nicht oder nicht rechtzeitig erwerben oder daß die Interaktionspartner der D-Zelllinie im entscheidenden Moment nicht bereitstehen, um die notwendige Positionsinformation zu empfangen. Als Konsequenz wird die dorsoventrale Polarität im Keim nur unvollständig oder gar nicht ausgeprägt.

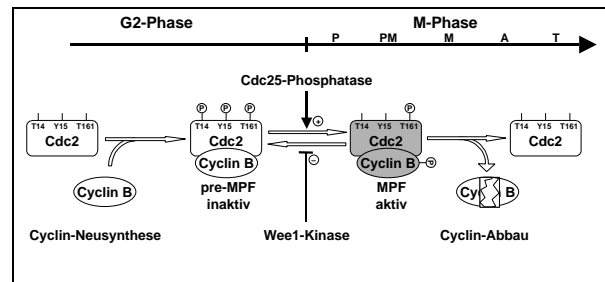
Die geschilderten Befunde aus den Olomoucine-Versuchen bestätigen unsere Annahme, daß die aus den asynchronen Furchungsteilungen resultierende, im normalen Keim strikt eingehaltene Teilungsabfolge eine notwendige Voraussetzung für die korrekte Determination der Blastomeren ist. Insofern ist die differentielle Zellzykluskontrolle ein fester Bestandteil des Determinationsgeschehens.

Olomoucine ist zur Analyse der Rolle der Zellzykluskontrolle bei der Determination der Blastomeren nur mit gewissen Einschränkungen geeignet. Als membrangängiges Molekül wirkt Olomoucine stets auf alle Blastomeren gleichzeitig. Der Zellzyklus einzelner individueller Zellen läßt sich so nicht verändern. Olomoucine wirkt erst nach einer relativ langen Inkubationszeit, wodurch eine zeitlich präzise Manipulation der Teilungsabfolge erschwert wird. Diese Probleme lassen sich in Zukunft vielleicht vermindern, indem man Olomoucine in geringeren Mengen gezielt in einzelne Blastomeren injiziert. Christian Ackermann hat die hierzu notwendige Injektionstechnik für den Keim von *Platynereis* kürzlich etabliert (Ackermann und Fischer 1999).



#### 4.3.2 MPF (*m-phase promoting factor*)

Bei eukaryontischen Zellen steuert die periodische Aktivität des MPF gegen Ende der G2-Phase den Eintritt in die M-Phase von meiotischen und mitotischen Zellzyklen (Feilotter *et al.* 1992, Kishimoto



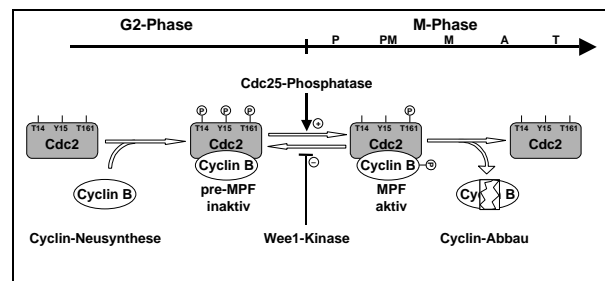
1994). Dieser universelle Zellzyklusregulator ist ein Proteinkomplex aus Cdc2 und Cyclin B. *In vitro* läßt sich die Aktivität des MPF anhand seiner Fähigkeit bestimmen, das Histon H1 zu phosphorylieren (Meijer *et al.* 1989). Mit Hilfe eines solchen Histon H1-Kinaseassays konnte ich die zyklische Aktivität des MPF für die ersten drei Furchungszyklen im Keim von *Nereis virens*, einem mit *Platynereis dumerilii* nahe verwandten Polychaeten, demonstrieren. Dabei wurde die maximale Histon H1-Kinaseaktivität jeweils etwa 20min vor jeder Furchung erreicht (3.2.2). Nach Dondua (1981) nehmen Meta- und Anaphase zusammen etwa 41% der Zellzyklusdauer während der frühen Furchungsteilungen von *Nereis virens* in Anspruch. Für das von mir untersuchte Gelege (Zellzyklusdauer 50-55min) errechnet sich also für die Zeitspanne zwischen dem Eintritt in die Metaphase und dem Beginn der Telophase (während der die Furchung einsetzt) eine Dauer von etwa 20-22min. Das Aktivitätsmaximum der Histon H1-Kinase bei *Nereis virens* würde also etwa mit dem Beginn der Metaphase zusammenfallen, und entspricht damit dem erwarteten Verlauf der MPF-Aktivität.

Nicht nur der MPF (=Cdc2/Cyclin B), sondern auch der Cdc2/Cyclin A-Komplex zeigt Histon H1-Kinaseaktivität. Der Cdc2/Cyclin A-Komplex kann ebenfalls an der Regulation des G2/M-Phasenübergangs beteiligt sein, indem er an der Aktivierung des MPF mitwirkt (Devault *et al.* 1992). In allen bisher untersuchten Organismen und Zellsystemen oszillieren die Aktivitäten beider Cdc2/Cyclin-Komplexe während der mitotischen Zellzyklen nahezu synchron, wobei Cdc2/Cyclin A sein Aktivitätsmaximum jeweils kurz vor Cdc2/Cyclin B erreicht (für Literatur siehe Tabelle 21). Hinter der von mir gemessenen Histon H1-Kinaseaktivität in Keimen von *Nereis virens* verbergen sich also wahrscheinlich die Aktivitäten beider Cdc2/Cyclin-Komplexe. Die zyklische Aktivität des MPF ist mit diesem Assay aber dennoch zweifelsfrei nachgewiesen. Durch Hemmung der meiotischen und mitotischen Teilungen mit dem Cdk-spezifischen Hemmstoff Olomoucine konnte ich indirekt auch für die Keime von *Platynereis dumerilii* wahrscheinlich machen, daß die Cdc2/Cyclin-Kinasen erst gegen Ende der G2-Phase aktiv sind und den Eintritt in die M-Phase einleiten (3.2.3, 4.3.1). Der MPF ist im Verlauf der frühen synzytialen Mitosen

von *Drosophila* konstitutiv aktiv (Edgar *et al.* 1994). In den Blastomeren von *Platynereis* hingegen oszilliert die MPF-Aktivität sehr wahrscheinlich mit jedem Zellzyklus, so wie bei *Nereis virens* (s.o.) und so wie es auch für die Keime von Seesternen (Okano-Uchida *et al.* 1998), Seeigeln (Meijer *et al.* 1989) und *Xenopus* (Hartley *et al.* 1996) beschrieben wurde. Diese Annahme wird auch durch die zyklischen Veränderungen des Cyclin-Titers während der ersten Furchungsteilung von *Platynereis dumerilii* bestärkt (s.u.). Sehr wahrscheinlich bestimmt der G2/M-Phasenübergang die Dauer der embryonalen Zellzyklen bei *Platynereis*. Die differentielle Regulation der MPF-Aktivität in den Blastomeren wäre damit verantwortlich für die Zellzyklusasynchronien im Keim. Die Veränderung der normalen Teilungsabfolge mit Hilfe des Cdc2-spezifischen Inhibitors Olomoucin beruhte wahrscheinlich auf der Unterdrückung der MPF-Aktivität und hatte schwerwiegende Folgen für die Morphogenese im Keim (4.3.1). Die Identifizierung der Gene und Proteine, welche an der Regulation der MPF-Aktivität beteiligt sind (siehe folgende Kapitel) eröffnet weitere Möglichkeiten, die Zellzyklusdauer in den Blastomeren zu verändern und die Bedeutung der normalen Teilungsabfolge für die Determination der Blastomeren zu studieren.

#### 4.3.3 Cdc2

Der enzymatisch aktive Bestandteil des MPF ist das Cdc2-Protein. Cdc2 ist während des gesamten Zellzyklus in konstanten Mengen vorhanden. Mit einem Antikörper gegen das in allen Cdc2-Proteinen



konservierte PSTAIR-Aminosäuremotiv (EGVPSTAIRISLLK) konnte ich das Cdc2-Protein in Extrakten von *Platynereis*-Keimen nachweisen (3.2.1). Der PSTAIR-Antikörper markiert in einem breiten Spektrum von Organismen (Hefe, Seestern, Goldfisch, Lachs, Karpfen, Aal, Krallenfrosch und Maus) das Cdc2-Protein (Yamashita *et al.* 1991). In Extrakten von *Xenopus*-Keimen erkennt dieser Antikörper aber außer Cdc2 auch Cdk2 (Strausfeld *et al.* 1996). Im Gegensatz zu Cdc2 spielt Cdk2 bei der Kontrolle des G1/S-Phasenüberganges eine wichtige Rolle (Nigg 1995). In *Xenopus*-Extrakten kommt Cdc2 in etwa 10fach höherer Konzentration vor als Cdk2, weshalb in früheren Studien (Dunphy *et al.* 1988) mit dem PSTAIR-Antikörper nur die Cdc2-Bande nachgewiesen wurde. Sehr wahrscheinlich wurde bei diesen frühen Untersuchungen die Farbreaktion zum Nachweis der Banden so früh abgestoppt, daß nur die Cdc2-Bande sichtbar wurde. Auch in Extrakten

von Seestern-Keimen, die ich bei meiner eigenen Arbeit als Positivkontrollen einsetzte, konnte ich mit dem a-PSTAIR-Antikörper neben Cdc2 auch noch ein weiteres Protein (=Cdk2?) mit deutlich höherer elektrophoretischer Mobilität nachweisen. Diese zusätzliche Bande ist aber nur sichtbar, wenn man sehr große Proteinmengen auf das Gel aufträgt (vergleiche Abbildung 11A und Abbildung 8C, jeweils linke Spur). Bei geringerer Probenmenge markiert der a-PSTAIR-Antikörper in Seestern-Extrakten aber ausschließlich das Cdc2-Protein (Okumura *et al.* 1996). Bei der Analyse der *Platynereis*-Proben habe ich weder besonders hohe Proteinmengen eingesetzt, noch die Farbreaktion besonders lange durchgeführt. Deshalb handelt es sich sehr wahrscheinlich bei den beiden PSTAIR-Banden von *Platynereis* ausschließlich um zwei unterschiedliche Isoformen des Cdc2-Proteins. Auch die zellzyklusabhängige Kinetik der beiden PSTAIR-Banden spricht für die Annahme, daß es sich um Cdc2-Isoformen handelt. Auch in *Xenopus* lassen sich nämlich zwei (Dunphy *et al.* 1988), in Seesternen drei (Ookata *et al.* 1992) und in *Drosophila* sogar vier (Edgar *et al.* 1994) Cdc2-Isoformen mit unterschiedlicher elektrophoretischer Mobilität nachweisen. Die Cdc2-Isoformen unterscheiden sich im Grad ihrer Phosphorylierung an den hoch konservierten Aminosäuren Threonin 14 (T-14), Tyrosin 15 (Y-15) und Threonin 161 (T-161) (Atherton-Fessler 1993, Lees 1995). Die aktive Isoform von Cdc2 ist ausschließlich an T-161 phosphoryliert und hat jeweils die höchste elektrophoretische Mobilität (jeweils die unterste Bande im SDS-Gel). Die aktive Isoform von Cdc2 ist immer nur während der M-Phase meiotischer oder mitotischer Zellzyklen nachweisbar. In unbesamten *Platynereis*-Oocyten, welche sich in der Prophase I befinden, ist zunächst nur die „obere“ PSTAIR-Bande erkennbar (Abbildung 11B, ganz linke Spur), welche vermutlich die inaktive Isoform von Cdc2 repräsentiert<sup>14</sup>. Die „untere“ PSTAIR-Bande von *Platynereis* läßt sich erst 20 Minuten nach Besamung nachweisen, wenn die Oocyten in die M-Phase der ersten meiotischen Teilung eintreten und sich das Keimbläschen auflöst. Kurz vor der Bildung des ersten Polkörperchens, also gegen Ende der M-Phase der ersten meiotischen Teilung, verschwindet diese Isoform wieder (3.2.1 Seite 65, Abbildung 11A). Bei der „unteren“, M-Phase-spezifischen PSTAIR-Bande von *Platynereis* handelt es sich sehr wahrscheinlich um die aktive, ausschließlich an Position T-161 phosphorylierte Cdc2-Isoform. Genau wie in anderen eukaryontischen Zellen ist das Cdc2-Protein auch in der

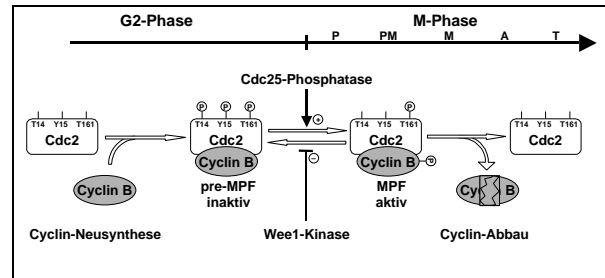
---

<sup>14</sup> Während in den meisten Eukaryonten Cdc2 durch Phosphorylierung von T-14 und Y-15 deaktiviert wird, ist inaktives Cdc2 während der meiotischen Teilungen von *Nereis virens* ausschließlich an der Aminosäure Y-15 phosphoryliert (Paterson *et al.* 1998). Der präzise Phosphorylierungsstatus des inaktiven Cdc2 bei *Platynereis* muß noch genauer analysiert werden.

Oocyte und den Blastomeren von *Platynereis* kontinuierlich in gleichbleibender Menge vorhanden. Seine Aktivität wird zum einen über die Komplexbildung mit Cyclinen und zum anderen über Phosphorylierung und Dephosphorylierung reguliert.

#### 4.3.4 Cyclin B

Die Cyclin B-Untereinheit ist ein wesentlicher Regulator der MPF-Aktivität. Cyclin B muß in den meisten Zellen im Verlauf jeder Interphase neu synthetisiert werden. Erst gegen Ende jeder G2-Phase



steht genügend Cyclin B zur Verfügung, damit eine für den Eintritt in die M-Phase, ausreichende Menge an MPF-Komplexen gebildet werden kann. Nach der Aktivierung des MPF und dem Eintritt in die M-Phase wird die Cyclin B-Untereinheit wieder vollständig abgebaut (Minshull 1993, Pines 1991, Murray 1995).

Die regulatorische Cyclin B-Untereinheit des MPF konnte ich aus Keimen von *Platynereis* zusammen mit Cdc2 affinitätschromatographisch aufreinigen und mit Hilfe eines monoklonalen Antikörpers gegen *Bufo japonicus*-Cyclin B1 (Sakamoto *et al.* 1998) nachweisen. Auch wenn es bei den meisten Eukaryonten zwei Klassen von mitotischen Cyclinen gibt (Tabelle 21), konnte ich das *Platynereis*-Cyclin aufgrund seiner Akkumulations- und Abbaukinetik mit großer Wahrscheinlichkeit als Cyclin B charakterisieren (3.2.1). Die Kinetiken der Cyclin A- und Cyclin B-Proteine unterscheiden sich nämlich während der meiotischen und mitotischen Teilungen in charakteristischer Weise. Cyclin B ist bereits während der Prophase I in unbefruchteten Oocyten von Seesternen (Okano-Uchida *et al.* 1998) und der Muschel *Spisula solidissima* (Westendorf *et al.* 1989) vorhanden, wogegen Cyclin A erst nach Besamung gegen Ende der ersten meiotischen Teilung neu synthetisiert werden muß. Das *Platynereis*-Cyclin ist ebenfalls bereits in den unbefruchteten Prophase I-Oocyten nachweisbar und wird erst nach der Besamung, kurz vor der Bildung des ersten Polkörpers rasch abgebaut (Abbildung 11B). Vergleichende Studien bei anderen Organismen haben gezeigt, daß sowohl Cyclin A als auch Cyclin B während der Interphase mitotischer Zellzyklen akkumulieren und ihre Titer zu Beginn jeder M-Phase ihr Maximum erreichen (für Literatur siehe Tabelle 21). Dabei wird Cyclin A jedoch immer vor Cyclin B wieder abgebaut und ist meist schon während der späten Metaphase nicht mehr nachweisbar. Cyclin B hingegen wird bei den meisten Organismen erst mit Beginn der Anaphase abgebaut (für Literatur siehe Tabelle 21). Auch

das von mir mit Antikörpern identifizierte *Platynereis*-Cyclin hat während des ersten Furchungszyklus sein Konzentrationsmaximum zu Beginn der Metaphase und wird erst mit Beginn der Anaphase rasch abgebaut (Abbildung 10). Diese Befunde sprechen für die Klassifizierung des *Platynereis*-Cyclins als Cyclin B. Offensichtlich wird in Oocyten von *Platynereis* maternales Cyclin B für die erste meiotische Teilung bereitgestellt (s.o.). Erst ab der zweiten meiotischen Teilung und anschließend während des ersten und wahrscheinlich auch jedes weiteren Furchungszyklus muß Cyclin B periodisch neu synthetisiert werden.

Vom *Platynereis*-Cyclin B lassen sich zwei immunoreaktive Banden mit etwas unterschiedlicher elektrophoretischer Mobilität nachweisen. Dieses Phänomen ist auch für Seeigel-Cyclin B (Meijer *et al.* 1989), *Drosophila*-Cyclin A (Lehner und O'Farrell 1989), *Xenopus*-Cyclin B1 und B2 (Minshull *et al.* 1990) und *Patella*-Cyclin A und B (van Loon *et al.* 1991) beschrieben. Es handelt sich dabei um zwei unterschiedlich phosphorylierte Cyclin-Isoformen. Sowohl in Extrakten von Seeigel- als auch von *Patella*-Keimen läßt sich die jeweils obere Cyclin-Bande durch Phosphatase-Behandlung in die untere Bande überführen (Meijer *et al.* 1989; van Loon *et al.* 1991). Obwohl die phosphorylierte Cyclin B-Bande gleichzeitig mit der Aktivität des MPF auftritt (Meijer *et al.* 1989) ist die Phosphorylierung von Cyclin B für die Kinaseaktivität des MPF nicht notwendig (Borgne *et al.* 1999). Vielmehr bewirkt die Phosphorylierung der Cyclin B-Untereinheit die Verlagerung des MPF aus dem Zytoplasma in den Kern (Li *et al.* 1997). Auch in Keimen von *Patella* wird Cyclin B kurz vor der Auflösung der Kernhülle aus dem Zytoplasma in den Kern der Blastomeren verlagert (van der Kooij *et al.* 1998). Während in Oocyten von *Nereis virens* Cyclin B erst beim Übergang von der Prophase I in die Metaphase I phosphoryliert wird (Paterson *et al.* 1998), sind in Extrakten von *Platynereis*-Keimen stets beide Cyclin B-Banden nachweisbar. Ob deshalb ein Teil des Cyclin B dauerhaft im Kern der Blastomeren von *Platynereis* lokalisiert ist muß aber in Zukunft erst noch überprüft werden.

Mit Hilfe von Cyclin B-spezifischen degenerierten Primern konnte ich aus *Platynereis*-cDNA mittels PCR ein einzelnes Genfragment amplifizieren, bei dem es sich sehr wahrscheinlich um einen Teil des *Platynereis*-Gens für Cyclin B handelt (3.3.4). Die sichere Identifizierung dieses Genfragmentes durch Klonierung und Sequenzierung steht für die Zukunft allerdings noch aus. Das genannte PCR-Fragment des Cyclin B-Transkripts ließ sich auch aus unbesamten Oocyten amplifizieren. Das würde bedeuten, daß nicht nur das Cyclin B-Protein, sondern auch die Cyclin B-mRNA maternalen Herkunft ist. Weil das ma-

ternale Cyclin B-Protein bereits nach der ersten meiotischen Teilung wieder abgebaut wird, könnte maternale Cyclin B-mRNA als Matrize zur periodischen Neusynthese während der frühen Furchungsteilungen dienen. Die Furchungszyklen könnten so unabhängig von zygotischer Transkription voranschreiten. In den Blastomeren von *Patella*-Keimen werden die Cyclin A- und Cyclin B-mRNAs (zumindest ab der dritten Furchungsteilung) während jedes Zellzyklus neu synthetisiert und wieder vollständig abgebaut (van der Kooij *et al.* 1995). In der Oocyte gespeicherte maternale Cyclin-Transkripte werden also bei *Patella* sehr früh durch zygotische mRNA's ersetzt. Im Gegensatz zu *Patella* bleiben die maternalen Cyclin A-Transkripte im Keim des Egels *Helobdella* über viele Furchungsteilungen hin erhalten. In den späten Teloblasten wird lediglich die Translation der maternalen Transkripte zellzyklusabhängig reguliert, indem die Cyclin A-Transkripte durch Proteine periodisch maskiert werden (Chen und Bissen 1997). Bisläng ist völlig offen, ob die periodische Akkumulation und Destruktion des Cyclin B im *Platynereis*-Keim wie bei *Patella* transkriptionell oder wie bei *Helobdella* posttranskriptionell reguliert wird. In jedem Fall sollte sich durch Injektion von *anti sense*-RNA die Akkumulation von Cyclin B in individuellen Blastomeren verlangsamen lassen, so daß erst zu einem späteren Zeitpunkt als normal eine genügende Menge MPF vorliegen würde, um den Eintritt in die M-Phase zu ermöglichen. Durch diesen Eingriff ließe sich die Teilungsabfolge im Keim verändern und die Folgen für die Determination der Blastomeren studieren. Van Loon *et al.* (1991) konnten durch gleichzeitige Injektion von *anti sense*-RNA für Cyclin A und Cyclin B in Oocyten von *Patella* den Eintritt in die erste meiotische M-Phase verzögern. Da jetzt auch Injektionsexperimente bei *Platynereis* möglich sind (Ackermann und Fischer 1999) bin ich zuversichtlich, daß ein vergleichbares Experiment auch bei Blastomeren von *Platynereis* gelingen kann. Dazu muß aber zunächst das amplifizierte Fragment des Cyclin B-Gens kloniert und sequenziert werden.

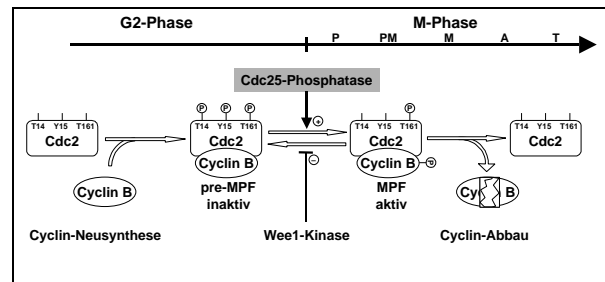
**Tabelle 21: Charakterisierung der mitotischen Cycline verschiedener Organismen.**

Spezies	Cyclin Gen	MW [kDa]		Zeitpunkt des Cyclin-Abbaus	Literatur
		Sequenz	SDS-Gel		
<i>Chlorohydra viridissima</i>	A	>48	-	-	[1]
<i>Chlorohydra viridissima</i>	B	45	-	-	[1]
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	B (CLB1) <sup>1)</sup>	55	55	Mitose	[2]
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	B (cdc13) <sup>1)</sup>	56	-	-	[3]
<i>Caenorhabditis elegans</i>	A	56	-	-	[4]
<i>Caenorhabditis elegans</i>	B	41	-	-	[4]
<i>Patella vulgata</i>	A	48	52	Mitose <sup>2)</sup>	[5]
<i>Patella vulgata</i>	B	46	50	Mitose <sup>2)</sup>	[5]
<i>Spisula solidissima</i>	A	48	57	späte Metaphase	[6]
<i>Spisula solidissima</i>	B	48	56	M/A-Übergang <sup>3)</sup>	[6] [7]
<i>Helobdella triserialis</i>	A	>43	-	-	[8]
<i>Helobdella triserialis</i>	B3	57	-	-	[9]
<i>Drosophila melanogaster</i>	A	56	60	Metaphase	[10]
<i>Drosophila melanogaster</i>	B	59	65	M/A-Übergang <sup>3)</sup>	[11]
<i>Hemicentrotus pulcherrimus</i>	A (HpCycA)	51	56 <sup>4)</sup>	-	[12]
<i>Arbacia punctulata</i>	B	46	56; 46 <sup>4)</sup>	M/A-Übergang <sup>3)</sup>	[13] [14]
<i>Asterina pectinifera</i>	A	49	50	Metaphase	[15]
<i>Asterina pectinifera</i>	B	47	48	M/A-Übergang <sup>3)</sup>	[16] [17]
<i>Xenopus laevis</i>	A1	47	60	Prophase, vor Kernhüllauflösung	[18]
<i>Xenopus laevis</i>	B1	45	57	nach der Auflösung der Kerne	[19]
<i>Homo sapiens</i>	A	48	60	Metaphase	[20]
<i>Homo sapiens</i>	B (CCNB1)	50	62	M/A-Übergang <sup>3)</sup>	[21]

<sup>1)</sup> Aus Hefen konnte bisher kein Cyclin A isoliert werden. Vielmehr gibt es eine größere Anzahl unterschiedlicher Cyclin B Proteine mit unterschiedlichen Kinetiken und Funktionen; <sup>2)</sup> Die zeitliche Auflösung der Untersuchung war zu grob, um Unterschiede zwischen den Kinetiken von Cyclin A und B aufzuzeigen; <sup>3)</sup> M/A-Übergang: Übergang von der Meta- zur Anaphase <sup>4)</sup> Daten von *Sphaerechinus granularis* Cyclinen; [1] Scheurlen et al. 1996; [2] Ghiara et al. 1991; [3] Hagan et al. 1988; [4] Kreutzer et al. 1995; [5] van Loon et al. 1991; [6] Swenson et al. 1986; [7] Westendorf et al. 1989; [8] Chen und Bissen 1997; [9] Bissen und Anderson 1996; [10] Lehner und O'Farrell 1989; [11] Lehner und O'Farrell 1990; [12] Kurokawa et al. 1997; [13] Evans et al. 1983; [14] Pines und Hunt 1987; [15] Okano-Uchida et al. 1998; [16] Tachibana et al. 1990; [17] Ookata et al. 1995; [18] Minshull et al. 1990; [19] Minshull et al. 1989; [20] Pines und Hunter 1990; [21] Pines und Hunter 1989

#### 4.3.5 Cdc25

Die Cdc25-Proteinphosphatase aktiviert den MPF, indem sie zwei inhibierende Phosphatreste an den Aminosäuren Threonin 14 (T-14) und Tyrosin 15 (Y-15) der Cdc2-Untereinheit entfernt (Millar und



Russel 1992). Das Cdc25-Protein konnte ich in *Platynereis*-Embryonen bisher nicht sicher nachweisen. Ein Antikörper gegen Seestern-Cdc25 erkennt zwar in Extrakten von *Platynereis*-Keimen mehrere Proteine, diese weisen aber nicht die für Cdc25 typische zellzyklusabhängige Dynamik auf (3.2.1 Seite 64). Weder der Titer der von dem Antikörper markierten Proteine noch deren elektrophoretische Mobilität verändert sich im Verlauf meiotischer oder mitotischer Zellzyklen. Das Cdc25-Protein wird in der Hefe *Schizosaccharomyces pombe* (Moreno *et al.* 1990) und in den Postblastodermzellen von *Drosophila* (Edgar *et al.* 1994) im Laufe der Interphase jedes Zellzyklus neu synthetisiert, erreicht seinen maximalen Titer zu Beginn jeder M-Phase und wird anschließend rasch und vollständig abgebaut. Während der frühen synzytialen Mitosen von *Drosophila* (Edgar *et al.* 1994) und während der meiotischen und frühen mitotischen Teilungen von *Xenopus*- (Izumi *et al.* 1992) und Seestern-Keimen (Okano-Uchida *et al.* 1998) ist der Cdc25-Titer zwar konstant, aber in diesen Fällen weist das Protein im SDS-Gel eine zellzyklusabhängig variierende elektrophoretische Mobilität zwischen 76 und 92kDa bei *Xenopus* (Izumi *et al.* 1992) und zwischen 80 und 90kDa beim Seestern (Okano-Uchida 1998) auf. Dieser *mobility shift* beruht auf der periodischen Phosphorylierung und Dephosphorylierung des Proteins und ist kurz nach der Besamung besonders ausgeprägt.

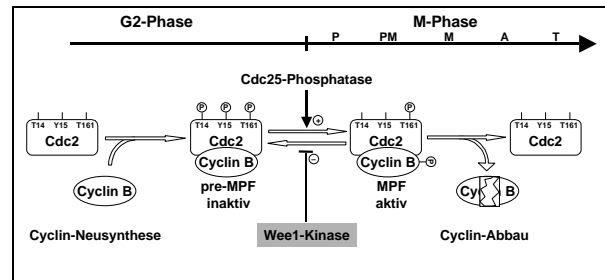
Auch wenn ein direkter Nachweis des Cdc25-Proteins nicht gelang, konnte ich doch zumindest die *cdc25*-mRNA mittels RT-PCR in Keimen von *Platynereis* nachweisen (3.3.5). Die Klonierung und Sequenzierung dieses Fragmentes soll in allernächster Zukunft erfolgen. Mit einem Cdc25-Fragment wird man das vollständige Gen aus den Genbanken isolieren, das Protein *in vitro* herstellen, und spezifische Antikörper gegen das Cdc25-Protein erzeugen können. Mit Hilfe dieser Antikörper wird es dann auch gelingen, das Cdc25-Protein und seine zellzyklusabhängige Dynamik in Extrakten von *Platynereis*-Keimen darzustellen. Im Keim des Egels *Helobdella* wird die Transkription der *Cdc25*-mRNA zellinienspezifisch reguliert, was möglicherweise in direktem Zusammenhang mit deren unterschiedlicher Zellzyklusdauer steht (Bissen 1995). Die jeweilige Dauer der asynchronen Zellzyklen im Postblastodermstadium des *Drosophila*-Embryos wird durch



periodische Cdc25-Expression reguliert (Edgar *et al.* 1994). Auch im Keim von *Patella* muß das Cdc25-Transkript während der späten extrem asynchronen Furchungsteilungen mit jedem Zellzyklus neu transkribiert werden (van der Kooij *et al.* 1998). Die Verfügbarkeit des Cdc25-Gens, des Cdc25-Proteins und der spezifischen Cdc25-Antikörper würde deshalb interessante Möglichkeiten zur Manipulation der asynchronen Furchungszyklen im Keim von *Platynereis* eröffnen.

#### 4.3.6 Wee1

Die Wee1-Proteinkinase ist ein Gegenspieler der Cdc25-Phosphatase bei der Regulation der MPF-Aktivität. Sie inhibiert die MPF-Aktivität, indem sie das Cdc2-Protein an der Aminosäure Tyrosin 15



(Y-15) phosphoryliert (O'Connell *et al.* 1997, den Haese *et al.* 1995, Lundgren *et al.* 1991). Aus einer embryonalen cDNA-Bank von *Platynereis* konnte ich mehrere wee1-positive Klone isolieren und daraus die Sequenz der wee1-mRNA ermitteln (3.3.2). Das 3898 Nukleotide lange Transkript beinhaltet einen vollständigen offenen Leserahmen von 1845 Nukleotiden. Die Analyse der abgeleiteten Sequenz von 614 Aminosäuren zeigt eindeutig, daß es sich um das Transkript eines Gens für das *Platynereis*-Homologon der Wee1-Proteinkinase handelt (Abbildung 19). Im Bereich der Kinase-Domäne sind im Vergleich mit den Wee1-Proteinen anderer höherer Eukaryonten 57-61% der Aminosäuren identisch. Das Wee1-Protein von *Platynereis* (Wee1<sub>Pd</sub>) weist insbesondere 12 Wee1-spezifische, hoch konservierte Aminosäuren auf und läßt sich daher klar gegen andere Wee1-ähnliche Proteinkinasen, wie die Myt1-Kinasen des Menschen und von *Xenopus laevis* und die mik1-Kinase der Hefe *Schizosaccharomyces pombe* (3.3.2, Seite 84) abgrenzen.

Die Aktivität der Wee1-Kinase wird sowohl auf der mRNA- als auch auf der Proteinebene zeitlich und räumlich präzise reguliert. Das Transkript eines wee1-Gens von *C. elegans* ist nur während des 12-16-Zellstadiums und nur in den Zelllinien E und AB nachweisbar (Wilson *et al.* 1999). Im Embryo von *Drosophila* sind während der Phase der synzytialen Mitosen große Mengen eines maternalen wee1-Transkriptes nachweisbar. Die maternale wee1-mRNA wird während des 14. Zellzyklus, d. h. zu Beginn der *mid blastula transition* (MBT), vollständig abgebaut und anschließend durch geringere Titer an zygotischer wee1-mRNA ersetzt (Campbell *et al.* 1995). Auch in Seeigel-Keimen verändert sich der Titer der wee1-mRNA während der MBT, indem er zwischen der sechsten und neunten Furchung

drastisch ansteigt (Nemer *et al.* 1996). Während dieser Phase nimmt die Dauer der Zellzyklen stetig zu, es lassen sich erstmalig Gap-Phasen nachweisen und die Blastomeren teilen sich nicht länger synchron. Diese Beobachtungen stehen in Einklang mit der Funktion von Wee1 als Inhibitor des MPF. Die fünfte Furchungsteilung stellt im Keim von *Platynereis dumerilii* eine der MBT analoge Entwicklungsperiode dar (Dorresteijn 1990). Sowohl die Zellzyklusdauer der meisten Blastomeren, als auch die Teilungsasynchronien nehmen ab der fünften Furchung dramatisch zu. Mit Hilfe von *northern blot*-Analysen und *in situ*-Hybridisierungen soll in Zukunft untersucht werden, ob sich auch die Expression des *wee1*-Gens von *Platynereis* im Verlauf der Embryonalentwicklung ändert und ob sich dabei Unterschiede zwischen verschiedenen Zelllinien beobachten lassen.

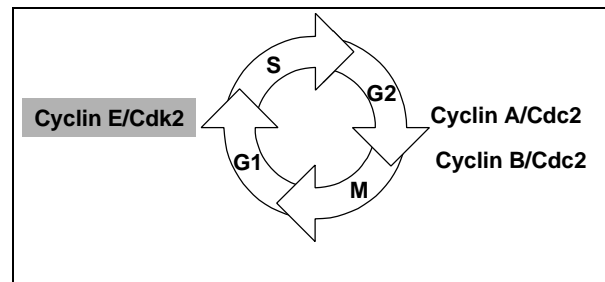
Auf der Proteinebene wird die Aktivität der Wee1-Kinase vor allem über den jeweiligen Phosphorylierungszustand gesteuert. Während der Interphase ist das Protein nicht phosphoryliert, und die Wee1-Aktivität ist hoch. Durch Phosphorylierung seiner N-terminalen Domäne wird Wee1 beim Eintritt in die M-Phase deaktiviert, so daß die Hemmung des MPF aufgehoben wird (Mueller *et al.* 1995, Murakami und vande Woude 1998, Watanabe *et al.* 1995, Parker *et al.* 1993). Als potentielle Phosphorylierungsstellen wurden in vielen Wee1-Proteinen Serin- (S) und Threoninreste (T) jeweils gefolgt von einem Prolinrest (P) identifiziert (Aligue *et al.* 1997, Nemer und Stuebing 1996, Nigg 1993, Mueller *et al.* 1995). Das *Platynereis*-Wee1-Protein weist ebenfalls 13 solcher S/T-P-Sequenzen auf, davon neun im N-terminalen Bereich (umrahmt in Abbildung 18).

In einigen eukaryontischen Zellen akkumuliert das Wee1-Protein im Verlauf der Interphase und wird während der M-Phase rasch wieder abgebaut (Aligue *et al.* 1997, Watanabe *et al.* 1995). Bei der Degradation der Wee1-Kinase spielen möglicherweise sogenannte PEST-Sequenzen eine Rolle. Diese proteolytischen Signalsequenzen (Rogers *et al.* 1986, Rechsteiner und Rogers 1996) wurden innerhalb der Aminosäuresequenzen aller bekannten Wee1-Proteine gefunden (Nemer und Stuebing 1996). Das *Platynereis*-Wee1-Protein enthält drei solcher Sequenzabschnitte (umrahmt in Abbildung 18). Sehr wahrscheinlich wird auch die Aktivität von Wee1<sub>pd</sub> während der Furchungszyklen von *Platynereis* zeitlich präzise reguliert. Inwieweit dabei die PEST-Sequenzen und die mutmaßlichen Phosphorylierungsstellen eine Rolle spielen, kann erst überprüft werden, wenn das *Platynereis*-Wee1-Protein *in situ* nachgewiesen werden kann. In Zukunft soll deshalb das Wee1-Protein von *Platynereis* ausgehend von der isolierten cDNA *in vitro* hergestellt und zur Produktion spezifischer Antikörper verwendet werden mit denen dann das Protein im SDS-Gel oder *in situ* markiert werden kann. Eine weitere interessante

Perspektive für zukünftige Forschungsarbeiten wäre die Injektion von *sense*- oder *anti sense*-RNA in individuelle Blastomeren mit dem Ziel, deren Zellzyklusdauer zu verlangsamen bzw. zu beschleunigen. Wenn die präzise Teilungsabfolge für die Determination der Blastomeren kritisch wäre, sollten diese Experimente zu definierten morphogenetischen Defekten führen.

#### 4.3.7 Cyclin E

Die bisher besprochenen Gene und ihre Proteine (4.3.2 bis 4.3.6) sind alle in die Regulation des G2/M-Phasenüberganges einbezogen. Ein ähnlicher, aber bisher weniger detailliert untersuchter Kontrollpunkt



ist der G1/S-Kontrollpunkt. Für den Eintritt in die S-Phase ist die Aktivität eines Komplexes aus Cyclin E und Cdk2 notwendig (Reed 1996, Sauer und Lehner 1995). In somatischen Zellen akkumuliert Cyclin E periodisch und sein Titer erreicht ein Maximum gegen Ende der G1-Phase. Nach dem Eintritt in die S-Phase wird Cyclin E rasch wieder abgebaut. Während der frühen Furchungszyklen vieler Embryonen beginnt die S-Phase unmittelbar im Anschluß an die M-Phase, so daß eine G1-Phase fehlt. So wird verständlich, daß das Cyclin E-Protein in den Furchungszellen des Zebrafisches (Yarden und Geiger 1996) und von *Xenopus* (Rempel *et al.* 1995), bzw. in der synzytialen Phase des Keim von *Drosophila* (Duronio und O'Farrell 1995, Richardson *et al.* 1995, Richardson *et al.* 1993) stabil und konstant vorhanden ist. Während der *mid blastula transition* (MBT) vieler Embryonen verlängern sich die Zellzyklen dramatisch, wobei häufig erstmals eine G1-Phase in die Zellzyklen eingefügt wird (Andéol 1994). Zu diesem Zeitpunkt werden die maternalen Ressourcen an Cyclin E-mRNA abgebaut, und der Titer des Cyclin E-Proteins fluktuiert anschließend mit jedem Zellzyklus (Hartley *et al.* 1997, Knoblich *et al.* 1994, Richardson *et al.* 1995, Richardson *et al.* 1993).

Ich konnte nun aus der mRNA von Furchungszellen ein Fragment eines Gens für ein *Platynereis*-Cyclin E amplifizieren und klonieren (3.3.3). Die aus der Nukleotidsequenz abgeleitete Aminosäuresequenz konnte aufgrund einer Reihe Cyclin E-spezifischer Aminosäuren und eines Sequenzvergleichs mit anderen Cyclin-Proteinen eindeutig als Cyclin E charakterisiert werden (Abbildung 22). Durch *in situ*-Hybridisierung mit *anti sense*-RNA soll in Zukunft aufgeklärt werden, ob auch während der ersten Furchungsteilungen von *Platynereis* Cyclin E konstitutiv exprimiert wird. Die ständige

Aktivität des Cyclin E-Proteins könnte nämlich für das fehlen der G1-Phase in den frühen Furchungszyklen (Heimann 1994) verantwortlich sein. Eventuell wird es auch möglich sein, durch Injektion von *anti sense*-RNA den Cyclin E-Titer abzusenken und so eine G1-Phase künstlich in den Zellzyklus individuellen Blastomeren einzufügen. Das würde nicht nur die normale Teilungsabfolge im Keim verändern, sondern womöglich auch die vorzeitige Expression von Entwicklungsgenen ermöglichen.

#### **4.4 Schlußbetrachtung**

Ich konnte im Rahmen dieser Arbeit zeigen, daß in Keimen inäqual furchender Spiraliern die Determination der Blastomeren und die Ausbildung einer dorsoventralen Polarität im Keim von der strikten Einhaltung der normalen Teilungsabfolge abhängt. Ein wichtiges, allen inäqual furchenden Spiraliern gemeinsames Motiv ist dabei der Teilungsvorsprung der CD-Blastomere gegenüber der AB-Blastomere bei der zweiten Furchungsteilung. In evolutiver Hinsicht könnten Zellzyklusasynchronien zwischen den Blastomeren zu einem Wechsel von einer späten induktiven zu einer frühen zellautonomen Determination des D-Quadranten geführt haben. In ontogenetischer Hinsicht ist der Teilungsvorsprung der D-Zelllinie sehr wahrscheinlich notwendig, damit die als Organisatoren wirkenden Zellen des D-Quadranten zeitlich korrekt mit ihren benachbarten Interaktionspartnern zusammentreffen. Auf zellbiologischer Ebene ist die überproportionale Ausstattung mit dotterfreiem Zytoplasma die Ursache für den gegenüber der AB-Blastomere verkürzten Zellzyklus der CD-Blastomere. Auf molekularer Ebene ist sehr wahrscheinlich der unterschiedliche Zeitpunkt der MPF-Aktivierung für die unterschiedliche Dauer der Zellzyklen verantwortlich. Mit der Charakterisierung wesentlicher Zellzyklusregulatoren von *Platynereis* ist die Grundlage gelegt worden, um die differentielle Zellzyklusregulation molekularbiologisch zu untersuchen. Die erfolgreich klonierten Gene (*wee1*, Cyclin E) ermöglichen in Zukunft, durch Injektion von *sense*- und *anti sense*-RNA die Zellzyklen individueller Blastomeren zu manipulieren. Die Abfolge der Furchungsteilungen kann so ganz gezielt verändert werden, und eventuell bewirkte morphogenetische Defekte können dann sehr genau einzelnen Blastomeren und Determinationsereignissen zugeordnet werden. Die im Rahmen dieser Arbeit konstruierten vier embryonalen cDNA-Banken (3.3.1) eröffnen darüber hinaus die Möglichkeit, auch andere für die Embryonalentwicklung relevante Gene (z.B. die Segmentierungsgene) zu isolieren und deren Bedeutung für *Platynereis* auf molekularer Ebene zu untersuchen.

## 5 Literatur

- Abraham RT, Acquarone M, Andersen A, Asensi A, Belle R, Berger F, Bergounioux C, Brunn G, Buquet-Fagot C, Fagot D, Glab N, Goudeau H, Goudeau M, Guerrier P, Houghton P, Hendriks H, Kloareg B, Lippai M, Marie D, Maro B, Meijer L, Mester J, Mulner-Lorillon O, Poulet SA, Schierenberg E, Schutte B, Vaulot D, Verlhac MH (1995) Cellular effects of olomoucine, an inhibitor of cyclin-dependent kinases. *Biol Cell*, 83 (2-3): 105-120
- Ackermann CF, Fischer A (1999) Cell lineage study by microinjection of fluorochrome markers in blastomeres of *Platynereis dumerilii* (Annelida, Polychaeta). *Zoology Analysis of Complex Systems*, 102 (Suppl 2): 20
- Aligue R; Wu L; Russell P (1997) Regulation of *Schizosaccharomyces pombe* Wee1 tyrosine kinase. *J Biol Chem*, 272 (20): 13320-13325
- Ambros V (1999) Cell cycle-dependent sequencing of cell fate decisions in *Caenorhabditis elegans* vulva precursor cells. *Dev*, 126 (9): 1947-1956
- Andéol Y (1994) Early transcription in different animal species: implication for transition from maternal to zygotic control in development. *Roux's Arch Dev Biol*, 204: 3-10
- Arion D, Meijer L, Brizuela L, Beach D (1988) Cdc2 is a component of the M phase-specific histone H1 kinase: Evidence for identity with MPF. *Cell*, 55: 371-378
- Arnolds WJA, van den Biggelaar JAM, Verdonk NH (1983) Spatial aspects of cell interactions involved in the determination of dorsoventral polarity in equally cleaving gastropods and regulative abilities of their embryos, as studied by micromere deletions in *Lymnaea* and *Patella*. *W Roux's Arch Dev Biol*, 192: 75-85
- Astrow S, Holton B, Weisblat D (1987) Centrifugation redistributes factors determining cleavage patterns in leech embryos. *Dev Biol*, 120: 270-283
- Atherton-Fessler S, Hannig G, Piwnica-Worms H (1993) Reversible tyrosine phosphorylation and cell cycle control. *Sem Cell Biol*, 4: 433-42
- Azzaria M, McGhee JD (1992) DNA synthesis in the early embryo of the nematode *Ascaris suum*. *Dev Biol*, 152: 89-93
- Azzi L, Meijer L, Reed SI, Pidikiti R, Tung HYL (1992) Interaction between the cell-cycle-control proteins p34<sup>cdc2</sup> and p9<sup>CKShs2</sup> Evidence for two cooperative binding domains in p9<sup>CKShs2</sup>. *Eur J Biochem*, 203: 353-360
- Bissen ST (1995) Expression of the cell cycle control gene, *cdc25*, is constitutive in the segmental founder cells but is cell-cycle-regulated in the micromeres of leech embryos. *Dev*, 121: 3035-3043
- Bissen S. (1997) Developmental control of cell division in leech embryos. *BioEssays*, 19 (2): 201-207
- Bissen ST, Anderson JC (1996) Isolation of leech cyclin B3 gene. EMBL Nucleotide Sequence Databases, Accession-number: U55259
- Bissen ST, Weisblat DA (1989) The durations and compositions of cell cycles in embryos of the leech, *Helobdella triserialis*. *Dev*, 106: 105-118
- Blochmann F (1883) Beiträge zur Kenntnis der Entwicklung der Gastropoden. *Z Wiss Zool*, 38: 392-410

- Borgne A, Ostvold AC, Flament S, Meijer L (1999) Intra-M phase-promoting factor phosphorylation of cyclin B at the prophase/metaphase transition. *The Journal of Biological Chemistry*, 274 (17): 11977-11986
- Boring L (1989) Cell-cell interactions determine the dorsoventral axis in embryos of an equally cleaving ophistobranch mollusc. *Dev Biol*, 136: 239-253
- Boyer B, Henry JQ (1998) Evolutionary modifications of the spiralian developmental program. *Am Zool*, 38: 621-633
- Brizuela L, Draetta G, Beach D (1987) p13<sup>suc1</sup> acts in the fission yeast cell division cycle as a component of the p34cdc2 protein kinase. *EMBO J*, 6 (11): 3507-3514
- Campbell SD, Sprenger F, Edgar BA, O'Farrel PH (1995) *Drosophila* wee1 kinase rescues fission yeast from mitotic catastrophe and phosphorylates *Drosophila* cdc2 *in vitro*. *Mol Biol Cell*, 6: 1333-1347
- Carazzi D (1900) L'embriologia dell' *Aplysia limacina* L. *Anat Anz*, 17: 77-102
- Carazzi D (1905-6) L'Embriologia dell' *Aplysia* e i problemi fondamentali dell'embriologia comparata. *Arch Ital Anat Embriol*, 4,5: 231-305, 459-504
- Cather JN, Verdonk NH (1974) The development of *Bithynia tentaculata* (Prosobranchia, Gastropoda) after removal of the polar lobe. *J Embryol Exp Morphol*, 31: 415-422
- Cather JN, Verdonk NH (1979) Development of *Dentalium* following removal of the D-Quadrant blastomeres at successive cleavage stages. *W Roux's Arch Dev Biol*, 187: 355-366
- Cather JN, Verdonk NH, Dohmen MR (1976) Role of the vegetal body in the regulation of development in *Bithynia tentaculata* (Prosobranchia, Gastropoda). *Am Zool*, 16: 455-468
- Chen Y, Bissen ST (1997) Regulation of cyclin A mRNA in leech embryonic stem cells. *Dev Genes Evol*, 206: 407-415
- Chomcinski P, Sacchi N (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*, 162: 156-159
- Clark JM (1988) Novel non-templated nucleotide addition reactions catalyzed by procaryotic and eucaryotic DNA-Polymerases. *Nucl Acids Res*, 16 (20): 9677-9686
- Clement AC (1962) Development of *Ilyanassa* following removal of the D macromere at successive cleavage stages. *J Exp Zool*, 149: 193-215
- Clement AC (1963) Effects of micromere deletion on development in *Ilyanassa*. *Biol Bull*, 125: 375
- Clement AC (1967) The embryonic value of the micromeres in *Ilyanassa obsoleta*, as determined by deletion experiments. I. The first quartet cells. *Clement AC*, 166 (1): 77-88
- Colas P, Serras F, van Loon AE (1993) Microinjection of suc1 transcripts delays the cell cycle clock in *Patella vulgata* embryos. *Int J Dev Biol*, 37: 589-594
- Compton T (1990) Degenerate Primers for DNA Amplification. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (eds) *PCR-Protocols - a guide to methods and applications*, Academic Press inc., San Diego, Ca: 39-45
- Damen P, Dictus WJAG (1996) Organiser role of the stem cell of the mesoderm in prototroch patterning in *Patella vulgata* (Mollusca, Gastropoda). *Mech Dev*, 56: 41-60
- den Haese GJ, Walworth N, Carr AM, Gould KL (1995) The wee1 protein kinase regulates T14 phosphorylation of fission yeast cdc2. *Mol Biol Cell*, 6: 371-385

- Devault A, Fesquet D, Cavadore JC, Garrigues AM, Labbe JC, Lorca T, Picard A, Philippe M, Doree M (1992) Cyclin A potentiates maturation-promoting factor activation in the early *Xenopus* embryo via inhibition of the tyrosine kinase that phosphorylates cdc2. *J Cell Biol*, 118 (5): 1109-1120
- Dondua AK (1981) Structure of the cell cycle during the period of early cleavage in the polychaete *Nereis virens* Sars.. *Sov J Dev Biol*, 11: 376-379
- Dondua AK, Dorresteijn AWC, Kostyuchenko RP, Fedorova ZhE, Fischer A (1996) Effect of aphidicolin on the differentiation of trochoblasts in early ontogenesis of polychaetes. *Russian J Dev Biol*, 27 (6): 341-347
- Dondua AK, Fedorova ZhE (1982) Cell cycles at different phases of embryonic and larval development of *Nereis virens* Sars. *Sov J Dev Biol*, 12: 341-347
- Dorresteijn AWC (1990) Quantitative analysis of cellular differentiation during early embryogenesis. *Roux's Arch Dev Biol*, 199: 14-30
- Dorresteijn AWC (1997/98) How do spiralian embryos accomplish cell diversity? *Zoology Analysis of Complex Systems*, 100: 307-319
- Dorresteijn AWC, Bornewasser H, Fischer A (1987) A correlative study of experimentally changed first cleavage and janus development in the trunk of *Platynereis dumerilii* (Annelida, Polychaeta). *Roux's Arch Dev Biol*, 196: 51-58
- Dorresteijn AWC, Eich P (1991) Experimental change of cytoplasmic composition can convert determination of blastomeres in *Platynereis dumerilii* (Annelida, Polychaeta). *Roux's Arch Dev Biol*, 200: 342-351
- Dorresteijn AWC, Fischer A (1988) The process of early development. In: Westheide W, Hermans CO (eds) *Mikrofauna Marina - Volume 4: The Ultrastructure of Polychaetes*, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart: 335-352
- Dorresteijn AWC, Graffy C (1993) Competence of blastomeres for the expression of molecular tissue markers is acquired by diverse mechanisms in the embryo of *Platynereis* (Annelida). *Roux's Arch Dev Biol*, 202: 270-275
- Dorresteijn AWC, Luetjens CM (1994) Morphometric analysis of cellular specification in *Platynereis* and *Pomatoceros* embryogenesis (Annelida, Polychaeta). *Mem Mus Nat Hist Nat*, 162: 45-50
- Dorresteijn AWC, O'Grady B, Fischer A, Porchet-Henneré, Boilly-Marer Y (1993) Molecular specification of cell lines in the embryo of *Platynereis* (Annelida). *Roux's Arch Dev Biol*, 202: 260-269
- Dunphy WG, Brizuela L, Beach D, Newport J (1988) The *Xenopus* cdc2 protein is a component of MPF, a cytoplasmic regulator of mitosis. *Cell*, 54: 423-431
- Duronio RJ, O'Farrell PH (1995) Developmental control of the G1 to S transition in *Drosophila*: cyclin E is a limiting downstream target of E2F. *Genes Dev*, 9: 1456-1468
- Edgar BA, Kiehle CP, Schubiger G (1986) Cell cycle control by the nucleo-cytoplasmic ratio in early *Drosophila* development. *Cell*, 44: 365-372
- Edgar BA, O'Farrell PH (1989) Genetic control of cell division patterns in the *Drosophila* embryo. *Cell*, 57 (1): 177-187
- Edgar BA, Sprenger F, Duronio RJ, Leopold P, O'Farrell PH (1994) Distinct molecular mechanisms regulate cell cycle timing at successive stages of *Drosophila* embryogenesis. *Genes Dev*, 8: 440-452

- Edgar LG, McGhee JD (1988) DNA synthesis and the control of embryonic gene expression in *C. elegans*. *Cell*, 53: 589-599
- Endicott JA, Nurse P (1995) The cell cycle and *sucl*: from structure to function. *Structure*, 3: 321-325
- Evans T, Rosenthal ET, Youngblom J, Distel D, Hunt T (1983) Cyclin: A protein specified by maternal mRNA in sea urchin eggs that is destroyed at each cleavage division. *Cell*, 33: 389-396
- Feilotter H, Lingner C, Rowley R, Young PG (1992) Regulation of the G2-mitosis transition. *Biochem Cell Biol*, 70: 954-971
- Fischer A (1971) Der Einfluß des *or*-Gens auf die Pigmentierung bei *Platynereis dumerilii* (Polychaeta). II. Pigmentierung als Wirkung mütterlicher oder generationseigener *or*-Gene. *W Roux Arch Entwicklungsmech Org*, 168: 242-268
- Fischer A, Dorresteijn AWC, Hoeger U (1996) Metabolism of oocyte construction and the generation of histospecificity in the cleaving egg - lessons from nereid annelids. *Int J Dev Biol*, 40: 421-430
- Fitzgerald M, Shenk T (1981) The sequence 5'-AAUAAA-3' forms parts of the recognition site for polyadenylation of late SV40 mRNAs. *Cell*, 24 (1): 251-260
- Freeman G, Lundelius JW (1992) Evolutionary implications of the mode of D quadrant specification in coelomates with spiral cleavage. *J Evol Biol*, 5 (2): 205-247
- Gallant P, Nigg EA (1992) Cyclin B2 undergoes cell cycle-dependent nuclear translocation and, when expressed as a non-destructible mutant, causes mitotic arrest in HeLa cells. *J Cell Biol*, 117: 213-224
- Gelfand DH, White TJ (1990) Thermostable DNA-polymerases. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (eds) *PCR-Protocols - a guide to methods and applications*, Academic Press inc., San Diego, Ca: 129-141
- Ghiara JB, Richardson HE, Sugimoto K, Henze M, Lew DJ, Wittenberg C, Reed SI (1991) A cyclin B homolog in *S. cerevisiae*: chronic activation of the Cdc28 protein kinase by cyclin prevents exit from mitosis. *Cell*, 65: 163-174
- Gish W (1996-99) WU-Blast Vers-2.0. The Washington University BLAST Archives, Washington University School of Medicine, St. Louis, MO: <http://blast.wustl.edu>
- Glauert AM, Rogers GE, Glauert RH (1965) A new embedding medium for electron microscopy. *Nature*, 178 (4537): 803
- Goldstein B, Freeman G (1997) Axis specification in animal development. *BioEssays*, 19 (2): 105-116
- Guerrier P, van den Biggelaar JAM, Dongen CAM, Verdonk NH (1978) Significance of the polar lobe for the determination of dorsoventral polarity in *Dentalium vulgare* (da Costa). *Dev Biol*, 63: 233-242
- Hagan I, Hayles J, Nurse P (1988) Cloning and sequencing of the cyclin-related *cdc13+* gene and a cytological study of its role in fission yeast mitosis. *J Cell Sci*, 91: 587-595
- Hanahan D (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol*, 166: 557-580
- Hanks SK, Hunter T (1995) The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. *FASEB J*, 9: 576-596
- Hartley RS, Rempel RE, Maller JL (1996) *In vivo* regulation of the early embryonic cell cycle in *Xenopus*. *Dev Biol*, 173: 408-419
- Hartley RS, Sible JC, Lewellyn AL, Maller JL (1997) A role for cyclin E/Cdk2 in the timing of the midblastula transition in *Xenopus* embryos. *Dev Biol*, 188 (2): 312-321



- Hauenschild C, Fischer A (1969) *Platynereis dumerilii*: Mikroskopische Anatomie, Fortpflanzung, Entwicklung. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart: 1-55
- Heimann C (1994) Struktur der Zellzyklen im Verlauf der frühen Embryonalentwicklung von *Platynereis dumerilii* (Annelida, Polychaeta). Diplomarbeit, Johannes Gutenberg Universität, Mainz: 1-59
- Henry JJ, Martindale MQ (1987) The organizing role of the D quadrant as revealed through the phenomenon of twinning in the polychaete *Chaetopterus variopedatus*. Roux's Arch Dev Biol, 196: 499-510
- Hinegardner RT, Rao B, Feldman DE (1964) The DNA synthetic period during early development of the sea urchin egg. Exp Cell Res, 36 (1): 53-61
- Holtzer H, Rubinstein N, Fellini S., Yeoh G., Chi J., Birnbaum J., Okayama M. (1975) Lineages, quantal cell cycles, and the generation of cell diversity. Quarterly Reviews of Biophysics, 8 (4): 523-557
- Holtzer H., Weintraub H., Mayne R., Mochan B. (1973) The cell cycle, cell lineages, and cell differentiation. Curr Top Dev Biol, 87: 229-256
- Howe JA, Howell M, Hunt T, Newport JW (1995) Identification of a developmental timer regulating the stability of embryonic cyclin A and a new somatic A-type cyclin at gastrulation. Genes Dev, 9: 1164-1176
- Hutchison C, Glover DM (eds.) (1995) Cell cycle control. In: Frontiers in molecular biology, Volume 10, Oxford University Press, Oxford
- Ihara J, Yoshida N, Tanaka T, Mita K, Yamashita M (1998) Either cyclin B1 or B2 is necessary and sufficient for inducing germinal vesicle breakdown during frog (*Rana japonica*) oocyte maturation. Mol Reprod Dev, 50: 499-509
- Innis MA, Gelfand DH (1990) Optimization of PCRs. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (eds) PCR-Protocols - a guide to methods and applications, Academic Press inc., San Diego, Ca: 3-12
- Izumi T, Walker DH, Maller JL (1992) Periodic changes in phosphorylation of the *Xenopus cdc25* phosphatase regulate its activity. Mol Biol Cell, 3 (8): 927-939
- Jacobs T (1992) Control of the cell cycle. Dev Biol, 153: Jan 15
- Kawasaki E (1990) Amplification of RNA. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (eds) PCR-Protocols - a guide to methods and applications, Academic Press inc., San Diego, Ca: 21-27
- Kishimoto T (1994) Cell reproduction: induction of M-phase events by cyclin-dependent cdc2 kinase. Int J Dev Biol, 38: 185-191
- Kishimoto T (1999) Oocyte maturation and spawning in starfish. Encycl Reprod, 3: 481-488
- Kishimoto T (1999) Activation of MPF at meiosis reinitiation in starfish oocytes. Dev Biol, 214: 1-8
- Kluge B, Lehmann-Greif M, Fischer A (1995) Long-lasting exocytosis and massive structural reorganisation in the egg periphery during cortical reaction in *Platynereis dumerilii* (Annelida, Polychaeta). Zygote, 3: 141-156
- Knoblich JA, Sauer K, Jones L, Richardson H, Saint R, Lehner CF (1994) Cyclin E controls s-phase progression and its down-regulation during *Drosophila* embryogenesis is required for the arrest of cell proliferation. Cell, 77 (1): 107-120
- Kozak M (1986) Point mutations define a sequence flanking the AUG initiator codon that modulates translation by eukaryotic ribosomes. Cell, 44: 283-292

- Kozak M (1987) At least six nucleotides preceding the AUG initiator codon enhance translation in mammalian cells. *J Mol Biol*, 196: 947-950
- Kozak M (1991) Structural features in eukaryotic mRNAs that modulate the initiation of translation. *J Biol Chem*, 266: 19867-19870
- Kozak M (1996) Interpreting cDNA sequences: some insights from studies on translation. *Mammalian Genome*, 7: 563-574
- Kreutzer MA, Richards JP, Desilvaudawatta MN, Temenak JJ, Knoblich JA, Lehner CF, Bennett KL (1995) *Caenorhabditis elegans* cyclin A and B type genes: a cyclin A multigene family, an ancestral cyclin B3 and differential germline expression. *J Cell Sci*, 108: 2415-2424
- Kurokawa D, Akasaka K, Mitsunaga Nakatsubo K, Shimada H (1997) Cloning of cyclin E cDNA of the sea urchin, *Hemicentrotus pulcherrimus*. *Zool Sci*, 14 (5): 791-794
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685
- Lankester ER (1875) Contributions to the developmental history of the mollusca. *Philos Trans R Soc Lond*, 165: 1-48
- Lees E (1995) Cyclin dependent kinase regulation. *Curr Op Cell Biol*, 7: 773-780.
- Lehner CF, O'Farrell PH (1989) Expression and function of *Drosophila* cyclin A during embryonic cell cycle progression. *Cell*, 56: 957-68
- Lehner CF, O'Farrell PH (1990) The roles of *Drosophila* cyclins A and B in mitotic control. *Cell*, 61: 535-47
- Lehninger AL (1987) *Prinzipien der Biochemie*. de Gruyter, Berlin - New York
- Li J, Meyer AN, Donoghue DJ (1997) Nuclear localization of cyclin B1 mediates its biological activity and is regulated by phosphorylation. *Proc Nat Acad Sci USA*, 94 (2): 502-507
- Luetjens CM, Dorresteijn AWC (1995) Multiple, alternative cleavage patterns precede uniform larval morphology during normal development of *Dreissena polymorpha* (Mollusca, Lamellibranchia). *Roux's Arch Dev Biol*, 205: 138-148
- Lundgren K; Walworth N; Booher R; Dembski M; Kirschner M; Beach D (1991) mik1 and wee1 cooperate in the inhibitory tyrosine phosphorylation of cdc2. *Cell*, 64 (6): 1111-1122
- Maridor G, Gallant P, Golsteyn R, Nigg EA (1993) Nuclear localization of vertebrate cyclin A correlates with its ability to form complexes with cdk catalytic subunits. *J Cell Sci*, 106: 535-544
- Martindale MQ (1986) The 'organizing' role of the D quadrant in an equal-cleaving spiralian, *Lymnaea stagnalis* as studied by UV laser deletion of macromeres at intervals between third and fourth quartet formation. *Int J Inv Rep Dev*, 9: 229-242
- Martindale MQ, Doe CQ, Morrill JB (1985) The role of animal-vegetal interaction with respect to the determination of dorsoventral polarity in the equal-cleaving spiralian, *Lymnaea palustris*. *Roux's Arch Dev Biol*, 194: 281-295
- Meijer L, Arion D, Galsteyn R, Pines J, Brizuela L, Hunt T, Beach D (1989) Cyclin is a component of the sea urchin egg M-phase specific histone H1 kinase. *EMBO J*, 8: 2275-2282
- Meijer L, Pondaven P (1988) Cyclic activation of histone H1 kinase during sea urchin egg mitotic divisions. *Exp Cell Res*, 174: 116-129

- Millar JB, Russel P (1992) The cdc25 M-phase inducer: an unconventional protein phosphatase. *Cell*, 68: 407-410
- Minshull J (1993) Cyclin synthesis: Who needs it. *BioEssays*, 15 (3): 149-155
- Minshull J, Blow JJ, Hunt T (1989) Translation of cyclin mRNA is necessary for extracts of activated *Xenopus* eggs to enter mitosis. *Cell*, 56: 947-56
- Minshull J, Golsteyn R, Hill CS, Hunt T (1990) The A- and B-type cyclin associated cdc2 kinases in *Xenopus* turn on and off at different times in the cell cycle. *EMBO J*, 9 (9): 2865-2875
- Moreau JL, Marques F, Barakat A, Schatt P, Lozano JC, Peaucellier G, Picard A, Genevriere AM (1998) Cdk2 activity is dispensable for the onset of DNA replication during the first mitotic cycles of the sea urchin early embryo. *Dev Biol*, 200 (2): 182-197
- Moreno S, Nurse P, Russell P (1990) Regulation of mitosis by cyclic accumulation of p80<sup>cdc25</sup> mitotic inducer in fission yeast. *Nature*, 344: 549-552
- Morrill JB (1964) The development of fragments of *Lymnaea stagnalis* eggs centrifuged before second cleavage. *A Embr Morph Exp*, 7: 5-20
- Mueller PR, Coleman TR, Dunphy WG (1995) Cell cycle regulation of a *Xenopus* wee1-like kinase. *Mol Biol Cell*, 6: 119-134
- Murakami MS, vande Woude GF (1998) Analysis of the early embryonic cell cycles of *Xenopus*; regulation of cell cycle length by Xe-wee1 and mos. *Dev*, 125: 237-248
- Murray A (1995) Cyclin ubiquitination: the destructive end of mitosis. *Cell*, 81: 149-52
- Nemer M; Stuebing EW (1996) WEE1-like CDK tyrosine kinase mRNA level is regulated temporally and spatially in sea urchin embryos. *Mech Dev*, 58 (1-2): 75-88
- Nigg EA (1993) Targets of cyclin-dependent protein kinases. *Curr Op Cell Biol*, 5 (2): 187-193
- Nigg EA (1995) Cyclin-dependent protein kinases: key regulators of the eukaryotic cell cycle. *BioEssays*, 6: 471-80
- O'Connell MJ, Raleigh JM, Verkade HM, Nurse P (1997) Chk1 is a wee1 kinase in the G(2) DNA damage checkpoint inhibiting cdc2 by Y15 phosphorylation. *EMBO J*, 16 (3): 545-554
- Okano-Uchida T, Sekiai T, Lee K-S, Okumura E, Tachibana K, Kishimoto T (1998) *In vivo* regulation of Cyclin A/Cdc2 and Cyclin B/Cdc2 through meiotic and early cleavage cycles in starfish. *Dev Biol*, 197: 39-53
- Okumura E, Sekiai T, Hisanaga S, Tachibana K, Kishimoto T (1996) Initial triggering of M-phase in starfish oocytes: A possible novel component of Maturation-promoting factor besides cdc2 kinase. *J Cell Biol*, 132 (1, 2): 125-135
- Ookata K, Hisanaga S, Bulinski JC, Murofushi H, Aizawa H, Itoh TJ, Hotani H, Okumura E, Tachibana K, Kishimoto T (1995) Cyclin B interaction with microtubule-associated protein 4 (MAP4) targets p34<sup>cdc2</sup> kinase to microtubules and is a potential regulator of M-phase microtubule dynamics. *J Cell Biol*, 128 (5): 849-862
- Ookata K, Hisanaga S, Okano T, Tachibana K, Kishimoto T (1992) Relocation and distinct subcellular localization of p34<sup>cdc2</sup>-cyclin B complex at meiosis reinitiation in starfish oocytes. *EMBO J*, 11 (5): 1763-1772

- Parker LL, Walter SA, Young PG, Piwnica-Worms H (1993) Phosphorylation and inactivation of the mitotic inhibitor wee1 by the nim1/cdr1 kinase. *Nature*, 363: 736-738
- Paterson LA, Meijer L, Bentley MG (1998) Regulation of the M-phase promoting factor (MPF) in polychaete oocytes during meiotic maturation. 8th International Congress on Invertebrate Reproduction and Development, Amsterdam, 10-14 August 1998: 113
- Pearson WR, Lipman DJ (1988) Improved tools for biological sequence comparison. *Proc Nat Acad Sci USA*, 85 (8): 2444-2448
- Peltera, A (1940) La capacità regolative dell' uovo di *Aplysia limacina* L. studiate con la centrifugazione e con le reazioni vitali. *Pubbl Stn Zool Napoli*, 18: 20-49
- Pines J (1991) Cyclins: Wheels within wheels. *Cell Growth Differ*, 2: 305-310
- Pines J, Hunt T (1987) Molecular cloning and characterization of the mRNA for cyclin from sea urchin eggs. *EMBO J*, 6 (10): 2987-95
- Pines J, Hunter T (1989) Isolation of a human cyclin cDNA: evidence for cyclin mRNA and protein regulation in the cell cycle and for interaction with p34<sup>cdc2</sup>. *Cell*, 58: 833-46
- Pines J, Hunter T (1990) Human cyclin A is adenovirus E1A-associated protein p60 and behaves differently from cyclin B. *Nature*, 346: 760-763
- Rechsteiner M, Rogers SW (1996) PEST sequences and regulation by proteolysis. *TIBS*, 21: 267-271
- Reed SI (1996) Cyclin E: in mid-cycle. *Biochim Biophys Acta - Biomembranes*, 1287 (2-3): 151-153
- Rempel RE, Sleight SB, Maller JL (1995) Maternal *Xenopus* cdk2-cyclin E complexes function during meiotic and early embryonic cell cycles that lack a G1 phase. *The Journal of Biological Chemistry*, 270 (12): 6843-6855
- Richardson H, O'Keefe LV, Marty T, Saint R (1995) Ectopic cyclin E expression induces premature entry into S phase and disrupts pattern formation in the *Drosophila* eye imaginal disc. *Development*. 1995 Oct; 121(10): 3371-9
- Richardson HE, O'Keefe LV, Reed SI, Saint R (1993) A *Drosophila* G1-specific cyclin E homolog exhibits different modes of expression during embryogenesis. *Development*. 1993 Nov; 119(3): 673-90
- Richardson K.C, Jarett L, Finke EH (1960) Embedding in epoxy resins for ultrathin sectioning in electron microscopy. *Stain Technol*, 35: 313-323
- Rogers S, Wells R, Rechsteiner M (1986) Amino acid sequences common to rapidly degraded proteins - The PEST hypothesis. *Science*, 234: 364-368
- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239: 487-491
- Sakamoto I, Takahara K, Yamashita M, Iwao Y (1998) Changes in cyclin B during oocyte maturation and early embryonic cell cycle in the newt *Cynops pyrrhogaster*: requirement of germinal vesicle for MPF activation. *Dev Biol*, 195: 60-69
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2nd edition, Cold Spring Harbour Laboratory Press
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA-sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Nat Acad Sci USA*, 74: 5463-5467

- Satoh N (1979) On the 'clock' mechanism determining the time of tissue-specific enzyme development during ascidian embryogenesis. I. Acetylcholinesterase development in cleavage-arrested embryos. *J Embryol Exp Morphol*, 54: 131-139
- Satoh N (1982) Timing mechanism in early embryonic development. *Differentiation*, 22: 156-163
- Satoh N, Ikegami S (1981a) A definite number of aphidicholin sensitive cell-cycle events are required for acetylcholinesterase development in the presumptive muscle cells of the ascidian embryos. *Journal of Embryology and Experimental Biology*, 61: 1-13
- Satoh N, Ikegami S (1981b) On the 'clock' mechanism determining the time of tissue-specific enzyme development during ascidian embryogenesis. II. Evidence for association of the clock with the cycle of DNA replication. *Journal of Embryology and Experimental Biology*, 64: 61-71
- Sauer K, Lehner CF (1995) The role of cyclin E in the regulation of entry into S phase. *Prog-Cell-Cycle-Res.* 1995; 1: 125-39
- Saunders AMC, Poole M (1910) The development of *Aplysia punctata*. *Quart J Micr Sc*, 55: 497
- Scheurlen I, Hoffmeister S, Schaller HC (1996) Presence and expression of G2 cyclins in the coelenterate *Hydra*. *J Cell Sci*, 109: 1063-1069
- Schleip W (1929) Die Determination der Primitiventwicklung. 1. Lieferung, Akademische Verlagsgesellschaft mbH, Leipzig
- Schneider S, Fischer A, Dorresteijn AWC (1992) A morphometric comparison of dissimilar early development in sibling species of *Platynereis* (Annelida, Polychaeta). *Roux's Arch Dev Biol*, 201: 243-256
- Schulze-Gahmen U; Brandsen J; Jones HD; Morgan DO; Meijer L; Vesely J; Kim SH (1995) Multiple modes of ligand recognition: crystal structures of cyclin-dependent protein kinase 2 in complex with ATP and two inhibitors, olomoucine and isopentenyladenine. *Proteins*, 22 (4): 378-391
- Shimizu T (1993) Cleavage asynchrony in the *Tubifex* embryo - involvement of cytoplasmic and nucleus-associated factors. *Dev Biol*, 157: 191-204
- Sibon OC, Stevenson VA, Theurkauf WE (1997) DNA-replication checkpoint control at the *Drosophila* midblastula transition. *Nature*, 388: 93-96
- Strausfeld UP, Howell M, Descombes P, Chevalier S, Rempel RE, Adamczewski J, Maller JL, Hunt T, Blow JJ (1996) Both cyclin A and cyclin E have S-phase promoting (SPF) activity in *Xenopus* egg extracts. *J Cell Sci*, 109 (6): 1555-1563
- Swenson KI, Farrell KM, Ruderman JV (1986) The clam embryo protein cyclin A induces entry into M phase and the resumption of meiosis in *Xenopus* oocytes. *Cell*, 47: 861-70
- Tachibana K, Ishiura M, Uchida T, Kishimoto T (1990) The starfish egg mRNA responsible for meiosis reinitiation encodes cyclin. *Dev Biol*, 140: 241-252
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucl Acids Res*, 22: 4673-4680
- Treadwell AL (1901) The cytogeny of *Podarke obscura* Verill. *J Morphol*, 17: 399-486
- van Dam WI, Verdonk NH (1982) The morphogenetic significance of the first quartet micromeres for the development of the snail *Bithynia tentaculata*. *W Roux's Arch Dev Biol*, 191: 112-118

- van den Biggelaar JAM (1971a) Timing of the phases of the cell cycle with tritiated thymidine and Feulgen cytophotometry during the period of synchronous division in *Lymnaea*. *J Embryol Exp Morphol*, 26: 351-366
- van den Biggelaar JAM (1971b) Timing of the phases of the cell cycle during the period of asynchronous division up to the 49-cell stage in *Lymnaea*. *J Embryol Exp Morphol*, 26: 367-391
- van den Biggelaar JAM (1977) Development of dorsoventral polarity and mesentoblast determination in *Patella vulgata*. *J Morphol*, 154: 157-186
- van den Biggelaar JAM (1996a) The significance of the early cleavage pattern for the reconstruction of gastropod phylogeny. In: Taylor JD (ed) *Origin and evolutionary radiation of the mollusca*, Oxford University Press: 155-160
- van den Biggelaar JAM (1996b) Cleavage pattern and mesentoblast formation in *Acanthochiton crinitus* (Polyplacophora, Mollusca). *Dev Biol*, 174: 423-430
- van den Biggelaar JAM, Dictus WJAG, van Loon AE (1997) Cleavage patterns, cell lineages and cell specification are clues to phyletic lineages in Spiralia. *Sem Cell Dev Biol*, 8: 367-378
- van den Biggelaar JAM, Guerrier P (1979) Dorsoventral polarity and mesentoblast determination as concomitant results of cellular interactions in the mollusk *Patella vulgata*. *Dev Biol*, 68: 462-471
- van den Biggelaar JAM, Guerrier P (1983) Origin of spatial organization. In: Verdonk NH, Biggelaar van den JAM (eds) *The Mollusca - Volume 3: Development*, Academic Press, New York: 179-213
- van den Biggelaar JAM, Haszprunar G (1996) Cleavage patterns and mesentoblast formation in the gastropoda: an evolutionary perspective. *Evolution*, 50 (4): 1520-1540
- van den Heuvel S, Harlow E (1993) Distinct roles for cyclin-dependent kinases in cell cycle control. *Science*, 262 (5142): 2050-2054
- van der Kooij A, Goedemans HJ, van Loon AE (1995) Localization and quantification of cyclin A and B mRNA during the embryonic development of *Patella vulgata*. *Roux's Arch Dev Biol*, 204: 157-163
- van der Kooij A, Nederbragt AJ, Goedemans HJ, van Loon AE (1996) The stringlike genes of the limpet *Patella vulgata*. *Gene*, 172: 261-265
- van der Kooij A, Veraart CPWM, van Loon AE (1998) Cyclin A, Cyclin B, and stringlike are regulated separately in cell cycle arrested trochoblasts of *Patella vulgata* embryos. *Dev Genes Evol*, 207: 524-534
- van Dongen CAM, Geilenkirchen WLM (1975) The development of *Dentalium* with special reference to the significance of the polar lobe. IV. Division chronology and development of cell pattern in *Dentalium dentale* after removal of the polar lobe at first cleavage. *Proc K Ned Akad Wet Ser C*, 78: 358-375
- van Loon AE, Colas P, Goedemans HJ, Néant I, Dalbon P, Guerrier P (1991) The role of cyclins in the maturation of *Patella vulgata* oocytes. *EMBO J*, 10 (11): 3343-3349
- Verdonk NH, Cather JN (1983) Morphogenetic determination and differentiation. In: Verdonk NH, Biggelaar van den JAM (eds) *The Mollusca - Volume 3: Development*, Academic Press, New York: 215-252
- Verdonk NH, van den Biggelaar JAM (1983) Early development and the formation of the germ layers. In: Verdonk NH, Biggelaar van den JAM (eds) *The Mollusca - Volume 3: Development*, Academic Press, New York, Academic Press, New York: 91-122

- Vesely J, Havlicek L, Strnad M, Blow JJ, Donella-Deana A, Pinna L, Letham DS, Kato JY, D tivaud L, Leclerc S, Meijer L (1994) Inhibition of cyclin-dependent kinases by purine derivatives. *Eur J Biochem*, 224: 771-786
- Watanabe N, Broome M, Hunter T (1995) Regulation of the human WEE1Hu CDK tyrosine 15-kinase during the cell cycle. *EMBO J*, 14 (9): 1878-1891
- Weeks G, Weijer CJ (1994) The *Dictyostelium* cell cycle and its relationship to differentiation. *FEMS Microbiol Lett*, 124 (2): 123-130
- Westendorf JM, Swenson KI, Ruderman JV (1989) The role of cyclin B in meiosis I. *J Cell Biol*, 108: 1431-1444
- Wilson EB (1928) *The cell in development and heredity*. 3rd edition with corrections. Macmillan Company, New York 1928. Reprinted in: Moore JA (eds) *Genes, Cells and Organisms*. Garland Publishing Inc, New York & London 1987
- Wilson MA, Hoch RV, Ashcroft NR, Kosinski ME, Golden A (1999) A *Caenorhabditis elegans* wee1 homolog is expressed in a temporally and spatially restricted pattern during embryonic development. *Biochim Biophys Acta - Biomembranes*, 1445 (1): 99-109
- Yakisich JS, Sid n A, Vargas VI, Eneroth P, Cruz M (1998) Early Inhibition of DNA synthesis in the developing rat cerebral cortex by the purine analogues olomoucine and roscovitine. *Biochem Biophys Res Commun*, 243: 674-677
- Yamashita M, Yoshikuni M, Hirai T, Fukada S, Nagahama Y (1991) A monoclonal antibody against the PSTAIR sequence of p34<sup>cdc2</sup>, catalytic subunit of maturation-promoting factor and key regulator of the cell cycle. *Dev Growth Differ*, 33 (6): 617-624
- Yarden A, Geiger B (1996) Zebrafish cyclin E regulation during early embryogenesis. *Dev Dyn*, 206 (1): 1-11
- Zivkovic D, Cr ton R, Dohmen R (1991) Cell cycle-related fluctuations in transcellular ionic currents and plasma membrane Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup> ATPase activity during early cleavages of *Lymnaea stagnalis* embryos. *Roux's Arch Dev Biol*, 200: 120-131

## 6 Zusammenfassung

Bei inäqual furchenden Spiraliern, wie *Platynereis dumerilii*, entstehen durch die ersten beiden Furchungen vier unterschiedlich große und auch bereits unterschiedlich determinierte Blastomeren. Im allgemeinen ist die größte der vier Blastomeren die Gründerzelle des D-Quadranten (Dorresteijs und Fischer 1988). Dieser Quadrant etabliert die dorsoventrale Körperachse im Keim, indem er das Schicksal benachbarter Blastomeren über Zell-Zell-Interaktionen positionsgerecht bestimmt (Damen und Dictus 1996). Der D-Quadrant erhält bei *Platynereis* einen überproportional großen Anteil (60%) des gesamten dotterfreien Zytoplasmas im Keim (Dorresteijs 1990). Sein Schicksal wird durch morphogenetische Faktoren innerhalb des dotterfreien Zytoplasmas bestimmt. Der Gehalt an dotterfreiem Zytoplasma bestimmt nicht nur das Schicksal der Blastomeren, sondern korreliert auch direkt mit den jeweils unterschiedlichen Zellzyklusgeschwindigkeiten der Blastomeren. Die plasmareichen Zellen des D-Quadranten, aber auch bereits die Vorläuferzelle CD, teilen sich im Vergleich mit den jeweils anderen Blastomeren im Keim besonders rasch (Dorresteijs 1990). In dieser Arbeit wurde unter verschiedenen Aspekten untersucht (a) inwieweit die Etablierung der dorsoventralen Körperachse von der raschen Proliferation der D-Zelllinie abhängt, (b) inwieweit Zellzyklusregulatoren Bestandteil der oben genannten morphogenetischen Faktoren sein könnten und (c) wie die unterschiedlichen Zellzyklusgeschwindigkeiten auf molekularer Ebene reguliert werden.

Zum einen wurden die frühen Furchungsstadien von *Aplysia californica* volumetrisch vermessen. Anders als bei den meisten inäqual furchenden Spiraliern wird bei *Aplysia* nicht der größte, sondern einer der kleineren embryonalen Quadranten als D-Quadrant determiniert. Ich konnte zeigen, daß die CD-Blastomere (27% des Eivolumens) dennoch, ähnlich wie bei *Platynereis*, bei der ersten Furchungsteilung überproportional viel dotterfreies Zytoplasma (40%) erhält und so als Vorläuferzelle des D-Quadranten determiniert wird. Bei der zweiten Furchung teilt sich die CD-Blastomere jedoch, anders als bei *Platynereis*, symmetrisch. Welche der beiden Tochterzellen von CD als definitiver D-Quadrant determiniert wird, erfordert also zusätzliche (induktive?) Mechanismen. Auch bei *Aplysia* sind die Zellzyklusgeschwindigkeiten der Blastomeren mit ihren jeweiligen Anteilen am dotterfreiem Zytoplasma korreliert.

Das Postulat, daß die rasche Proliferation des D-Quadranten und seiner Vorläuferzelle CD für die Etablierung der dorsoventralen Körperachse und für die Determination der Blastomeren in Keimen inäqual furchender Spiraler erforderlich sind, konnte ich



zusätzlich bestätigen, indem ich die Teilungsabfolge im Keim von Platynereis mit Hilfe des Cdc2-spezifischen Inhibitors Olomoucine experimentell abänderte. Durch pulse chase-Behandlung mit Olomoucine wurde erreicht, daß die Blastomeren die vierte Mitose, anders als im normalen Keim, synchron einleiteten. Die so behandelten Keime entwickelten sich zu Trochophorae, die keine oder nur eine stark reduzierte dorsoventrale Polarität erkennen ließen. Das dorsoventrale Muster entsteht in Keimen von Spiraliern durch die Organisatorwirkung der Blastomeren 3D und 4d und bei Platynereis eventuell auch 2d (Damen und Dictus 1996, Dorrestein und Eich 1991). Der Teilungsvorsprung, den diese Blastomeren normalerweise gegenüber anderen Zelllinien haben, war in den mit Olomoucine-behandelten Keimen stark vermindert. Dadurch haben diese Blastomeren ihre induktiven Kapazitäten möglicherweise nicht, oder nicht rechtzeitig erwerben können, um die benachbarten Zellen gemäß ihrer Position entlang der dorsoventralen Körperachse zu determinieren. Insofern ist die differentielle Zellzyklusregulation fest in das Determinationsgeschehen integriert. Das bedeutet auch, daß zellzyklusregulierende Faktoren Bestandteil der anfangs genannten „morphogenetischen Determinanten“, sind.

Die differentielle Zellzyklusregulation könnte auch für die Evolution der Spiraler von Bedeutung gewesen sein. Es wird ein Modell vorgestellt, bei dem Zellzyklusasynchronien die Entstehung inäqual furchender Spiraler aus äqual furchenden Vorgängern einleiteten. Dieser Prozeß führte zu einem Wechsel von einem induktiven, auf Zell-Zell-Interaktionen beruhenden, zu einem zellautonomen, auf morphogenetischen Determinanten beruhenden Mechanismus der D-Quadrant Determination.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte ich einige zellzyklusregulierende Proteine (Cdc2, Cyclin B) oder deren mRNAs (cyclin B, cyclin E, cdc25, wee1) in Keimen von Platynereis nachweisen und teilweise auch deren Gene bzw. Genfragmente klonieren (cyclin E, wee1). Ich konnte zeigen, daß der Eintritt in die M-Phase bei Platynereis, wie in anderen Eukaryonten auch, durch die periodische Aktivität des Cdc2/Cyclin B-Komplexes (MPF) eingeleitet wird. Die MPF-Aktivität wird über periodische Oszillationen des Cyclin B-Titers und durch aktivierende und deaktivierende Phosphorylierungen des Cdc2-Proteins reguliert. Das Fehlen einer G1-Phase während der frühen embryonalen Furchungszyklen (Heimann 1994) beruht möglicherweise auf der konstitutiven Expression von Cyclin E. Durch Injektion von sense- oder anti sense-RNA von den analysierten Zellzyklusgenen in individuelle Blastomeren wollen wir die Abfolge der Furchungsteilungen noch gezielter abändern, als dies bisher mit Olomoucine möglich war.

## 7 Anhänge

### 7.1 Bezeichnung der Gene, Genfragmente, Plasmide und ?-ZAP-Klone

cyc1 <sup>205</sup>	205Bp-langes PCR-Fragment des Gens Pdcyc1 amplifiziert mit den degenerierten PCR-Primern cyc1-F und cyc2-R aus embryonaler cDNA.
pBlwee1-3	siehe pBlwee1-10
pBlwee1-4	siehe pBlwee1-10
pBlwee1-10	Plasmid pBluescript SK(-) mit einklonierter cDNA des <i>Platynereis wee1</i> -Gens (Pdwee1). pBlwee1-10 wurde durch „ <i>in vivo</i> -Excision“ aus dem cDNA-Bank-Klon ?-ZAP <sup>wee1-10</sup> herausgeschnitten
Pdwee1	Bezeichnung für das <i>Platynereis dumerilii wee1</i> -Gen
pUC18 <sup>cyc205</sup>	Plasmid pUC18 mit einkloniertem cyc1 <sup>205</sup> -Fragment.
Dh5aF <sup>-cyc205</sup>	Dh5aF <sup>-</sup> -Bakterien transformiert mit dem Plasmid pUC18 <sup>cyc205</sup>
pZErO <sup>wee572</sup>	Plasmid pZErO-2 mit einkloniertem wee1 <sup>572</sup> -Fragment
TOP10 <sup>wee572</sup>	TOP10 <sup>wee572</sup> -Bakterien transformiert mit pZErO <sup>wee572-16</sup>
wee1 <sup>328</sup>	328Bp-langes PCR-Subfragment des Plasmids pZErO <sup>wee572</sup> amplifiziert mit den spezifischen PCR-Primern wee5-F und wee6-R.
wee1 <sup>328DIG</sup>	Digoxygenin-markiertes wee1 <sup>328</sup> -Fragment
wee1 <sup>572</sup>	572Bp-langes PCR-Fragment des Gens Pdwee1 amplifiziert mit den degenerierten PCR-Primern wee1-F und wee4-R aus embryonaler cDNA
?-ZAP <sup>wee1-3</sup>	siehe ?-ZAP <sup>wee1-10</sup>
?-ZAP <sup>wee1-4</sup>	siehe ?-ZAP <sup>wee1-10</sup>
?-ZAP <sup>wee1-10</sup>	wee1-positive ?-ZAP-Klone (von den Agarplatten 3, 4 bzw. 10), welche die Plasmide pBlwee1-3, pBlwee1-4 bzw. pBlwee1-10 enthielten

## 7.2 Einbuchstabencode für die Aminosäuren

### **Aminosäuren mit unpolaren Seitengruppen:**

Alanin	A
Valin	V
Leucin	L
Isoleucin	I
Prolin	P
Methionin	M
Phenylalanin	F
Tryptophan	W

### **Aminosäuren mit polaren, aber ungeladenen Seitengruppen:**

Glycin	G
Serin	S
Threonin	T
Cystein	C
Tyrosin	Y
Asparagin	N
Glutamin	Q

### **Aminosäuren mit negativ geladenen Seitengruppen:**

Asparaginsäure	D
Glutaminsäure	E

### **Aminosäuren mit positiv geladenen Seitengruppen:**

Lysin	K
Arginin	R
Histidin	H

### 7.3 Tagungsbeiträge

Heimann C. (1998) *Platynereis dumerilii* - ein entwicklungsbiologisches Modelltier. Kurzvortrag, 19. Januar 1998, 3. Stipendiatentreffen der Graduiertenförderung des Landes Rheinland-Pfalz an der Johannes Gutenberg-Universität Mainz, Mainz.

Heimann C (1998) Steps toward the analysis of cell cycle control in the *Platynereis* embryo. Oral presentation, International Workshop "Patterns in Development: Systems, Problems and Approaches", 16-18. Oktober 1998, Grietherbusch/Niederrhein, Germany

Heimann C. (1997) Does the differential regulation of the cell cycles in Nereid embryos play a role in the determination of the blastomeres? Kurzvortrag, Internationales Symposium „Reproductive Strategies and Developmental Patterns in Annelids“, 22-26. Sep. 1997, Osnabrück.

Heimann C. (1996) An  $\alpha$ -*bufo* cyclin B1-monoclonal antibody recognizes a cycling protein during first cleavage of *Platynereis dumerilii* embryogenesis. Dezember 1996, Gastvortrag, Reichuniversität Utrecht, Utrecht, Niederlande

Heimann C. (1996) Does the differential regulation of the cell cycles in Nereid embryos play a role in the determination of the blastomeres? Posterbeitrag, First GfE School „Embryonic patterning: signalling and Transcription factors“, 28-30. November 1996, Schloß Reisenburg/Günzburg.

Heimann C. (1995) Molecular tools for the analysis of cell cycles during *Platynereis dumerilii* embryogenesis. November 1995, Vortragsreise durch Japan mit den Stationen: Misaki Marine Biological Station (Misaki), Tokyo Institute of Technology (Yokoham), Asamushi Marine Biological Station (Asamushi), Hokkaido University (Sapporo), University of Kyoto (Kyoto)

Dorresteijn A.W.C.; Heimann C., Luetjens CM (1995) Cell cycle and molecular diversification of blastomeres are results of cleavage geometry in spiralian embryos. 7th International Congress on Invertebrate reproduction. 5-11 Aug 1995 U.C. Santa Cruz (ICIR)

Heimann C. (1993) Analysis of cell cycles in embryos of Nereids. Kurzvortrag, Internationaler Workshop „German-Dutch meeting on pattern formation“, 1-3. Oktober 1993, Grietherbusch/Niederrhein

## 7.4 Veröffentlichungen

Heimann C (1999) Morphometric analysis of early cleavage stages of the sea hare *Aplysia californica* (Gastropoda, Opisthobranchia). Zoology, Analysis of Complex Systems (Jena) 102 (Suppl. II): 21

Heimann C, Dorresteijn AWC (1999) Molecular control of cleavage cycles in the embryo of *Platynereis dumerilii* (Annelida, Polychaeta): II. mRNA-sequence for a Wee1-like kinase. Zoology, Analysis of Complex Systems (Jena) 102 (Suppl. II): 22

Heimann C, van Loon AE, Goedemans HJ, Dorresteijn AWC (1998) Molecular control of cleavage cycles in the embryo of *Platynereis dumerilii* (Annelida, Polychaeta): I. Cloning and sequencing of cell cycle relevant genes. Zoology, Analysis of Complex Systems (Jena) 101, Suppl. I: 21

Heimann C., van Loon A.E., Goedemans H.J., Dorresteijn A.W.C. (1998) *Platynereis dumerilii* mRNA for cyclin 1, partial. EMBL-Accession number: AJ224983

Heimann C., van Loon A.E., Goedemans H.J., Dorresteijn A.W.C. (1998) *Platynereis dumerilii* mRNA for Wee1-like kinase, partial. EMBL-Accession number: AJ224984

**Morphometric analysis of early cleavage stages of the sea hare *Aplysia californica*  
(Gastropoda, Opisthobranchia)**

C. Heimann; Institut für Zoologie, Universität Mainz, 55099 Mainz, Germany

In spiralian embryos two modes of D-quadrant determination are realized. In equally cleaving spiralian embryos the four embryonic quadrants first remain equipotential and cleave synchronously. After the fifth cleavage one of the macromeres attains a central position and gets induced by the animal micromeres to form the mesentoblast 4d at sixth cleavage. Alternatively in most unequally cleaving spiralian embryos the first two cleavages produce four cells one of which is much larger and contains the great bulk of the yolk free cytoplasm. Morphogenetic factors within the yolk free cytoplasm determine the fate of this D-blastomere. In the mollusc *Aplysia* the first two cleavages produce two larger and two smaller blastomeres, however, in this case one of the smaller ones will be specified to become the D-quadrant. As there are no experimental data available Freeman and Lundelius (1992 J Evol Biol 5: 205) speculate that in *Aplysia* as in other unequally cleaving spiralian embryos the D-quadrant gets specified after only two cleavage cycles. On the other hand, van den Biggelaar and Haszprunar (1996 Evolution 50, 4: 1520) argue that a macromere of one of the two smaller (and equipotential?) quadrants becomes centralized and gets in close contact to the micromeres after the fifth cleavage. This macromere enters the sixth cleavage well ahead of the C-macromere and produces the mesentoblast 4d. This mode resembles the situation in equally cleaving spiralian embryos. For this reason the authors assume an inductive determination of the D-quadrant (or rather 3D) after the fifth cleavage. In order to solve this puzzle we started to reinvestigate the early cleavage stages of *Aplysia californica*. Morphometric measurements allowed us to quantify the volumes of the blastomeres, their yolk content, and the amount of yolk free cytoplasm up to the 4-cell stage. This data revealed that the yolk free cytoplasm is shunted preferentially into the CD-cell. At second cleavage equal portions of yolk free cytoplasm get distributed among the C and D blastomeres. Both, C and D contain almost 88% yolk free cytoplasm and only 12% yolk, whereas A and B contain only 45% yolk free cytoplasm but 55% yolk. Our data thus show that the potential D-quadrant gets preselected by an asymmetrical first cleavage accompanied by a disproportional distribution of yolk free cytoplasm. Although the two smaller blastomeres of the 4-cell stage appear equally eligible to become the D-quadrant and to this end might require an inductive signal, careful rereading of Carazzis description on the development of *Aplysia limacina* (1905 Arch Ital Anat Embriol 4: 231) also revealed that the D-quadrant already divides ahead of the C-quadrant at fifth cleavage, which might be indicative for D-quadrant determination prior to fifth cleavage. **Acknowledgement:** C.H. gratefully acknowledges a personal grant of the state Rheinland Pfalz (LGFG).

## **Molecular control of cleavage cycles in the embryo of *Platynereis dumerilii* (Annelida, Polychaeta): II. mRNA-sequence for a Wee1-like kinase**

C. Heimann, A.W.C. Dorresteijn; Institut für Zoologie, Universität Mainz, 55099 Mainz

The blastomeres of *Platynereis* differ in size, cytoplasmic composition, and in their cell cycle duration. Cell cycle progression in the blastomeres correlates with their amount of yolk free cytoplasm. The cytoplasm is shunted preferentially into the D-cell line (Dorresteijn AWC 1990 Roux's Arch Dev Biol 199: 14). Experimentally evoked equal distribution of the cytoplasm at first cleavage produces 4-cell stages with two D-quadrants rather than one. Both these cell lines proliferate rapidly. In the resulting larvae D-cell line specific structures are duplicated (Dorresteijn AWC *et al* 1987 Roux's Arch Dev Biol 196: 51; Dorresteijn AWC, Eich P 1991 Roux's Arch Dev Biol 200: 342). This data indicate that factors within the yolk-free cytoplasm specify both the cell cycle duration of the blastomeres as well as the fate of at least some D-quadrant cells. Differences in cell cycle duration may well be a necessary prerequisite for the determination of D-quadrant cells. Therefore, we started to analyse the molecular mechanisms which control the embryonic cell cycles and make them asynchronous (Heimann C *et al* 1998 Zoology (Jena) 101, Suppl. 1, 21). Here we report on the identification of a *Platynereis* cDNA encoding for a Wee1-like kinase (embl-AJ224984). The 3899nt cDNA includes an open reading frame of 1845nt. The putative start codon matches the Kozak consensus sequence. Polyadenylation signals are found 880nt and 1940nt downstream of the stop codon. The encoded polypeptide consists of 614 amino acids and has a predicted molecular mass of 68.7kDa. At the amino acid level Pd-Wee1 is about 40 to 46% identical to sea urchin and vertebrate Wee1-proteins and 25% identical to *Schizosaccharomyces pombe* Wee1. All Wee1 homologues isolated to date negatively regulate the mitosis promoting factor (MPF) by phosphorylation of the Cdc2 subunit on tyrosine 15 (e.g. Mueller PR *et al* 1995 Mol Biol Cell 6: 119; Nurse P 1987 Cell 49: 559). The level of Wee1-mRNA is regulated temporally and spatially in sea urchin embryos (Nemer M, Stuebing EW 1996 Mech Dev 58: 75). *Xenopus*-Wee1 contributes in part to the cell cycle length of the first embryonic cell cycle (Murakami MS, van de Woude GF 1998 Dev 125: 237). Therefore, Wee1 could well be a critical factor controlling the duration of early cell cycles in the *Platynereis*-embryo. *Sense*- or *antisense*-RNA of the Pd-wee1 gene will be injected into individual blastomeres to alter the normal sequence of cleavages and to study possible effects on the determination of D-quadrant as well as of other blastomeres. *Acknowledgement: C. H. gratefully acknowledges a personal grant of the state Rheinland Pfalz (LGFG).*

**Molecular control of cleavage cycles in the embryo of *Platynereis dumerilii* (Annelida, Polychaeta): I. Cloning and sequencing of cell cycle relevant genes.**

C. Heimann<sup>1</sup>, A.E. van Loon<sup>2</sup>, H.J. Goedemans<sup>2</sup>, A.W.C. Dorresteijn<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Institut für Zoologie, Universität Mainz, Mainz, Germany

<sup>2</sup> Dep. of Exp. Zoology, State University at Utrecht, Utrecht, The Netherlands

In embryos of *Platynereis* the blastomeres differ in size, cytoplasmic composition, and in the duration of cell cycles from the two cell stage on. The rate of cell cycle progression in the blastomeres correlates with their amount of yolk free cytoplasm. In normal embryos the yolk free cytoplasm is shunted preferentially into the D-cell line (Dorresteijn AWC 1990 Roux's Arch Dev Biol 199: 14). Experimental change of this cytoplasmic distribution prior to first cleavage leads to embryos in which two instead of one cell line contain large amounts of yolk free cytoplasm. Both these cell lines proliferate rapidly and the resulting larvae show a duplication of D-cell line specific structures (Dorresteijn AWC *et al* 1987 Roux's Arch Dev Biol 196: 51; Dorresteijn AWC, Eich P 1991 Roux's Arch Dev Biol 200: 342). This data indicate that factors within the yolk free cytoplasm specify both the cell cycle duration of the blastomeres as well as the fate of at least some D-quadrant cells. Therefore, we focus on two questions: (1) Which molecular mechanisms control the embryonic cell cycles and make them asynchronous? (2) Are the differences in cell cycle duration a necessary prerequisite for the determination of D-quadrant cells? Using the BrdU/anti-BrdU-technique we could demonstrate that early blastomeres enter S-phase shortly after the end of mitosis without or with only a very short G1-phase. That means that the G1- to S-transition is not crucial for the differences in the cell cycle duration of the blastomeres (Heimann C 1994 Diploma thesis, Mainz). We are presently interested in molecules which are involved in the regulation of the second major checkpoint, the G2-M-transition. With an antibody against *Bufo-japonicus*-cyclin B1 we could demonstrate the cycling activity of a G2/M-specific cyclin in *Platynereis* as well. Thus, the rate of cyclin-synthesis during interphase could be a limiting factor for entering mitosis. In a first step to isolate complete cell cycle regulating genes from cDNA-libraries, we have now amplified and sequenced PCR-fragments of a *Platynereis*-cyclin (embl-AJ224983) and of a *Platynereis* wee1-homolog (embl-AJ224984). *Sense*- or *antisense*-RNA of these genes will be injected to alter the normal sequence of cleavages and to study possible effects on the determination of the blastomeres.

**Acknowledgements:** We thank T. Kishimoto (Tokyo, Japan) and R. Streeck (Mainz, Germany) for their support. The *B. japonicus*-cyclin-B1 antibody was a kind gift of M. Yamashita (Sapporo, Japan). C. H. was supported by a grant of the Heinrich J. Klein Förderstiftung, Mainz (Germany) and by a grant of the University of Mainz (LGFG).



## 8 Danksagung

An erster Stelle möchte ich Herrn Prof. Dr. A. Dorresteyn für die freundschaftliche Betreuung meiner Arbeit und seine ständige Diskussionsbereitschaft danken. Seine konstruktive Kritik bei der Durchsicht dieses Manuskripts hat mir sehr dabei geholfen, den „roten Faden“ verständlich zu Papier zu bringen. Die Planung und Durchführung meiner Forschungsreisen wäre ohne seine engagierte Unterstützung nicht möglich gewesen.

Herrn Prof. Dr. A. Fischer danke ich für sein ständiges Interesse am Fortgang meiner Forschungsarbeit und die kritische Durchsicht dieser Dissertationsschrift. Auch für seine tatkräftige Hilfe bei der Realisierung meiner Auslandsreisen bin ich sehr dankbar.

Besonders zu Dank verpflichtet bin ich natürlich auch Dr. L. Meijer (Roscoff, Frankreich), Prof. Dr. T. Kishimoto (Yokohama, Japan), Dr. A. E. van Loon (Utrecht, Niederlande) und Prof. Dr. R. Streeck (Universität Mainz), weil sie mich jeweils über einen längeren Zeitraum in ihren Labors als Gast aufgenommen haben und so die Durchführung meiner Arbeit in großen Teilen erst möglich gemacht haben.

Dr. L. Meijer danke ich insbesondere für die Hilfe bei der Durchführung des Histon H1-Kinaseassays und die Bereitstellung von Olomoucine. Prof. Dr. T. Kishimoto und seine Mitarbeitern Dr. S. Hisanaga, Dr. K. Tachibana und Dr. K. Ohsumi haben mir freundlicherweise viele der Antikörper gegen zellzyklusregulierende Proteine überlassen. Dr. A. E. van Loon und seinem Mitarbeiter H. Goedemans unterstützten mich bei der Herstellung der cDNA-Banken und überließen mir eine Reihe von PCR-Primern. Für den anti-*Bufo japonicus* Cyclin B1-Antikörper danke ich Prof. Dr. M. Yamashita (Sapporo, Japan). Gelege von *Aplysia californica* erhielt ich freundlicherweise von Dr. A. Theike (Universität Mainz).

Natürlich danke ich auch allen bisher unerwähnten Kollegen und Mitarbeitern der Arbeitsgruppen in denen ich tätig war für ihre vielfältige Hilfe bei der Durchführung meiner Arbeit und das immer freundschaftliche und humorvolle Arbeitsklima. Sie alle einzeln namentlich aufzuführen würde den Rahmen dieser Danksagung sprengen.

Dankbar erwähnt sein auch die finanzielle Unterstützung meiner Dissertation durch Stipendien der Heinrich J. Klein-Förderstiftung (Mainz) und der Landesgraduierenförderung des Landes Rheinland Pfalz.