

Markierung der Zelllinien im Embryo von *Platynereis*

Dissertation
Zur Erlangung des Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“

Am Fachbereich Biologie
Der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Christian Friedrich Ackermann
geboren am 24.01.1964 in Ehingen (Donau)

Mainz, 2002

Dekan: Prof. Dr. J. Markl

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Tag der mündl. Prüfung: 30.04.2003

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	7
2. Material und Methoden.....	11
2.1. Verwendete Lösungen	11
Calcium-Magnesiumfreies Seewasser - CaMgfSw	11
Calcium-Magnesiumfreies Seewasser pH 8	11
Phosphate Buffered Saline (PBS).....	11
PBS + Paraformaldehyd	11
1,5 x und 2 x PBT + Paraformaldehyd	11
DABCO-Glycerin.....	11
Glyceringelatine	12
Dithioerythritol/Trypsin-Gemisch	12
Injektionsfarbstoff TRITC-Dextran.....	12
2.2. Tiermaterial	13
2.3. Prozeduren.....	18
Gewinnung besamter Oocyten	18
Entfernung der Gallerthülle	18
Herstellung und Beladung der Injektionspipetten.....	19
Inkubation der Keime im DTE/Trypsin-Gemisch	20
Injektionsapparatur/Injektionen	21
Fixation markierter Tiere	24
Einbettung der fixierten Tiere	24
2.4. Bildaufnahme/Datenverarbeitung.....	25
Mikroskopie.....	25
Verarbeitung der Daten.....	25
2.5. Elektronenmikroskopie	26
Vorfizierung.....	26
Waschen.....	26
Nachfixierung	26
Einbetten in Agar	27
Entwässerung	27
Einbettung in Araldit.....	27
Schnitte.....	27

Inhaltsverzeichnis

2.6.	Actinanfärbungen	28
2.7.	Interpretation der Bilddaten	28
3.	Ergebnisse.....	30
3.1.	Elektronenmikroskopische Untersuchung angedauter Vitellinhüllen	30
	Vitellinhülle im unbehandelten Zustand	31
	Vitellinhülle nach Behandlung mit Trypsin	31
	Vitellinhülle nach Behandlung mit DTT	31
	Vitellinhülle nach kombinierter Behandlung mit DTT und Trypsin.....	32
	Schädigungen durch die Behandlungsmethoden	32
3.2.	Anmerkungen zu den Bildtafeln.....	36
3.3.	Injektionsexperimente	37
	AB-Blastomere.....	38
	CD-Blastomere	39
	A-Blastomere	40
	1A-Blastomere	42
	1a-Mikromere.....	43
	B-Blastomere	44
	1B-Makromere	45
	1b-Mikromere.....	46
	C-Blastomere	47
	1C-Makromere	48
	1c-Mikromere	48
	D-Blastomere	49
	1D-Makromere	50
	1d-Mikromere.....	52
	2d-Mikromere.....	53
	4d-Mikromere.....	54

Inhaltsverzeichnis

4. Diskussion	94
4.1. Orientierung.....	95
4.2. Symmetrieverhältnisse im <i>Platynereis</i> -Embryo	96
4.3. D-Quadrant.....	98
4.4. Mesoderm	105
4.5. Allgemeiner Aufbau des Kopfes	110
4.6. Prototroch.....	111
4.7. Kopfnieren.....	113
4.8. Larvale Drüsenzellen.....	114
4.9. Nervensystem	114
4.10. Zellen des Urmundrandes.....	115
5. Zusammenfassung	122
6. Literatur	123
7. Berichtigungen.....	131

1. Einleitung

Gegen Ende des 19. Jahrhunderts entwickelte sich das Interesse, durch die Untersuchung der Normalentwicklung tierischer Organismen Einsichten in die Abläufe der Zelldifferenzierung zu gewinnen. Eine erste gründliche Studie dieser Art unternahm WHITMAN (1878) am Süßwasseregel *Clepsine marginata*, indem er durch exakte Beobachtung des Zellteilungsgeschehens bis zur Gastrulation einen Zellstammbaum erstellte, der Auskunft über die genealogische Herkunft der Gewebe aus einzelnen Vorläuferzellen des Embryos gab. Dies konnte aber nur deswegen gelingen, da *Clepsine* ein invariantes Zellteilungsmuster aufweist: die genaue Teilungsabfolge und räumliche Anordnung der Blastomeren im Verlauf der Frühentwicklung gleicht sich also von einem Tier zum nächsten, so daß man sogar jede einzelne Furchungszelle individuell bezeichnen kann.

Dieser Arbeit folgten bald weitere an unterschiedlichen Tieren (z.B. WILSON 1892 an *Nereis*, LILLIE 1895 an *Unio complanata*, CONKLIN 1897 an *Crepidula fornicata*, SURFACE 1907 an *Planocera inquilina*), deren Keime während der Frühentwicklung gleichfalls ein hochgradig stereotypes Zellteilungsmuster aufweisen.

Im Zuge solcher Studien zur „Cell-lineage“ zeigte sich bald, daß sich Anneliden und Mollusken nicht nur innerhalb der einzelnen Arten durch ein invariantes Furchungsmuster auszeichnen, sondern sich die Frühentwicklung aller Vertreter dieser beiden Tierstämme hochgradig ähnelt, indem die Furchungsteilungen nach einem räumlich stereotypen, „spiraligen“ Muster verlaufen: auf die ersten beiden meridionalen Teilungen folgen Teilungszyklen, bei denen durch eine Schrägstellung der Teilungsspindeln Quartette sogenannter Mikromeren stets etwa um 45° versetzt nach animal abgegeben werden, so daß diese Zellen in der Furche der vegetalen Makromeren zu liegen kommen (siehe Fig. 1, Seite 17, am Beispiel des in dieser Arbeit untersuchten Polychaeten *Platynereis dumerilii*). Dies geschieht in Aufsicht auf den animalen Pol abwechselnd im Uhrzeigersinn (dextrotrop), dann wieder im Gegenuhrzeigersinn (laetotrop). In der Regel finden nach diesem „spiraligen“ Modus vier Teilungszyklen statt (dritter bis sechster Teilungszyklus), wobei sich die schon entstandenen Mikromeren selbst wieder nach jedem Zyklus spiralig versetzt weiterteilen.

Dieses charakteristische Furchungsmuster wurde schließlich auch bei Vertretern weiterer Tierstämme gefunden, nämlich den Sipunculida, Echiurida, Vesti-

mentifera, Nemertini, Gnathostomulida, Mesozoa, und den Polycladida unter den Turbellaria (HENRY 2002). Auch wenn sich all diese Organismen als Adulttiere hochgradig unterscheiden, werden sie wegen des systematischen Aufbaus und der hohen Konstanz ihres räumlichen Entwicklungsmusters im Frühkeim gemeinsam mit den Annelida und Mollusca zur Gruppe der „Spiralia“ zusammengefaßt.

Den vielen Cell-lineage-Untersuchungen an Spiraliern die Ende des 19., Anfang des 20. Jahrhunderts durchgeführt wurden (eine Übersicht bieten GURALNICK und LINDBERG 2001), haftet aber allesamt der Nachteil an, daß sie auf reiner Beobachtung beruhen und ihre Zuverlässigkeit von der Fähigkeit des Forschers abhängt, bestimmte Zellen in unterschiedlichen Embryonen eindeutig zu identifizieren und ihre Nachkommen dann fehlerfrei zu verfolgen.

Die daraus resultierenden Unsicherheiten lassen sich mittlerweile durch moderne Methoden der Zellbeobachtung vermeiden. Hier wäre etwa die 4D-Mikroskopie zu nennen, mit deren Hilfe man bei geeigneten Keimen, etwa den sehr kleinen Eiern des Nematoden *Caenorhabditis elegans*, sämtliche Zellen räumlich jeweils simultan und über einen beliebig langen Zeitraum erfassen und aufzeichnen kann. Diese Technik hat den großen Vorteil, das Untersuchungsobjekt praktisch nicht zu beeinflussen, setzt allerdings Keime geeigneter Transparenz voraus. Größere oder dotterreiche Organismen sind dieser Methode nicht zugänglich. Um solche Objekte zu untersuchen bedarf es anderer Mittel, und die Injektion von Tracerstoffen stellt hier die beste Wahl dar; obschon diese Methode invasiv ist und im Normalfall immer nur das Schicksal einer einzelnen Zelllinie in einem Embryo verfolgt werden kann, so erlaubt sie doch eine objektive Dokumentation der Cell-lineage.

Die Einführung solcher moderner Techniken hat in jüngster Zeit zu einer Wiederbelebung von Cell-lineage-Studien geführt, auch an Spiraliern und hier insbesondere an Mollusken, Nemertinen, Polykladen und unter den Anneliden an den Hirudineen und Oligochaeten. Über die dritte Klasse dieses Stammes, die Polychaeten, liegen meines Wissens allerdings noch keine aktuellen Untersuchungen vor.

Der Grund mag darin liegen, daß man bislang Tracersubstanzen nur dann injizieren konnte, wenn man die schützende Vitellinhülle der Keime zuvor entfernte.

Embryonen von Polychaeten, die sich aus kleinen Eiern entwickeln, tolerieren diesen Eingriff, sind experimentell aber schwer zu handhaben. Größere Embryonen mit inäqualer Furchung¹ sind andererseits deutlich leichter zu manipulieren dulden jedoch die Entfernung der Vitellinhülle nicht (FISCHER 1999).

Zu diesem Typ gehört nun auch *Platynereis dumerilii*, der aber den unschätzbaren Vorteil bietet, aus unserer Laborzucht permanent verfügbar zu sein. Schon lange wurde daher der Wunsch gehegt, die bisherigen Cell-lineage-Studien zu ergänzen und zu überprüfen und zwar durch Injektionsexperimente in jedem Entwicklungszustand. Dies scheiterte aber immer daran, daß kein Weg gefunden werden konnte, die Barriere der Vitellinhülle zu durchdringen. Man kann zwar die Hülle gänzlich entfernen, indem man Zygoten nach Abschluß ihrer Corticalreaktion² in Calcium-Magnesium-freiem Seewasser inkubiert. Solche „nackten“ Keime sind allerdings nicht nur extrem fragil, sie entwickeln sich auch nicht zu lebenden Larven weiter, sondern zerfallen in einzelne Blastomeren, die sich nur noch teilweise weiterteilen (ABRELL 1995, COSTELLO 1945). Erst durch meine Entdeckung, daß ein Gemisch aus Dithioerythritol (DTE) und Trypsin die Vitellinhülle graduiert anzudauen vermag, gelang es nun, diese Hürde zu überwinden.

Es war naheliegend, mit dieser neuen Technik zuerst den genauen Zellstammbaum von *Platynereis dumerilii* zu ermitteln, und damit die Untersuchungen von E. B. WILSON (1892) an der nahe verwandten Art *Nereis limbata* (zur Zeit taxonomisch mit *Neanthes succinea* gleichgesetzt), bzw. *Platynereis megalops* (überwiegend mit fixiertem Material und Dünnschnitten) und von DORRESTEIJN an *Platynereis dumerilii* (1990a; an lebendem Material mit Hilfe der DIK-Mikroskopie) zu ergänzen und gerade für spätere Entwicklungsstadien, nach der Gastrulation, zu sichern. Dieses Unterfangen war um so dringlicher, als *Platynereis* in den letzten Jahren zunehmend Gegenstand molekularbiologischer Forschung wurde und auf dem besten Wege ist, sich zu einem neuen Modellorganismus zu etablieren (z.B. ARENDT 2001, 2002, PRUD'HOMME 2002). Denn die moderne Molekularbiologie verspricht mit ihrem Instrumentarium neue Ansätze zur Beantwortung alter Fragen, wie etwa der nach den Mechanismen, die zur Determination und

¹ FREEMAN und LUNDELIUS (1992) durchmusterten bei ihren Untersuchungen 27 Polychaetenfamilien, von denen nur 7 äqual furchende Formen aufwiesen.

² Nach der Besamung werden innert 25 Minuten durch Exocytose unzählige Corticalgrana ausgeschieden, deren quellbare Substanz eine Gallerthülle um den Keim aufbaut (KLUGE et al. 1995).

Differenzierung von Furchungszellen im Verlaufe der Ontogenese führen. So können mit Hilfe doppelsträngiger RNA („RNAi“, FIRE et al. 1998, TABARA et al. 1998, ALVARO und NEWMARK 1999) oder durch Antisense-Morpholinos (SONG et al. 2002) einzelne Gene gezielt ausgeschaltet werden; durch das Einschleusen entsprechender mRNA (z.B. GRAMMATOPOULOS et al. 2000) oder eines geeigneten Expressionsvektors (HALDER et al. 1995) kann man bestimmte Gene experimentell in Embryonen oder Geweben zur Expression bringen, in denen dies unter natürlichen Bedingungen nicht oder nur in geringerem Maße geschehen würde. So verlockend solche Eingriffe in Entwicklungsprozesse sicherlich sind, so wird doch oft vergessen, daß eine Interpretation der dabei gewonnenen Ergebnisse immer eine exakte Kenntnis der Normalentwicklung des untersuchten Organismus voraussetzt (SLACK 1979, HENRY und MARTINDALE 1998). Es muß also eindeutig bekannt sein, welches Schicksal jede einzelne Zelle ohne den experimentellen Einfluß genommen hätte.

In der vorliegenden Arbeit werden nun die Ergebnisse von Injektionsexperimenten an den ersten acht Furchungszellen von *Platynereis* und zusätzlich einiger ausgewählter Blastomeren späterer Entwicklungsstadien präsentiert und mit denen DORRESTEIJNS an der selben Spezies und WILSONS an *Neanthes succinea* verglichen, da beide Arten in der Frühentwicklung überaus große Ähnlichkeiten miteinander besitzen. Die Ergebnisse belegen die Überlegenheit einer Lineage-Studie durch die Untersuchung markierter Blastomeren gegenüber einer solchen, die auf reiner Beobachtung beruht, da das Schicksal der Zellen bis zum jungen Wurm sicher erfaßt werden konnte. WILSONS Untersuchungen waren äußerst gründlich, verloren sich aber in wichtigen Punkten schon relativ bald in Unsicherheit bzw. erwiesen sich (unter der Voraussetzung der Gleichartigkeit der Frühentwicklung von *N. succinea* und *Platynereis*) als falsch.

Soweit mir bekannt ist, handelt es sich bei der vorliegenden Arbeit um die erste, in der die Cell-lineage eines Polychaeten durch moderne Methoden der Zellverfolgung untersucht wurde.

2. Material und Methoden

2.1. Verwendete Lösungen

Calcium-Magnesiumfreies Seewasser - CaMgfSw

nach Speksnijder und Dohmen 1983

495,1	mM	NaCl
9,7	mM	KCl
27,6	mM	NaHCO ₃
5,0	mM	EDTA (Merck)

Calcium-Magnesiumfreies Seewasser pH 8

Wie oben aber zusätzlich mit 50 mM TRIS-HCl (Serva), dann auf pH 8,0 eingestellt.

Phosphate Buffered Saline (PBS)

137	mM	NaCl
2,7	mM	KCl
8	mM	Na ₂ HPO ₄
1,5	mM	KH ₂ PO ₄

pH 7,4

PBS + Paraformaldehyd

4 % W/V Paraformaldehyd (Serva) in PBS wurden unter Rühren auf 70°C erwärmt. Dann wurde langsam so viel 1 N NaOH zugegeben, bis sich die Suspension (nach kurzer Verzögerung) klärte. Die Lösung wurde in kleinen Mengen angesetzt, in braunen Glasflaschen gelagert und höchstens einige Tage verwendet.

1,5 x und 2 x PBT + Paraformaldehyd

Wie PBS + Paraformaldehyd, aber mit 1,5- bis 2-facher PBS-Konzentration + 0,1 % Tween 20 (Sigma).

DABCO-Glycerin

25 mg DABCO (1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octan; Fluka 33480) wurden in 1 ml Aqua dest. gelöst + 9 ml Glycerin.

DABCO verhindert das Ausbleichen von Fluoreszenzfarbstoffen.

Glyceringelatine

Zur Einbettung. 7 g Gelatine wurden in 42 ml Aqua dest. mehrere Minuten gequollen. Dann kamen 63 g Glycerin (= 50 ml) hinzu. Schließlich wurde ein Kristall Phenol als Bakterizid beigegeben. Die Masse verfestigt sich bei Raumtemperatur. Zum Gebrauch wurde das Gemisch auf 45°C erwärmt.

Dithioerythritol/Trypsin-Gemisch

Zur Aufweichung der Vitellinhüllen von *Platynereis*. 4 mg Dithioerythritol (DTE, Sigma D-9680) und 6 mg Trypsin (Sigma T-4799) wurden in 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße abgewogen und verschlossen bei -20°C aufbewahrt. Zur Verwendung werden 2 ml Ca-Mg-freies Seewasser (pH 8,0) frisch hinzugegeben, da die Aktivität der Lösung schnell nachläßt. Alternativ zu DTE kann auch das stereoisomere Dithiothreitol (DTT, Sigma D-5545) verwendet werden.

Injektionsfarbstoff TRITC-Dextran

Beim injizierten Farbstoff handelte es sich um dextrangebundenes Tetramethylrhodamin (TRITC), das am Dextran mit Lysinresten dotiert ist, wodurch es durch Formaldehyd fixierbar wird (Molecular Probes D-1818; Mg 70.000).

Dextrane sind hydrophile Polysaccharide mit hohem Molekulargewicht und geringer Toxizität. Durch das hohe Molekulargewicht verbleibt der Farbstoff in den Blastomeren, d.h. es ist sichergestellt, daß das Konjugat nicht über Gap Junctions in fremde Klone übertreten kann. Durch die Fixierbarkeit ist gewährleistet, daß das Markierungsmuster auch nach dem Fixieren der Tiere räumlich unverändert bleibt.

Der Farbstoff wurde in einer Konzentration von 3% in 0,2 M KCl in sterilfiltriertem Aqua dest. gelöst und vor der Verwendung mit einer Tischzentrifuge (Heraeus, Biofuge A) für 5 Minuten bei 14.500 g zentrifugiert.

2.2. Tiermaterial

Platynereis dumerilii läßt sich als kleiner, schnellwüchsiger Polychaet gut in Gefangenschaft züchten³. Die Tiere werden in transparenten Haushaltsplastikschalen in einem Gemisch von natürlichem und künstlichem Seewasser im Verhältnis 1 : 1 bei 18°C gehalten. Der Deckel jeder Schale ist mit einem Loch versehen, durch das ein gläsernes Belüftungsrohr bis an den Boden eingeführt wird. Als Futter dienen Spinat, Algen und Fischfutter (TetraMin[®]).

Platynereis ist monotelisch (semelpar), d. h. die Tiere laichen nur einmal in ihrem Leben, danach verenden sie. Dieser einzige Laichtermin wird lunarperiodisch beeinflusst, so daß jeweils zur selben Zeit eine genügend große Anzahl geschlechtsreifer Tiere vorhanden ist. Eine solche Synchronisation ist erst recht in der Laborzucht notwendig, in der eine schwache Glimmlampe, die sieben Nächte jeder Lunarperiode brennt, als Ersatz für das Licht des Vollmondes dient. Während in freier Natur nicht zu jeder Jahreszeit Nachkommen erhalten werden können, ist dies unter Laborbedingungen aber der Fall.

In der zweiten und dritten Woche nach Beendigung der künstlichen Mondlichtphase können den Hälterungsschalen Tiere entnommen werden, die bereits geschlechtsreif bzw. erkennbar auf dem Weg zur Geschlechtsreife sind. Sie lassen sich leicht identifizieren, da Tiere in epitoker⁴ Metamorphose nicht mehr fressen, also kein Darminhalt mehr durch das Integument schimmert. Zusätzlich verändert sich die Färbung der Würmer und zwar unter anderem durch die Geschlechtsprodukte, die ebenfalls durch das Integument hindurch zu erkennen sind: die Weibchen erscheinen durch die Oocyten gelb, während die Männchen im vorderen Abschnitt durch die Spermien grünlichweiß und im hinteren Abschnitt durch den Blutfarbstoff rot gefärbt sind.

Damit die Tiere nicht vorzeitig ablaichen, werden metamorphosierende Tiere nach Geschlechtern getrennt in belüfteten Glasschalen gesammelt. Sind die Tiere reif, so ist das daran zu erkennen, daß sie ihre Wohnröhren verlassen, um auf der Suche nach Geschlechtspartnern umherzuschwärmen. Bringt man

³ Eine detaillierte Beschreibung des Ansatzes und der Aufrechterhaltung einer Laborzucht von *Platynereis dumerilii* findet sich bei HAUENSCHILD und FISCHER (1969).

⁴ Epitokie bezeichnet die Veränderungen des Erscheinungsbildes die im Zusammenhang mit der Geschlechtsreifung auftreten. Vor der Geschlechtsreifung werden die Tiere als „atok“ bezeichnet.

schwärmende Tiere unterschiedlichen Geschlechts in einem kleinen Boverischälchen zusammen, so geben sie meist augenblicklich ihre Gameten ab.

Nach erfolgreicher Besamung scheiden die Eizellen eine dicke Gallertschicht ab, wodurch die Keime auf gegenseitige Distanz rücken und eine bienenwabenartige Anordnung zueinander einnehmen. Binnen 24 Stunden haben sich daraus die Trochophoralarven gebildet (Fig. 1J, Seite 17), die sich aus ihrer Gallerte befreien und aufgrund ihrer positiven Phototaxis auf der dem Licht zugewandten Seite des Hälterungsgefäßes sammeln. Nach 48 Stunden haben sich die Trochophorae bereits etwas in die Länge gestreckt und die Anlagen der ersten drei Parapodienpaare mit ihren Borsten sind deutlich zu erkennen. In diesem Stadium werden die Tiere als Metatrochophorae bezeichnet (Fig. 1K, Seite 17). Im Alter von 72 Stunden sind drei Segmente voll ausgebildet. Am Kopf erkennt man die Anlagen der anterioren Antennen, der ventralen Palpen und der seitlichen Peristomialzirren. Am posterioren Ende des Rumpfes sind nun auch die Anlagen der Uriten des Pygidiums zu sehen. Auf dieser Entwicklungsstufe werden die Tiere auch als Nectochaeten bezeichnet (Fig. 1L, Seite 17).

Dreitägige Tiere sind noch nicht in der Lage Nahrung aufzunehmen, da noch kein durchgängiges Darmlumen vorhanden ist. Der Darm besteht zu dieser Zeit nämlich aus einem soliden Paket von Zellen die noch mit Proteindotter und Lipid der Eizelle erfüllt sind, von dem die Würmer zunächst zehren. Erst im Alter von sieben Tagen setzt eine regelmäßige Nahrungsaufnahme ein. Wenngleich die Tiere nach dem dritten Lebenstag durchaus einige morphologische Veränderungen erfahren (vergl. Abb. 18b und c), so verharren sie doch einige Zeit auf der Entwicklungsstufe von drei Segmenten, wobei sie allerdings bald die planktische Lebensweise aufgeben. Denn nachdem die Spinndrüsen an der Basis des zweiten und dritten Parapodienpaares funktionstüchtig geworden sind, bauen sie mit ihrer Hilfe Gespinströhren, in denen sie sich fortan vorwiegend aufhalten. Erst einige Tage nach Beginn der regelmäßigen Nahrungsaufnahme beginnt die Sprossungszone anterior des Pygidiums mit der Bildung neuer Segmente. Ist eine Größe von fünf bis sechs parapodientragenden Segmenten erreicht, setzt der Prozeß der sogenannten „Cephalisation“ ein: die Borsten des vordersten Segmentes fallen nach und nach aus, die Zirren dieses Parapodienpaares verlängern sich stark und rücken an den Kopf heran, wo sie zu

den hinteren Peristomialzirren werden. Das erste Segment der Larve endet so als funktioneller Bestandteil des Kopfes und läßt wenig später nichts mehr von seiner ursprünglichen Herkunft ahnen. Im dreisegmentigen Wurm unterscheidet sich das erste Parapodienpaar von den beiden anderen dadurch, daß es keine Spinndrüsen besitzt.

Abbildungslegende Fig. 1 (Seite 17)

Normalentwicklung von *Platynereis dumerilii* nach den Untersuchungen von DORRESTEIJN. Alle Abbildungen modifiziert nach DORRESTEIJN et al. 1993a und DORRESTEIJN 1990a.

Fig. 1A: 2-Zellstadium, Ansicht von animal. Die erste Teilung verläuft stark inäqual und führt zu einer großen CD- und einer kleinen AB-Blastomere. In der Mitte erkennt man die beiden Polkörper.

Fig. 1B: 4-Zellstadium, Ansicht von animal. Aus einer stark inäqualen Teilung der Blastomere CD des 2-Zellstadiums geht eine besonders große D-Blastomere und eine kleinere C-Blastomere hervor. Die Zelle AB hat sich dagegen annähernd äqual geteilt, so daß die Blastomeren A und B etwa die gleiche Größe besitzen. In der Mitte erkennt man die beiden Polkörper.

Fig. 1C: 8-Zellstadium, Ansicht von animal. Man erkennt das animal gelegene erste Quartett von Mikromeren (1a bis 1d) und darunter die vegetalen Makromeren (1A bis 1D). Beachte, daß die Mikromeren gegenüber den Makromeren im Uhrzeigersinn (dextrotrop) versetzt sind. In der Mitte erkennt man die beiden Polkörper.

Fig. 1D: 16-Zellstadium, Ansicht von animal. Nach einer weiteren, annähernd synchronen Teilungsrunde, ist den vegetal gelegenen Makromeren (sie nennen sich jetzt 2A bis 2D) ein zweites Quartett Mikromeren (2a bis 2d) entsprungen. Die Mikromere 2d zeichnet sich dabei durch ihre außerordentliche Größe aus; sie ist der sogenannte „Somatoblast“, aus dem das gesamte Rumpfektoderm entsteht. Beachte, daß das zweite Quartett Mikromeren im Gegenuhrzeigersinn (laeotrop) abgegeben wurde. Auch die Mikromeren des ersten Quartetts haben sich laeotrop geteilt und zwar in die animal gelegenen Mikromeren $1a^1$ bis $1d^1$ und die vegetal davon gelegenen Mikromeren $1a^2$ bis $1d^2$. Nach einer Teilung der Mikromeren erhalten die animal gelegenen Zellen immer den Exponenten 1, die vegetal gelegenen den Exponenten 2. In der Mitte erkennt man die beiden Polkörper.

Fig. 1E und F: 29-Zellstadium. Dieses Stadium, dessen Zellzahl von der Potenz von 2 abweicht, wird aufgrund einsetzender Asynchronien im Zellteilungsgeschehen erreicht. Alle Vorläuferzellen des Prototrochs (des äquatorialen Gürtels cilienbesetzter Zellen der Trochophora) sind grau unterlegt, die sogenannten „Trochoblasten“ $1a^{12}$ bis $1d^{12}$, $1a^{21}$ bis $1d^{21}$ und $1a^{22}$ bis $1d^{22}$. Sie

befinden sich in diesem Stadium der Entwicklung noch oberhalb des Äquators, in der Trochophora ist die Lage des Prototrochs dann äquatorial.

(E) zeigt eine Ansicht von schräg animal, der animale Pol befindet sich etwas links der Bildmitte und ist durch einen Polkörper gekennzeichnet.

Die Ansicht auf (F) ist von schräg vegetal, der vegetale Pol befindet sich in der Mitte der Berührungsfläche der Makromeren 4D und 3B.

Beachte, daß sich wegen der Teilungsasynchronien die Makromere des D-Quadranten bereits in der sechsten, wiederum laeotropen Teilungsrunde befindet (sich in 4D und 4d aufspaltet), während sich die übrigen Makromeren noch im vorherigen dextiotrop entstandenen Zyklus befinden (3A bis 3C). Die Zelle 4d ist der sogenannte „Mesentoblast“, aus dem große Teile des Mesoderms entstehen. Auch die dextiotrope Teilung von 2c in $2c^1$ und $2c^2$ ist noch im Gange. Die Mikromere 2d hat sich zu diesem Zeitpunkt nach einer stark inäqualen Teilung bereits dextiotrop in die große Zelle $2d^1$ und die sehr kleine Zelle $2d^2$ aufgespalten.

Fig. 1G und H: 46-Zellstadium. Die animale Ansicht auf (G) zeigt, daß zu diesem Zeitpunkt der Somatoblast 2d nach drei extrem inäqualen Teilungen bereits mehrere kleine Zellen abgegeben hat, nämlich $2d^2$ nach links (sie hat sich hier bereits weitergeteilt), $2d^{12}$ nach rechts und $2d^{111}$ nach animal. Man erkennt, wie $2d^{111}$ sich in den grau unterlegten Ring der Trochoblasten hineinschiebt und diesen damit unterbricht (vergl. mit Fig. 1E, 29-Zellstadium, dort ist der Ring noch geschlossen).

Die vegetale Ansicht auf (H) zeigt, daß alle Makromeren im 46-Zellstadium bereits ihr viertes und letztes Quartett an Mikromeren abgegeben haben (4a bis 4d), wegen des beschleunigten Zellzyklus des D-Quadranten hat sich die Mikromere 4d aber bereits bilateralsymmetrisch weitergeteilt und zwar in die Zellen $4d^1$ und $4d^2$. Der vegetale Bereich des Keimes wird noch ausschließlich von den Makromeren 4A bis 4D gebildet, aus denen das Entoderm hervorgeht. Sie werden, zusammen mit den Nachkommen des Mesentoblasten 4d, im weiteren Verlauf der Zellteilungen von den übrigen Mikromeren umwachsen und damit internalisiert. Es handelt sich hier also um eine epibolische Gastrulation.

Fig. 1I: 66-Zellstadium. Ansicht von animal. Zu dieser Phase der Entwicklung sind nun auch Abkömmlinge von 2d zur bilateralsymmetrischen Teilungsweise übergegangen, indem sich $2d^{112}$ in die Blastomeren $2d^{1121}$ und $2d^{1122}$ aufgespalten hat.

Fig. 1J bis L: Larvenformen von *Platynereis*. (J) 24 Stunden alte Trochophora. Der apikale Wimperschopf (aWs) bezeichnet den anterioren (animalen) Pol, gegenüber liegt der posteriore (vegetale) Pol. Das Stomodaeum (St) liegt median ventral, die abgewandte Seite entspricht also der Dorsalseite. Oberhalb des Prototrochs liegt die Episphäre der Trochophora, und unterhalb die Hyposphäre. (K) 48 Stunden alte Metatrochophora. (L) 72 Stunden alter Jungwurm.

A = Auge, An = Antennenanlagen, aWS = apikaler Wimperschopf, IDz = larvale Drüsenzellen
P = Prototroch, Pa = Anlage der Palpen, Pe = Peristomialzirren, Py = Pygidium, S = Stomodaeum, U = Uriten, Vp = Ventralplatte.

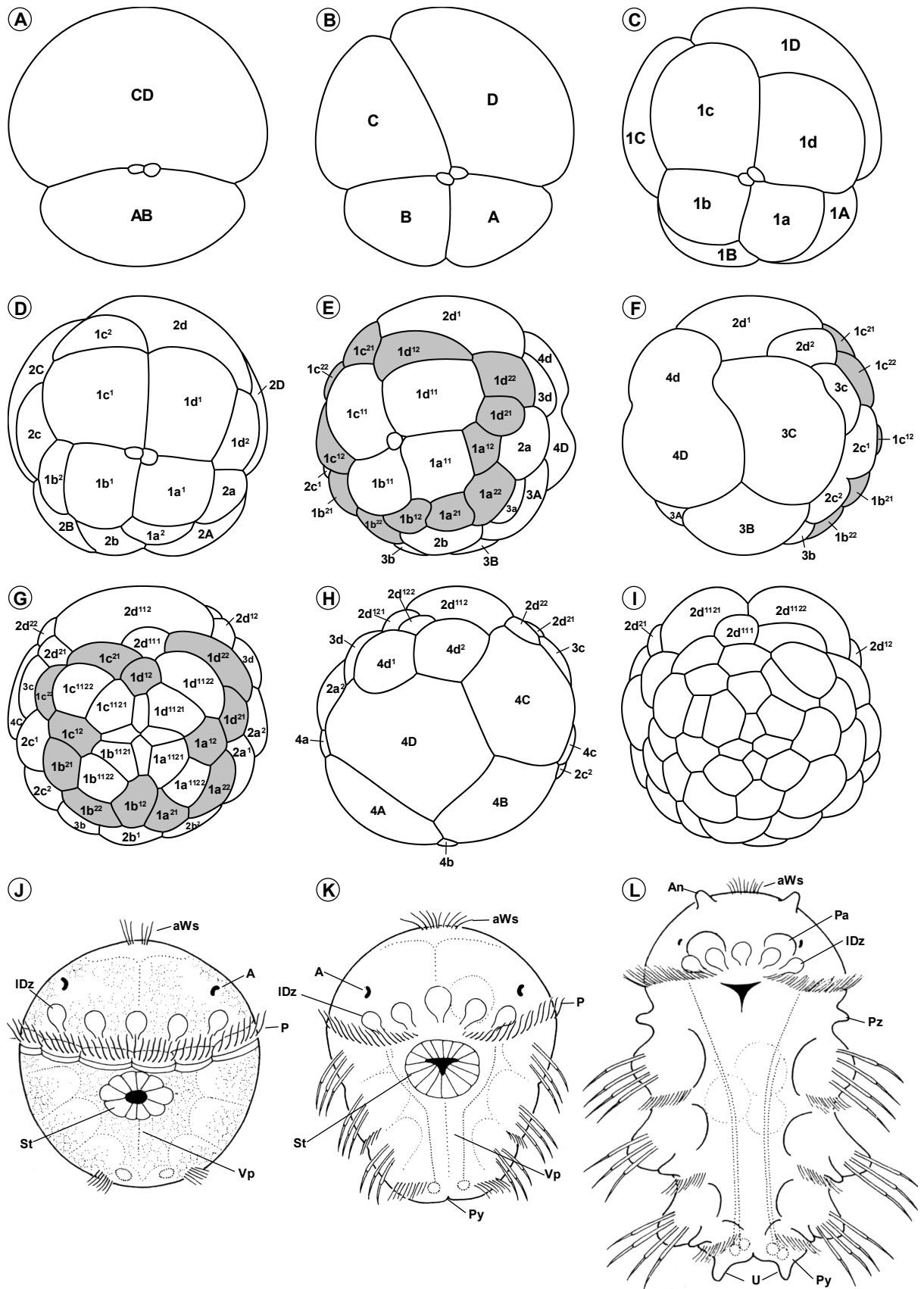


Fig. 1: Normalentwicklung von *Platynereis dumerilii* modifiziert nach DORRESTEIJN et al. 1993a und DORRESTEIJN 1990a.

2.3. Prozeduren

Gewinnung besamter Oocyten

Geschlechtsreife Männchen und Weibchen geben ihre Gameten ab, sobald sie in einem gemeinsamen Gefäß zusammengeführt werden. Da die Tiere sich dabei mit großer Geschwindigkeit gegenseitig umkreisen (Schwärmtanz) ist es schwierig, das Männchen zu entfernen, bevor die Menge abgegebenen Spermias zu Polyspermie führt. Daher wurden die Männchen leicht angequetscht, so daß Sperma aus dem Coelom austrat. Eine geringe Menge dieser Spermiesuspension in natürlichem Seewasser⁵ wurde in ein kleines ebenfalls mit natürlichem Seewasser gefülltes Boverischälchen gegeben. Nach Zugabe eines Weibchens begann dies in aller Regel sofort mit der Eiabgabe.

Entfernung der Gallerthülle

Unmittelbar nach der Besamung beginnen die Keime mit der Ausscheidung quellbarer Substanzen, die eine Gallerthülle um den Keim bilden. Diese Corticalreaktion ist etwa 25 Minuten nach der Besamung abgeschlossen. Da die Gallerschicht eine Injektion unmöglich macht, wurde sie mittels ungepuffertem Ca-Mg-freiem Seewasser entfernt. Dieser Schritt muß zügig erfolgen, da sich die Vitellinhülle bei einer längeren Einwirkzeit von Ca-Mg-freiem Seewasser ausweitet. Eine möglichst eng anliegende Vitellinhülle ist aber notwendig für eine reguläre Entwicklung der Keime.

Zur Entfernung der Gallerte wurde etwa 1/2 bis 1/3 Gelege einer größeren Menge (etwa 150 ml) Ca-Mg-freiem Seewasser in einem Boverischälchen zugegeben. Durch eine Pasteurpipette mit aufgesetztem Gummihütchen wurde nun das Ca-Mg-freie Seewasser durch Pumpen in Rotation versetzt. Dazu wurde die Pipettenspitze in flachem Winkel zur Flüssigkeitsoberfläche und tangential zum Rand des Schälchens in das Medium eingetaucht. Bei einer angepaßten Stärke dieser Flüssigkeitsrotation bleiben alle Embryonen mit Gallerthülle in Suspension, aber diejenigen, die ihre Gallerthülle bereits verloren haben, sinken wegen ihres höheren spezifischen Gewichtes zu Boden und rotieren in der Schalenmitte ein.

⁵ Eine erfolgreiche Besamung und Frühentwicklung der Keime ist nur in natürlichem Seewasser möglich.

Diese Methode erwies sich deutlich schneller als reines Schwenken des Boveri-schälchens. Der Grund könnte darin liegen, daß bei jedem Pumpvorgang ein Teil der Keime in die Pipette eingesaugt und wieder ausgetrieben wird, wodurch Scherkräfte entstehen könnten, die das Ablösen der Gallerte beschleunigen. Bereits nach kurzer Zeit fand sich bei dieser Vorgehensweise eine genügend große Anzahl (etwa 200) gallerthüllenfreier Embryonen am Schalengrund, die nun mit einer Bremspipette abgesammelt und in ein bereitstehendes Glasblock-schälchen mit natürlichem Seewasser übergeführt werden konnten. Nach zwei-maligem Wechsel des natürlichen Seewassers waren die Keime dann für die weiteren Behandlungsschritte bereit.

Herstellung und Beladung der Injektionspipetten

Nach DTE/Trypsin-Behandlung der Keime sind die Vitellinhüllen von *Platy-neris* zwar destabilisiert, setzen dem Einstechen von Injektionspipetten aber immer noch einen gewissen Widerstand entgegen. Injektionspipetten, die zu einem langen, dünnen Filament ausgezogen waren, sind für Injektionen ungeeignet, da sie nicht genügend Eigenfestigkeit besitzen und daher selbst bei senkrechtem Druck gegen die Vitellinhülle umbiegen. Deswegen mußten Injektionspipetten gezogen werden, die auf einer möglichst kurzen Strecke spitz auslaufen, also einem relativ stumpfen Konus entsprechen, der mit einem kurzen spitzen Filament endet.

Durch systematische Variation der Parameter des verwendeten Mikroinjektionspullers (Flamin/Brown Micropipette Puller Modell P-87, Sutter Instruments Co. (U.S.A.)) an Borsilikatglaskapillaren mit Innenfilament (Typ GB120F-10, Science Products GmbH (SPT, Hofheim), 1 mm Innendurchmesser) wurden weit über 100 unterschiedliche Typen hergestellt und gegebenenfalls an DTE/Trypsin-behandelten Keimen getestet. Nach vielen solchen Tests gelang es schließlich eine Pipettenform zu finden, deren mechanische Eigenschaften die geforderten Bedingungen annähernd erfüllte, und die gleichzeitig eine nicht zu große Tendenz zur Verstopfung aufwies. Dafür wurde ein dreistufiges Pull-Programm entwickelt, das auf folgenden Geräteeinstellungen beruhte:

Heat	328	Pull	0	Velocity	0	Time	200
Heat	328	Pull	0	Velocity	0	Time	200
Heat	328	Pull	150	Velocity	30	Time	110

Allerdings waren die Ergebnisse dieses Pull-Programms nicht vollkommen reproduzierbar, gelegentlich wurden daher leichte Anpassungen der Heat-Einstellung vorgenommen. Die resultierende Injektionspipette ist in Fig. 2 zu sehen.



Fig. 2: Injektionspipette von dem Typ, der für die Injektionsexperimente an *Platynereis* verwendet wurde.

Es erwies sich als günstig, die Injektionspipetten etwa eine Stunde vor Gebrauch zu ziehen, falls das arbeitstechnisch möglich war. Denn jüngere und ältere Exemplare zeigten eine erhöhte Tendenz zu verstopfen.

Die gezogenen Pipetten wurden in einer geschlossenen Petrischale auf Plastillinstückchen gesteckt aufbewahrt, vor der Injektion mit Eppendorf Microloadern mit der TRITC-Dextran-Lösung befüllt und dann bis zur Injektion in einer wasserdampfgesättigten Kammer gelagert. Auch hier zeigte sich wiederum, daß die Qualität der Pipetten zeitabhängig war, denn wenn sie etwa 20 Minuten vor ihrer Verwendung mit Farbstoff gefüllt wurden, war die Tendenz zur Verstopfung geringer. Auch galt es, die Pipetten möglichst kurz vor einer Injektion in ihre Halterung am Mikromanipulator der Injektionsapparatur einzuspannen, da dies die Wahrscheinlichkeit zur Verstopfung verringerte. Üblicherweise konnte mit einer Pipette nur ein Keim injiziert werden, dann mußte sie durch eine neue ersetzt werden.

Inkubation der Keime im DTE/Trypsin-Gemisch

Einem 2 ml Eppendorfreaktionsgefäß das 4 mg DTE und 6 mg Trypsin enthielt, wurde unmittelbar vor den nachfolgenden Prozeduren 2 ml Ca-Mg-freies Seewasser, pH 8,0, zugegeben. Die Substanzen wurden durch heftiges Schütteln in Lösung gebracht und dann in ein Glasblockschälchen übergeführt.

Die Inkubation der Keime in dieser Lösung begann in der Regel erst dann, wenn die Embryonen das gewünschte Furchungsstadium bereits erreicht hatten. Dadurch war gewährleistet, daß das „Korsett“ der Vitellinhülle bis zum Abschluß des letzten Teilungsschrittes noch eng ansaß wodurch bis zu diesem Zeitpunkt auf jeden Fall ein korrektes Teilungsmuster erwartet werden konnte. Da die Blastomeren in den ersten Minuten nach dem Abschluß einer Teilungsrunde eine größere Tendenz haben bei einer Injektion zu lysieren, war dies keine Verschwendung wertvoller Injektionszeit.

Es wurden immer etwa 50 synchrone Teilungsstadien eines Geleges gleichzeitig unter leicht kreisender Bewegung des Blockschälchens inkubiert. Die Vitellinhüllen heben sich dabei mit fortschreitender Einwirkzeit des Gemisches und abhängig von der Temperatur nach und nach von den Keimen ab. Da die Temperatur im Labor nicht konstant gehalten werden konnte, wurde das Voranschreiten der Wirkung des Gemisches unter einem Stereomikroskop bei 40-facher Vergrößerung beobachtet: die Inkubation wurde abgebrochen, wenn sich die Hüllen um ein aus Erfahrung gewonnenes Maß abgehoben hatten, was bei den Temperaturen von 20 bis 23°C die im Labor herrschten etwa 60 bis 90 Sekunden in Anspruch nahm und die Zeit zum Überführen der angedauten Embryonen in ein Blockschälchen mit natürlichem Seewasser zum Waschen mit einschließt. Eine zu kurze Inkubation führt dazu, daß sich die Vitellinhüllen mit der Injektionspipette nicht durchstechen lassen, nach einer zu langen Inkubationszeit verläuft die Entwicklung der Keime wegen der zu weit abgehobenen Vitellinhülle gestört, außerdem verkleben die Vitellinhüllen aneinanderliegender Keime dann miteinander. Nach einmaligem Wechsel des natürlichen Seewassers zum Waschen wurden die Embryonen sofort mit einer Bremspipette aufgenommen und dem inversen Lichtmikroskop mit seiner Injektionsvorrichtung zugeführt. Durch die relativ große Anzahl von Keimen, die bei jedem Durchgang der Apparatur aufgetragen wurde war gewährleistet, daß sich schneller ein Exemplar finden ließ, dessen räumliche Orientierung günstig für die Injektion in eine bestimmte Blastomere war.

Injektionsapparatur/Injektionen

Die Injektionsapparatur bestand aus einem modifizierten Zeiss IM35 Inversmikroskop mit Durchlicht- und Fluoreszenzbeleuchtung (Quecksilberdampfampe HBO, 50 W (Osram)), das Schwingungsgedämpft aufgestellt war. Durch einen

elektromagnetisch steuerbaren Mechanismus konnte per Knopfdruck der Strahlengang der Fluoreszenzbeleuchtung freigegeben bzw. gesperrt werden (Eigenbau der mechanischen Werkstatt). Dadurch war es möglich, die Fluoreszenzbeleuchtung gezielt zuzuschalten, wenn sie zur Beobachtung des Injektionserfolgs notwendig war. Ein frühzeitiges Ausbleichen des Fluoreszenzmarkers konnte so verhindert werden.

Links und rechts des dreh- und nach allen Seiten verschiebbaren Objektives waren zwei Mikromanipulatoren angebracht, ein manuell bedienbarer für die Ansaugpipette zum räumlichen Fixieren der zu injizierenden Keime und ein elektromotorisch bewegbarer für die Injektionspipette.

Als Ansaugpipetten dienten 230 mm lange Pasteurpipetten, deren Spitzen dünn ausgezogen und an einer Stelle passenden Durchmessers mit einem Diamantschneider gekappt wurden. Die scharfkantigen Abbruchstellen wurden durch leichtes Anschmelzen abgerundet. Es wurden solche Exemplare verwendet, bei denen danach ein freies Lumen von etwa 20 bis 50 μm (siehe Fig. 3, Seite 36) blieb. An das Hinterende dieser Pipetten wurde ein Silikonschlauch mit einem äußerst engen Reduktionsstück aufgesteckt, so daß trotz kräftigen Saugens oder Blasens mit dem Mund stets nur minimale Volumina durch die vordere Öffnung der Pipette bewegt werden konnten. Damit ließen sich Keime mit fein abstufbarem Unterdruck an die Öffnung ansaugen und somit räumlich fixieren.

Die Injektionspipetten wurden in einem Plastikhalter festgeklemmt, der einen dünnen Silberdraht besaß, welcher in die elektrolytgefüllte Pipette hineingriff. Der Plastikhalter selbst war an einen PM-10 Piezostepper (Fa. Märzhäuser) festgeschraubt, der über ein Steuergerät angesprochen werden konnte, das gleichzeitig zur Bewegung des Mikromanipulators in x-, y- und z-Richtung diente. Der Vorschub in x-Richtung löste dabei zuerst das Piezoelement aus, dem mit kurzer Verzögerung der rein elektromotorische Vorschub folgte. Die Vorschubgeschwindigkeit des Piezoelementes konnte zwischen 1 und 100 mm/s, die Schrittgröße zwischen 0,5 und 10 μm variiert werden.

Zur Injektion wurden Keime mit destabilisierter Vitellinhülle auf eine speziell präparierte Plastikpetrischale aufgebracht. Diese besaß in der Mitte eine Bohrung

von etwa 2,5 cm Durchmesser. An der Unterseite der Petrischale war dieses Loch mit einem runden Deckglas verschlossen, das mit Vaseline wasserdicht angeklebt wurde. In die dadurch entstandene Kavität konnten einige Milliliter natürliches Seewasser eingebracht werden, in denen die Keime injiziert wurde.

Wenn durch Bewegung des Objektisches unter den aufgetragenen Keimen ein geeigneter gefunden war, wurde die Ansaugpipette von links an diesen herangefahren und der Keim durch Saugen so vorsichtig als möglich und nicht fester als notwendig an die Mündung der Pipette angelagert. Von rechts wurde dann die farbstoffbeladene Injektionspipette herangefahren und senkrecht auf die ausgewählte Blastomere gesetzt (die natürlich entsprechend orientiert sein mußte), so daß die Spitze gerade die Oberfläche der Vitellinhülle über der Blastomere berührte bzw. leicht eindellte. War die Pipette nach dem Auslösen des Piezosteppers erfolgreich in das Innere einer Blastomere eingedrungen, so wurde dem Keim zunächst etwa eine halbe Minute Gelegenheit gegeben, sich von diesem „Schock“ zu erholen. Tat er dies, sprich: lysierte die durchdrungene Blastomere nicht, so wurde der Injektionsstrom angelegt (Iontophoresegerät Iontophor 3, Jahn-Elektronik), der typischerweise um 10 nA lag. Eine gepulste Injektionsweise (im Wechsel 1 Sekunde Strom, gefolgt von 1 Sekunde Pause) erwies sich als geeignet um ein vorzeitiges Verstopfen der Injektionspipetten zu verhindern. Je nach Durchlässigkeit der Pipetten wurden einige wenige bis über 100 Pulse verabreicht. Dies geschah unter visueller Kontrolle bei eingeschalteter Fluoreszenzbeleuchtung. Die Injektion wurde grundsätzlich beendet, wenn die Fluoreszenz der Blastomeren ein ausreichendes Maß erreicht hatte, im Falle geringdurchlässiger Pipetten wurde sie so lange fortgesetzt, wie die Intensität der Fluoreszenz noch wahrnehmbar anstieg.

Nach vollendeter Injektion wurde dem angesaugten Keim noch etwa 30 Sekunden Zeit gegeben um sich vom Injektionsstreß zu erholen, bevor die Pipette mit relativ hoher Geschwindigkeit zurückgezogen wurde; ein zu langsames Zurückziehen erhöhte die Wahrscheinlichkeit einer Lyse der injizierten Blastomere. Durch Einblasen von Luft in die Ansaugpipette wurde der Keim dann freigesetzt, unter mikroskopischer Kontrolle mit einer Bremspipette aufgenommen und in ein mit natürlichem Seewasser gefülltes Blockschälchen übergeführt.

Darin wurde der Embryo in einen 18°C-Raum verbracht, wo er unter Lichtabschluß und gegen Verdunstung geschützt aufbewahrt wurde.

Die Entwicklung der injizierten Embryonen wurde jeden Tag verfolgt. Oft kam es vor, daß Tiere sich im Übergangsbereich vom Wasser zur Luft verfangen, diese mußten dann möglichst vorsichtig wieder unter die Wasseroberfläche verbracht werden. Außerdem erfolgte täglich ein Wasserwechsel.

Fixation markierter Tiere

Erfolgreich markierte Tiere wurden in 4 % w/v-Paraformaldehydlösung, die maximal einige Tage lang verwendet wurde, 1 Stunde bei Raumtemperatur unter leichter Bewegung auf dem Schüttler fixiert. Jungwürmer kontrahieren entlang ihrer Längsachse wenn sie dem Fixans ausgesetzt werden, weswegen manche Tiere in den Ergebnissen stark gestaucht erscheinen. Um diesen störenden Effekt zu vermeiden, wurde (allerdings erst bei späteren Injektionen) die Muskulatur der Tiere im Vorfeld durch eine mehrminütige Inkubation in einer Mischung aus einem Teil natürlichem Seewasser mit einem Teil 7,5 % MgCl₂-Lösung gelähmt. Dieses Gemisch verhält sich zu natürlichem Seewasser isotonisch.

Da die fixierten Tiere direkt weiterverarbeitet wurden, erfolgten unmittelbar nach der Fixation drei Waschschriffe à 20 Minuten in PBS unter leichter Bewegung auf dem Schüttler.

Einbettung der fixierten Tiere

Fixierte Tiere wurden in einen kleinen Tropfen auf 50°C erwärmter Glycerin-gelatine übergeführt und vorsichtig mit einem Deckglas als Abstandshalter bedeckt. Dreisegmentige Würmer orientierten sich dabei von selbst mit ihrer dorsoventralen Achse senkrecht zum Objektträger. Eine bestimmte Orientierung stellt sich bei Trochophorae nicht ein und es wurde darauf verzichtet, sie unter dem Epifluoreszenzmikroskop mechanisch zu orientieren, da die Gefahr zu groß war, sie dabei zu zerstören.

Die eingebetteten Exemplare wurden bis zu ihrer Untersuchung im konfokalen Rasterlichtmikroskop bei -20°C unter Lichtabschluß aufbewahrt.

2.4. Bildaufnahme/Datenverarbeitung

Mikroskopie

Die eingebetteten Tiere wurden so früh als möglich mit einem konfokalen Rasterlichtmikroskop der Firma Leica untersucht. Verwendet wurde folgende Konfiguration:

Leica DMRB-Mikroskop mit Leica True Confocal Scanner TC54D-Scanaufsatz. Das Gerät arbeitete anfangs mit einem Omnicrome Ar-Kr-Laser (457 – 675 nm), der später durch Einzelfrequenzlaser ersetzt wurde. Für die TRITC-Anregung wurde dann ein Krypton-Laser (586 nm) verwendet.

Konventionelle Durchlichtmikroskopie wurde mit einem Zeiss Axioplan mit Nomarskiptik und Optovar Nachvergrößerungsvorrichtung durchgeführt. Als Kamera diente eine Colorview 12-Kamera (Olympus) mit dem Bildaufnahme/Bearbeitungssystem analySIS (Ver. 3.2, Build 635; Fa. SIS).

Verarbeitung der Daten

Dreidimensionale Datensätze gescannter Tiere wurden mit dem 3D-Bildverarbeitungs- und Visualisierungsprogramm Amira (Fa. TGS) in den Versionen 2.0 bis 2.3, zunächst unter Linux, dann unter Windows NT 4 und Windows 2000 auf x86-Rechnern verarbeitet. Insbesondere wurde die schwache Hintergrundfluoreszenz angehoben um daraus transparente virtuelle Wurmkörper zu konstruieren („Segmentierung“; z.B. Abb. 6a, transparente Bereiche), um die nicht markierten Bereiche der Tiere darzustellen. Außerdem diente das Programm zur Anfertigung von Oberflächenmodellen der Markierungsdomänen (z.B. Abb. 6a, goldgelbe Bereiche) und zum „Volume Rendering“ von Datensätzen für halbtransparente Ansichten der Markierungsdomänen (z.B. Abb. 17a). Auch für die Auswertung wurden verschiedene Funktionen dieses Programms benutzt.

Für weitere Arbeiten dienten ImageJ, Versionen 1.14 – 1.27 (National Institutes of Health, U.S.A.; allgemeine Bildbearbeitungszwecke und speziell zum Erstellen von Stapelbildprojektionen), Photoshop Ver. 5.02 und Ver. 6.01 (Fa. Adobe; allgemeine Bildverarbeitungszwecke, Stapelbildverarbeitung), Giotto Ver. 1.13 und 1.21 (von Georg Dittié; für Bildadditionen) und der Zeiss Image

Browser (Fa. Carl Zeiss GmbH; teilweise für Bildprojektionen und zur Durchsicht/zum schnellen Vergleich von 3D-Datensätzen).

2.5. Elektronenmikroskopie

Zur Untersuchung der Veränderungen in der Vitellinhülle durch DTT/Trypsin wurden gallertfreie Vierzellstadien von *Platynereis dumerilii* Dithiothreitol (DTT), Trypsin und einem Gemisch aus DTT und Trypsin ausgesetzt und anschließend für elektronenmikroskopische Untersuchungen behandelt. Bei den späteren Experimenten wurde statt DTT das stereoisomere Dithioerythritol (DTE) verwendet, dessen Wirkung aber vollkommen identisch ist.

Vorfixierung

2,5 % Glutaraldehyd-Lösung wurden in 0,2 Mol Phosphatpuffer nach Sørensen (s. u.), gelöst, und dann 0,14 Mol NaCl (0,82 g/100 ml) zugegeben.

Phosphatpuffer nach Sørensen:

0,2M Na₂HPO₄ wurde vorlegt, dann so viel 0,2M KH₂PO₄ zugeben, bis pH 7,4 erreicht war.

Die Fixationsdauer betrug 1 Stunde bei Raumtemperatur.

Waschen

0,2 Mol Phosphatpuffer (s. o.) mit

0,3 Mol NaCl (1,75 g/100 ml).

Darin wurde dreimal 10 Minuten bei Raumtemperatur gewaschen.

Nachfixierung

2,5 % NaHCO₃ (2,5 g/100 ml) und

2 % NaCl (2 g/100 ml)

wurden in Aqua dest. gelöst und mit HCl auf pH 7,4 eingestellt.

Diese Lösung wurde 1 : 1 mit 4 %iger OsO₄-Lösung gemischt.

Die Fixationsdauer betrug 1 Stunde bei Raumtemperatur.

Einbetten in Agar

Nach zweimaligem kurzem Waschen in Leitungswasser wurden die Keime in Leitungswasser in Agar (1,5 %) übergeführt.

Der Agar wurde dazu aufgekocht, dann mit einer Pasteurpipette auf einen Objektträger auftragen, der auf einer Heizplatte von 70°C lag. Das Überführen der Keime in den Agar erfolgte mit möglichst wenig Wasser; nach Erstarren des Agars wurden die Keime mit einer Rasierklinge in kleinen Blöckchen ausgeschnitten.

Entwässerung

Die Entwässerung fand in folgender Ethanolreihe (unvergällt) statt:

30 % - 30 % - 50 % - 50 % - 70 % - 70 % - 96 % - 96 % - 100 % - 100%

Jeder Schritt dauerte 7 Minuten. Die Entwässerung in 96 %igem und 100 %igem Ethanol erfolgte in geschlossenen Gefäßen.

Einbettung in Araldit

Als Vorbereitung für das Einbetten wurden die Agarblöckchen mit den Keimen unter dem Abzug zwei mal für 10 Minuten in Propylenoxid gegeben, anschließend über Nacht in ein 1 : 1-Gemisch aus Araldit und Propylenoxid und dann in reines Araldit. Nach Überführung in Einbettungsformen wurde das Kunstharz 2 Tage lang bei 65°C polymerisiert.

Schnitte

Die Schnitte wurden mit Glasmessern auf einem Ultramikrotom (Reichert-Jung Ultracut E) angefertigt. Sie wurden auf dem Wasser treibend mit Xylol geglättet, auf Formvar (Serva 21740) beschichtete Kupfernetzchen übertragen und mit Uranylacetat und Bleicitrat kontrastiert.

Die Untersuchungen erfolgten mit Transmissionselektronenmikroskopen von Hitachi (H600) und Zeiss (EM900).

2.6. Actinanfärbungen

Drei- und viertägige Würmer wurden dazu über Nacht bei 4°C in 4% Paraformaldehyd + 2 x PBT fixiert. Anschließend wurde dreimal je 15 Minuten gewaschen und zwar in einer absteigenden Konzentration von 2 x, 1,5 x und schließlich 1 x PBT. Zur Erhöhung der Durchlässigkeit für das Phalloidin-Texas Red-Konjugat wurden die Tiere dann 4 Minuten bei Raumtemperatur in 0,1 mg/ml Proteinase K (Fa: MBI, 600 u/mg) in PBS inkubiert. Die Wirkung der Proteinase wurde direkt anschließend mit Glycin gestoppt, indem von einer Stammlösung (200 mg/ml) 30 µl auf 3 ml der Proteinase K-Lösung zugegeben wurden. Jetzt wurde 20 Minuten in 4% Paraformaldehyd in PBT refixiert und zweimal 15 Minuten in PBT, dann einmal 15 Minuten in PBS gewaschen.

Die Inkubation mit Phalloidin-Texas Red (Sigma, 175 ng/ml PBS) fand in jeweils 200 µl Volumen in kleinen Eppendorfreaktionsgefäßen auf dem Schüttler für 30 Minuten statt, anschließend wurde mit PBT einmal 15 Minuten und zweimal 5 Minuten gewaschen. Die Keime wurden jetzt in DABCO-Glycerin auf Objektträger übertragen und waren für die fluoreszenzmikroskopische Analyse bereit. Alle Arbeitsschritte mit dem Farbstoff wurden im Dunklen ausgeführt.

2.7. Interpretation der Bilddaten

Für die Interpretation der vorliegenden Farbstoffinjektionen ist folgendes zu beachten: als Folge der ooplasmatischen Segregation von klarem Cytoplasma und Speichereinschlußkörpern (Dotterproteinkörper und Lipidtröpfchen) liegen die Dotterproteinkörper in frühen Blastomeren dichtgepackt vor. Die anfangs zahlreichen Lipidtröpfchen vereinigen sich von Furchung zu Furchung zu immer größeren Tropfen.

Da der Proteindotter sehr kompakt ist, gelangt in ihn nur wenig bis kein Farbstoff, wenn die Injektion ausschließlich in den cytoplasmatischen Bereich erfolgt. Umgekehrt erreicht Markersubstanz die in den Proteindotter injiziert wird nur in geringen Mengen das Cytoplasma. Lipidtröpfchen werden nur dann markiert, wenn der Farbstoff direkt in ihr Inneres injiziert wird. Nur in wenigen Fällen wurde eine ausgewogene Verteilung des Farbstoffs in Cytoplasma und Dotter erzielt. Dieser Umstand erschwert den Vergleich von Exemplaren, bei denen identische Blastomeren injiziert worden waren.

Aufgrund der raschen Teilungszyklen früher Blastomeren von etwa 35 Minuten Dauer war das Zeitfenster für Injektion sehr eng bemessen. Daher wurden Injektionen gelegentlich auch schon direkt im Anschluß an die Cytokinese unternommen, auch wenn die Zellen zu diesem Zeitpunkt noch besonders instabil waren. Mitunter gelang das Einstechen der Mikropipette dann auch schon zu einem Zeitpunkt, zu dem eine Teilung noch nicht beendet war. In solchen Fällen konnte eine geringe Menge des Fluoreszenzfarbstoffs dann auch in die Geschwisterzelle gelangen.

Es konnte nicht gewährleistet werden, daß alle Blastomeren eine vergleichbare Konzentration an Farbstoff erhielten. Auch dieser Umstand erschwerte mitunter die Interpretation des Bildmaterials, nämlich dadurch, daß für die Untersuchung schwach markierter Tiere die Laserleistung zur Fluoreszenzanregung und die Empfindlichkeit des Photomultipliers im Rasterlichtmikroskop sehr hoch gewählt werden mußten. Unter diesen Voraussetzungen treten autofluoreszierende Strukturen im Vergleich zu intensiv markierten Tieren besonders stark hervor. Das ist besonders augenscheinlich bei den parapodialen Drüsen, die, je nach untersuchtem Tier und ohne erkennbare Zuordnung zur Injektion einer bestimmten Blastomere, teils kaum, teils überdeutlich hervortreten⁶. Aus diesem Grund läßt sich die Abstammung autofluoreszierender Strukturen mit Fluoreszenzmarkern auch nur schwer bestimmen.

⁶ Wobei beachtet werden muß, daß die parapodialen Drüsen erst bei viertägigen Tieren deutliche Autofluoreszenz aufweisen.

3. Ergebnisse

3.1. Elektronenmikroskopische Untersuchung angedauter Vitellinhüllen

Das Spektrum experimenteller Eingriffe an den Keimen von *Platynereis dumerilii* war bisher stets dadurch eingeschränkt, daß ihre Vitellinhülle dem Durchstechen mit Injektionspipetten unüberwindliche Hindernisse entgegensetzte und es andererseits keine Methode gab, um die Vitellinhülle zu jedem beliebigen Zeitpunkt in der Entwicklung zu entfernen bzw. abgestuft aufzuweichen. Man konnte lediglich die Hülle in Calcium-Magnesiumfreiem Seewasser ablösen und zwar unmittelbar nach Abschluß der Corticalreaktion, bei der innerhalb von 25 Minuten nach der Besamung durch Exocytose quellbares Material nach außen abgeschieden wird (KLUGE et al. 1995) und eine dicke Gallertschicht um den Keime herum bildet. Diese Methode versagt aber im weiteren Verlauf der Entwicklung. Keime, deren Vitellinhüllen in dieser Weise abgelöst werden, entwickeln sich nicht regulär; sie zerfallen in Einzelblastomeren. Denn der Zusammenhalt der Blastomeren wird anfangs nur durch die gemeinsame Hülle gewährleistet, woraus zu schließen ist, daß noch keine festen Zell-Zell-Kontakte ausgebildet sind. Untersuchungen zur Zellgenealogie setzen aber voraus, daß alle Blastomeren beliebiger Entwicklungszustände zu jedem Zeitpunkt mit einer Tracersubstanz injiziert werden können und die Furchungszellen anschließend über viele Teilungen hinweg in ihrer normalen Lagebeziehung zueinander bleiben.

Ein Gemisch aus Trypsin und Dithiothreitol (DTT) bzw. dem stereoisomeren Dithioerythritol (DTE) kann die Vitellinhüllen von *Platynereis* andauern und letztendlich auch ganz auflösen. Um zu überprüfen welche strukturellen Veränderungen diese Substanzen in der Vitellinhülle hervorrufen, wurden behandelte Vierzellstadien elektronenmikroskopisch untersucht. Anders als beim späteren Einsatz für die Cell-lineage-Studie wurden dabei geringere Konzentrationen und unterschiedliche Verhältnisse beider Substanzen zueinander verwendet. Das Ergebnis – eine schließlich vollständige Ablösung der Vitellinhüllen – war jedoch identisch und kam lediglich nach einer längeren Inkubationsdauer zustande. Für

die Cell-lineage-Studie erwies sich jedoch eine raschere Prozedur mit höher konzentrierten Reagenzien als vorteilhaft.

Vitellinhülle im unbehandelten Zustand

KLUGE et al. (1995) untersuchten unbehandelte Vitellinhüllen im unbefruchteten bzw. besamten Ei von *Platynereis* elektronenmikroskopisch. Daher war es für die vorliegende Arbeit angebracht, zunächst den Nativzustand der Vitellinhülle des Vierzellstadiums feinstrukturell zu untersuchen.

Auch im Vierzellstadium zeigt die Vitellinhülle wie von KLUGE et al. beschrieben einen vierschichtigen Aufbau (Abb. 1a): an der Außenseite besteht sie aus drei sehr dünnen Schichten (L1, L2 und L3), die von außen nach innen betrachtet elektronendicht, elektronenlicht und wieder elektronendicht erscheinen. In der Tiefe folgt dann eine vierte Lage (L4), die fast die gesamte Dicke der Hülle ausmacht und radial gestreift ist. Die Gesamtdicke der Vitellinhülle liegt bei etwa 0,5 bis 0,7 μm .

Vitellinhülle nach Behandlung mit Trypsin

Nach 5 minütiger Inkubation in Trypsin (Sigma; 1 : 250; 4 mg/ml in Ca-Mg-freiem Seewasser, pH 8,0) bei Raumtemperatur wandelt sich das Erscheinungsbild der Vitellinhüllen deutlich (Abb. 1b). Während die Schichten L1 bis L3 nahezu unverändert erscheinen, hat sich die Struktur der innersten, L4, aufgelöst und der Raum den sie zuvor einnahm, wird nur noch von einer amorphen Masse ausgefüllt. Die so behandelte Hülle setzt dessen ungeachtet einem Injektionsversuch den selben Widerstand entgegen wie es auch unbehandelte Keime tun, sie läßt sich mit einer Injektionspipette nicht durchdringen, ohne den Embryo dabei zu zerquetschen.

Vitellinhülle nach Behandlung mit DTT

Nach 5 minütiger Inkubation mit DTT (Sigma; 1 mg/ml in Ca-Mg-freiem Seewasser + TRIS, pH 8,0) bei Raumtemperatur ähneln die Veränderungen denen

nach Behandlung mit Trypsin: auch hier verbleiben die äußeren drei Lagen unverändert, während die innerste Schicht keine Struktur mehr aufweist (Abb. 1c). Wieder wird dadurch die mechanische Stabilität der Hüllen gegenüber Mikroinjektionsversuchen nicht merklich verringert.

Vitellinhülle nach kombinierter Behandlung mit DTT und Trypsin

Die Keime wurden in einem Gemisch aus DTT (Sigma; 1 mg/ml in Ca-Mg-freiem Seewasser + TRIS, pH 8,0) und Trypsin (Sigma; 4 mg/ml in Ca-Mg-freiem Seewasser + TRIS, pH 8,0) für die Dauer von 6 und 9 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach 9 Minuten erwiesen sich die Hüllen bereits bei lichtoptischer Betrachtung extrem verändert, sie hatten sich stark ausgedehnt und waren stellenweise aufgebrochen bzw. hatten sich schon vollkommen vom Keim abgelöst. Solche die noch von ihrer Hülle umgeben waren verklebten miteinander bzw. mit dem Substrat und ließen sich daher für die Elektronenmikroskopie nicht weiter verwenden.

In jedem 6 Minuten lange behandelten Keim war nicht nur die innersten Lage L4 aufgelöst, sondern auch die äußeren drei Schichten zeigten Veränderungen (Abb. 1d): insbesondere löst sich L1 nach außen ab und erscheint in Fragmente zerbrochen, L2 ist jetzt nicht mehr auszumachen, während L3 unverändert kontinuierlich zu verlaufen scheint. Die Keime sind jetzt aber mechanisch stark destabilisiert, so daß das Einstechen von Mikroinjektionspipetten leicht möglich ist. Diese mechanische Schwächung ist allerdings nicht von Dauer: empirisch ergab sich, daß Keime, die zu Beginn des Vierzellstadiums behandelt worden waren und zunächst verminderte Resistenz bewiesen, nach Eintritt in das Achtzellstadium erneut sehr widerstandsfähig wurden. Die Gründe dafür sind unbekannt.

Schädigungen durch die Behandlungsmethoden

Eine prinzipielle Schwierigkeit der verwendeten Methode zur Aufweichung der Vitellinhüllen liegt in anderweitigen Veränderungen, die sich aus der Behandlung durch DTT/Trypsin ergeben: Mit zunehmender Einwirkdauer des Gemisches werden die Vitellinhüllen nicht nur destabilisiert, sie weiten sich auch aus (Fig. 3,

Seite 36). Während es dann zwar leicht fällt, die Hüllen mit der Mikroinjektionsspitze zu durchdringen, gerät andererseits die Entwicklung der Keime mit zunehmender Hüllenweitung mehr und mehr aus dem Ruder. Eine zu kurze Einwirkzeit wiederum erfordert einen verstärkten Druck der Mikropipette auf den Keim um die Hülle zu durchdringen und birgt die Gefahr, einzelne Blastomeren durch die mechanische Belastung zu zerstören.

Praktisch war es also nötig, den richtigen Kompromiß bei der Inkubationsdauer im DTT/Trypsin-Gemisch zu finden. Im Ergebnis zeigte sich, daß die Methode eine vollkommene Normalentwicklung in seltenen Fällen zuließ, es kam meistens zu mehr oder minder starken Abweichungen davon. Dies soll jedoch in keiner Weise bedeuten, daß die erzielten Resultate wertlos wären. Denn es zeigte sich, daß Injektionen in bestimmte Blastomeren zu sehr ähnlichen (wenngleich auch nicht immer vollständig identischen) Markierungsmustern im dreisegmentigen Jungwurm führten. Selbst wenn von einem Typ der Blastomerenmarkierung nur ein einziges Exemplar zum Wurm heranreifte, ließ sich dessen Markierungsmuster doch noch mit dem von Markierungen früherer Blastomeren derselben Entwicklungslinie vergleichen. So reifte z.B. nur ein Exemplar heran bei dem die A-Blastomere des Vierzellstadiums markiert worden war. Das Ergebnis zeigt aber viele Übereinstimmungen mit den Mustern nach der Markierung der AB-Blastomere des Zweizellstadiums, die ja ebenfalls alle Strukturen beinhalten sollte, die sich von A ableiten.

Zur den Schwierigkeiten die sich aus dem Grad der Ausweitung der Hüllen ergaben, kamen mechanische Probleme im Zusammenhang mit der Entwicklung der Keime hinzu. So verformten die schlagenden Cilien der Prototrochzellen wegen ihrer geschwächten Verankerung in der Vitellinhülle die Larven ganz offensichtlich. Im vorliegenden Untersuchungsmaterial erkennt man daher häufig, daß Cilienzellen aus ihrem Verband ausgetreten sind und eine „ektopische“ Lage eingenommen haben. Die mechanische Belastung durch den Cilienschlag zerstörte auch immer wieder ganze Keime im Verlaufe ihrer Entwicklung vollkommen.

Zu den genannten Problemen gesellt sich die kurze Zellzyklusdauer der ersten Teilungsrunden von *Platynereis* von etwa 35 Minuten, was den Zeitraum für Injektionen stark beschränkt. Dazu kommt, daß die Membranen der Blastomeren etwa 10 Minuten vor einer anstehenden Cytokinese instabil werden und die Zellen in der Regel beim Einstechen der Pipette lysieren, wodurch das Zeitfenster für Injektionen weiter eingeschränkt wird. Zwar konnte jedes Gelege in unterschiedliche Chargen aufgeteilt werden, die bei unterschiedlichen, tieferen Temperaturen gehältert wurden. Dadurch kann man das Entwicklungstempo innerhalb eines Geleges variieren und staffeln, wodurch das Zeitintervall, das für Injektionen in Frage kommt, verlängert wird. Das Entwicklungstempo konnte aber nicht beliebig in die Länge gestreckt werden, da es unterhalb einer Temperatur von etwa 15°C zu Fehlentwicklungen kommt.

Ursprünglich war beabsichtigt, die Markierungsmuster 24 Stunden alter Trochophorae nach der Injektion früher Blastomeren zu untersuchen. Mehrere Gründe sprachen schließlich dafür, statt dessen drei- bzw. viertägige, dreisegmentige Jungwürmer zu verwenden:

Fehlentwicklungen waren bei den behandelten Trochophorae nur schwierig zu erfassen. Grundsätzlich bereitet ein kugelförmiger Keim aus vielen Zellen und mit starken inneren Brechungsunterschieden Schwierigkeiten bei der räumlichen Analyse. Der Keim von *Platynereis* ist mit einem Durchmesser von etwa 160 µm hierfür schon relativ groß. Die an für sich nahe liegende Methode, die Trochophorae durch Rollen über den Objektträger von verschiedenen Seiten aus zu analysieren schied aus, da sich die Destabilisierung der Vitellinhüllen im embryonalen Stadium auch auf die Larven auswirkt. Jede Form der Manipulation barg somit die Gefahr, die fixierten Organismen zu zerstören. Deswegen brachte auch die Untersuchung mit dem konfokalen Rasterlichtmikroskop keine Vorteile, da dieses nicht tiefer als etwa 100 µm in das Gewebe einzudringen vermag und eine Reorientierung der Keime deswegen in den meisten Fällen zwingend gewesen wäre.

Dreisegmentige Würmer orientierten sich dagegen von ganz alleine mit ihrer Frontalebene parallel zum Objektträger – entweder mit der Ventral- oder Dorsal-

seite nach oben. Sie sind dem Rasterlichtmikroskop auch vollständig zugänglich, da ihre räumliche Tiefe durch die Streckung gegenüber der Trochophora deutlich verringert ist. Dazu kommt, daß sich die Qualität, i. e. der Grad der Normalität ihrer Entwicklung relativ leicht am Habitus erkennen läßt. Da den Tieren für die Entwicklung zum Jungwurm aber drei bis vier Tage Zeit gelassen wurde, gingen viele Exemplare die sich normal entwickelten verloren⁷. Denn die mechanische Stabilität auch dieser normalentwickelten Dreisegmenter ist nach wie vor reduziert, so daß diese Tiere oft geradezu aufzuplatzen scheinen, wobei große Teile der Zellmasse nach außen traten. Diese Beschädigungen wurden wahrscheinlich durch die Eigenbewegungen der Tiere nach der Herausbildung der Muskulatur begünstigt, traten aber meistens schon nach Beginn der Längsstreckung auf.

Es entspricht guter wissenschaftlicher Praxis, nicht nur Auskunft über erfolgreich verlaufene Experimente zu geben sondern auch negative Resultate nicht zu verschweigen. Im Falle der hier präsentierten Injektionsexperimente war es allerdings nicht möglich, eine eindeutige Grenzlinie zwischen „gelungenen“ und „mißlungenen“ Experimenten zu ziehen. Eine Quantifizierung von Mißerfolgen hätte zu viele, nicht scharf voneinander abgrenzbare Kriterien erforderlich gemacht. Daher muß die Feststellung genügen, daß das Material welches schließlich für die Auswertung herangezogen wurde das Resultat unzähliger Injektionsversuche darstellt. Die „Erfolgsquote“ lag deutlich unter 5 %.

⁷ Ideal wäre es natürlich gewesen, Tiere stets gleichen Alters zu untersuchen – aus arbeitsorganisatorischen Gründen war dies jedoch nicht möglich.

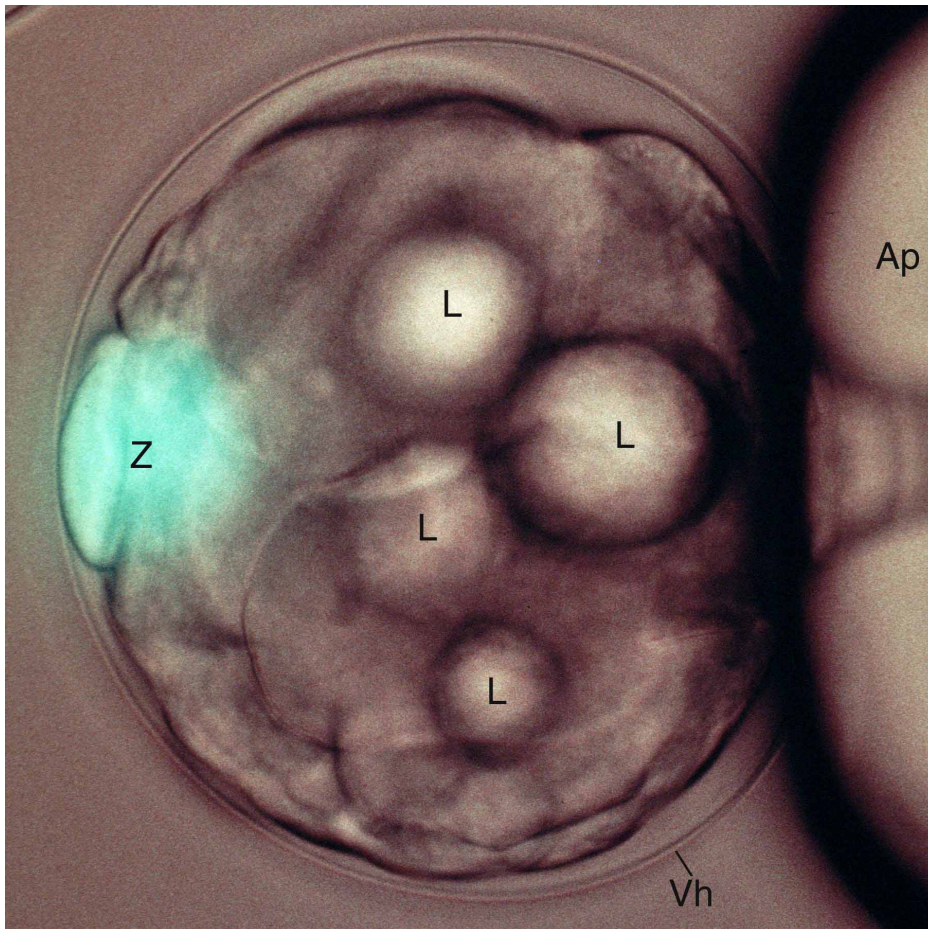


Fig. 3: Dokumentation einer gerade abgeschlossenen Injektion in eine Blastomere. Rechts im Bild die Ansaugpipette (Ap), mit der der Keim in Position gehalten wird. Links hebt sich die markierte Zelle (Z) hell ab. Der abgebildete Keim wurde übermäßig lange mit DTE/Trypsin behandelt, was daran erkenntlich ist, daß die Vitellinhülle (Vh) weit von der Oberfläche abgehoben ist. Embryonen mit derart ausgeweiteter Vitellinhülle entwickelten sich in der Regel nicht zu vitalen Tieren. L = Lipidtröpfchen, umgeben von dichtem Dotter.

3.2. Anmerkungen zu den Bildtafeln

Alle dreisegmentigen Würmer wurden mit dem konfokalen Rasterlichtmikroskop in der Lage aufgenommen, in der sie auf den Objektträger übergeführt worden waren, zumeist mit der Dorsalseite nach oben, da wie schon erwähnt, eine Orientierung beim Einbetten immer mit der Gefahr verbunden war, die Objekte zu beschädigen. Die Präsentation auf den Bildtafeln erfolgt aber unabhängig von der Lage der Objekte auf dem Objektträger. Da sich Bildstapel ohne weiteres in ihrer Abfolge umkehren und spiegeln lassen, konnten die Ansichten natürlich problemlos invertiert werden. In der Regel werden die Tiere in normalisierter Dorsalansicht gezeigt. Nur wo es zur Darstellung dreidimensionaler Strukturen notwendig war, wurden manche Darstellungen ventralisiert.

3.3. Injektionsexperimente

Eine Übersicht über alle ausreichend gut gelungenen Typen von Injektions-
experimenten gibt Fig. 4:

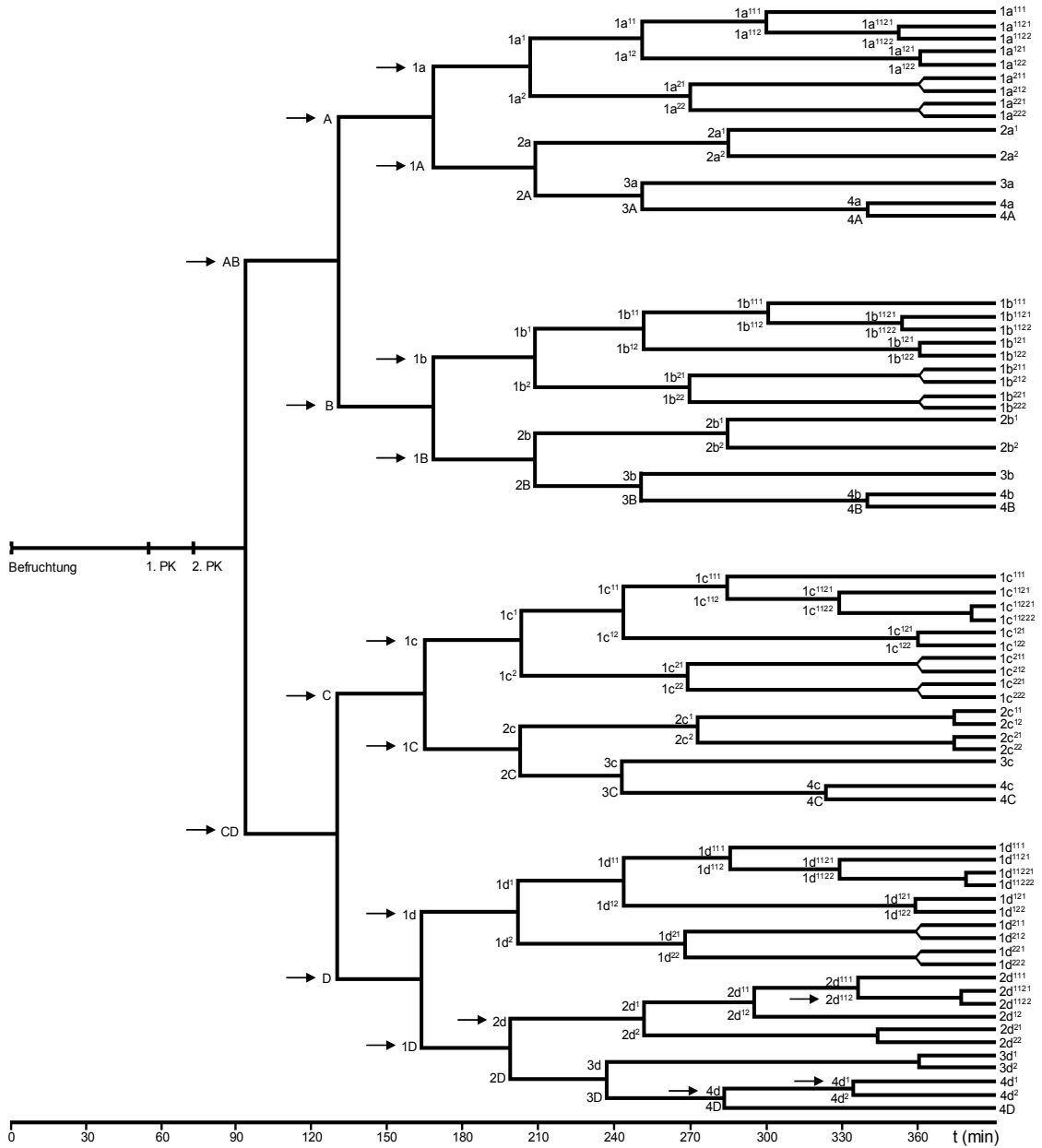


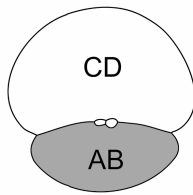
Fig. 4: Zellstammbaum von *Platynereis dumerilii* bis zum 66-Zellstadium (verändert nach DORRESTEIJN 1990a). Die Verzweigungspunkte geben den Zeitpunkt der Aufspaltung der Blastomeren in Tochterblastomeren ab der Besamung (x-Achse) wieder und zwar bei einer Temperatur von 18°C. Alle Blastomeren, die für diese Arbeit markiert wurden, sind mit einem Pfeil gekennzeichnet.

Die stark ausgedehnten Muster des Zweizellstadiums erleichtern es, mit dem Aufbau des Tieres vertraut zu werden. Insbesondere erkennt man, daß die

Markierungen nach AB- und CD-Injektion sich zu einem „Gesamtwurm“ kompletieren. Daher erfolgt die Betrachtung dieser beiden Blastomeren zu Beginn.

In der Folge schreitet die Präsentation der Injektionsergebnisse quadrantenweise voran (A, B, C und D), wobei von jedem Quadranten die Ergebnisse nach Injektion des Vier- und Achtzellstadiums vorgestellt werden und für den D-Quadranten auch noch diejenigen späterer Stadien.

AB-Blastomere



Die AB-Blastomere trägt zum Gesamtvolumen des Keimes von *Platynereis* nur 27 % bei (DORRESTEIJN 1990a). Demgemäß sind auch nur geringe Teile des dreisegmentigen Wurmes markiert. Lediglich ein einziger Keim, bei dem im Zweizellstadium die AB-Blastomere injiziert wurde, entwickelte sich zu einem dreisegmentigen Wurm weiter. Dieses vier Tage alte Tier zeigte dabei folgendes Markierungsmuster:

Im Rumpf verläuft von anterior ventral nach posterior dorsal eine schlanke Struktur, die sich nach Lage und Form eindeutig als linke Hälfte des Stomodaems identifizieren läßt (Abb. 2a, b, d). Weitere Markierungen im Rumpf betreffen nur noch die Entodermmasse der terminalen⁸ Makromeren und die parapodialen Drüsen, welche allerdings auch starke Autofluoreszenz aufweisen.

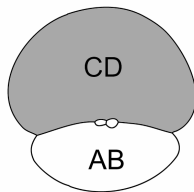
Im Kopfbereich ist eine um die Medianebene gelegene schmale, vertikal verlaufende Zentralstruktur markiert (Abb. 2a bis d). Von der ventralen Basis dieser Struktur aus verläuft nun beiderseits nach dorsal und auch etwas nach anterior gerichtet ein Band von Markierungen (Abb. 2a) das etwa in der mittleren Frontalebene endet. In diesem Bereich befinden sich auch cilienbesetzte Zellen des Prototrochs.

Das Markierungsmuster im Kopf dieses Wurmes macht einen relativ zerklüfteten Eindruck. Ein möglicher Grund dafür könnten die noch vorhandenen larvalen Drüsenzellen sein, deren Inhalt beim Fixiervorgang leicht aufquillt, was dann zur Verzerrung innerer Strukturen führt. Außerdem liegt dem Kopf ein Zellklumpen außen an, der möglicherweise aus der rechten Kopfhälfte ausgetreten ist, was die strukturelle Asymmetrie beider Seiten erklären würde.

⁸ Darunter verstehe ich hier und im Folgenden jede Makromere nach Abschnürung des vierten Mikromerenquartetts, i. e. 4A, 4B, 4C oder 4D.

Weiter dorsal befindet sich im Inneren des Kopfes eine transversal verlaufende dünne Struktur, die lateral nach anterior umbiegt und sich von dort bis nahe an die Oberfläche fortsetzt (Abb. 2d). Dabei könnte es sich um Muskelfasern handeln, die bei Tieren nach F-Actinmarkierung durch Phalloidin-Texas Red in etwa denselben Verlauf nehmen (Abb. 4e oben).

CD-Blastomere



Wie auch im Fall der AB-Zelle, enthielt mein Material nur eine erfolgreiche Markierung einer CD-Blastomere.

Aufgrund des weit größeren Volumenanteils der CD-Blastomere am Zweizellstadium (73 % des Gesamtvolumens) war zu erwarten, daß aus Injektionen in CD ein weit ausgedehnteres Markierungsmuster resultiert. Von außen betrachtet umfaßt dies in der Tat fast das gesamte Tier, weil beinahe die gesamte Körperoberfläche - das Rumpfektoderm sowie der größte Teile des Kopfektoderms - den Tracer enthält (Abb. 3a). Im Rumpf tritt das Ektoderm mit der Epidermis, den Borstensäcken, den parapodialen Drüsen (die allerdings auch stark autofluoreszieren) sowie dem Bauchmark, das sich zweisträngig abzeichnet, hervor (Abb. 3c). Die Markierung endet posterior mit dem Pygidium und den beiden auswachsenden Uriten (Abb. 3d). Anterior geht sie fließend in die Markierung des Kopfes über, wobei auch die Peristomialzirren erkennbar sind (Abb. 3c). Im Innersten des Wurmes, im Bereich der terminalen Makromeren, finden sich ebenfalls ausgedehnte Markierungen die von den Makromeren der C- und D-Zelllinie abstammen müssen, folglich das Entoderm bilden (Abb. 3d). Die Markierung zwischen diesem Keimblatt und dem außen liegenden Ektoderm ist lückenlos, so daß sich ebenfalls alle mesoderma- len Strukturen auf die CD-Blastomere zurückführen lassen.

Ein Blick ins Innere des Wurmleibes enthüllt auch Bereiche, die von einer Markierung ausgenommen sind. Dabei handelt es sich zum einen um einen kleineren, dorsal auf Höhe des Stomodaeums gelegenen Bereich, bei dem es sich um den Raum handeln muß, den die terminalen Makromeren der A- und B-Zelllinie einnehmen (Abb. 3d). Zwei weitere, räumlich deutlich ausgedehntere Markierungslücken im posterioren Entoderm, werden von den nicht farbstoff- füllten Lipidtropfen der Makromeren der C- und D-Zelllinie verursacht (Abb. 3d). Schließlich zeichnet sich posterior des Kopfes, rechts der Medianebene, die

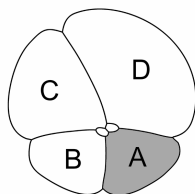
rechte Hälfte des Stomodaeums ab, die linke Hälfte tritt hingegen nicht in Erscheinung, wohl aber eine das gesamte Stomodaeum umringende Zellhülle (Abb. 3c). Diese Struktur ist auf Markierungen von 1D deutlicher zu erkennen (Abb. 14d).

Auch der Kopf, die ehemalige Episphäre der Trochophora, tritt weiträumig markiert in Erscheinung. Praktisch die gesamte Epidermis sowie das Gehirn sind sichtbar. Umgekehrt fehlt die nach AB-Injektion auftretende Zentralmarkierung: dieser schmale Bereich um die mittlere Sagittalebene bleibt nach CD-Markierung ausgespart, er ist ventral deutlich ausgeprägter als dorsal (Abb. 3b und c). Das zentral im Kopf gelegene Neuropilem, anterior vom Stomodaeum gelegen, tritt geschlossen in Erscheinung (Abb. 3c).

Auf der Dorsalseite des Kopfes verläuft transversal, etwa durch die Mitte des Kopfes, ein Halbring hell markierter Zellen, bei denen es sich vermutlich um die cilientragenden Zellen des Prototrochs handelt (Abb. 3d).

Zusammenfassend zeigt sich, daß sich das Markierungsmuster aus der Injektion in CD komplementär zu dem nach Injektion in AB verhält.

A-Blastomere



Die A-Blastomere des Vierzellstadiums von *Platynereis* trägt zum Gesamtvolumen des Keimes lediglich 13 % bei (DORRESTEIJN 1990a). Folglich sollten Farbstoffmarkierungen dieser Zelle zu entsprechend geringvolumigen Markierungen im Jungwurm führen.

Injektionen in die A-Blastomere erwiesen sich als ungewöhnlich schwierig, besonders viele Exemplare lysierten sofort. Nur ein einziges Exemplar wuchs schließlich zu einem nicht vollkommen normal ausgebildeten dreisegmentigen Wurm heran. Zusammen mit dem Markierungsmuster nach Injektion der AB- bzw. 1A-Blastomere, ergibt sich aber ein gleichsinniges Bild: bestimmte Strukturen sind gleichermaßen markiert bzw. von einer Markierung ausgenommen.

Im Rumpf treten nur zwei Bereiche hervor. Zum einen ist das ein recht voluminöser Teil, der sich zweifellos als Dotter- und Cytoplasmamasse der terminalen Makromere der A-Zelllinie identifizieren läßt (Abb. 4a bis d). Die Farbstoffvertei-

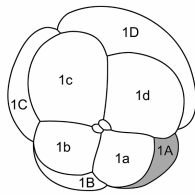
lung ist hier inhomogen, vermutlich handelt es sich bei den intensiver gefärbten Bereichen um cytoplasmatische Säume, die größere Konzentrationen des Tracers enthalten. Die restlichen Bereiche werden vom geringer markierten Dotter eingenommen, der tropfenförmige Lipidanteil hat keinen Farbstoff angenommen.

Weiter anterior, am Übergang zum Kopf, tritt eine zweite Struktur in Erscheinung, bei der es sich eindeutig um den linken Teil des Stomodaeums handelt (Abb. 4a und c). Der Wurm erweckt auf DIK-Aufnahmen den Anschein, daß im Stomodaeum zwei Mundspalte ausgebildet sind, die aber von einer gemeinsamen einschichtigen Lage aus Zellen eingefasst werden. Auch wenn also die Entwicklung des Stomodaeums gestört verlief, so ist doch klar ein diskreter linksseitiger Teil dieser Struktur angefärbt.

Anterior im Kopf des dreisegmentigen Jungwurmes ist ein Bereich um die Medianebene herum markiert (Abb. 4a bis c). Von einer relativ breiten und weit nach posterior verlaufenden ventralen Basis ausgehend, verjüngt sich diese Struktur nach dorsal und endet etwas oberhalb der mittleren Frontalebene. Von der ventralen Basis dieses markierten Zentralbereichs aus zieht an der Oberfläche nach dorsal wie nach posterior ein Band, das ausgeprägte Fluoreszenz aufweist und mit der Lage großer cilientragender Zellen harmoniert (Abb. 4a und b). Mit einer kurzen Unterbrechung setzt sich diese Markierung dann fort, um ihren weiteren Verlauf transversal zur Medianebene hin zu ändern, bis sie dorsal über der linken Hälfte des Stomodaeums endet (Abb. 4a und b).

Sehr deutlich, vor allem auf Einzelschnittbildern, fällt eine transversal verlaufende Struktur im Inneren des Kopfes auf, die etwa dem Verlauf des Neuropilems folgt, von der aber keine axonalen Projektionen ausgehen. An ihren beiden seitlichen Enden zweigen statt dessen Ausläufer nach anterior wie posterior ab (Abb. 4c). Weiter dorsal und ein Stück weiter posterior erkennt man eine ähnlich, in der Projektion aber nicht deckungsgleich verlaufende Struktur. Sie besteht aus vielen punktförmigen Markierungen, vermutlich einzelnen Zellen (Abb. 4d). Auch diese Struktur entsendet lateral Ausläufer nach anterior wie posterior. Zwischen diesen beiden transversalen Strukturen gibt es keinen erkennbaren Übergang. Beide decken sich etwa mit Strukturen im Kopf, die nach Anfärbung des F-Actingerüsts sichtbar werden und ebenfalls zwei parasagittal nach anterior und posterior verlaufende Ausläufer besitzen (Abb. 4e).

1A-Blastomere



Die A-Blastomere teilt sich beim Übergang zum Achtzellstadium in die animale 1a-Mikromere und die vegetale 1A-Makromere. Das Schicksal der Abkömmlinge von 1A muß also gegenüber A um die Anteile von 1a eingeschränkt sein, die ihren eigenen Werdegang verfolgen. Aus 1A gehen sämtliche weiteren Mikromeren des A-Quadranten hervor, i. e. 2a, 3a und 4a sowie die terminale Makromere der A-Zelllinie. 1A trägt 8,6 % zum Gesamtvolumen des Keimes bei, wobei nur 1,6 % auf das klare Cytoplasma und 7 % auf den Dotter, jeweils vom Gesamtvolumen des Keimes, entfallen; der Dotter wird hauptsächlich in die terminale Makromere und damit in den Entodermanteil dieser Zelllinie gelenkt (DORRESTEIJN 1990a). Folglich kann damit gerechnet werden, daß nur geringvolumige Nicht-Entodermanteile aus 1A hervorgehen.

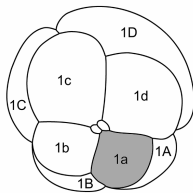
Von 1A-markierten Keimen reiften zwei Exemplare zum dreisegmentigen Wurm heran, in beiden Fällen verlief die Entwicklung aber unübersehbar gestört. Wie schon erwähnt, mag das die Interpretation des Materials einschränken, offenkundig kongruieren die Muster aber mit denen des in der genealogischen Reihe vorangegangenen Materials, nämlich von A und AB.

Im Rumpf tritt die terminale Makromere der A-Zelllinie als einzige markierte Struktur in Erscheinung. Im Übergangsbereich zum Kopf hebt sich der linke Teil des Stomodaeums ab (Abb. 5a bis c).

Im Kopf sieht man auf beiden untersuchten Exemplaren bei nur geringen Unterschieden einige der Strukturen, die auch nach der Markierung von A zu finden sind. Zum einen ist dies ein schmaler epidermaler Bereich an der äußersten linken Flanke des Kopfes, der von ventral nach dorsal hochzieht, um dann nach transversal umzulenken, bis er nach kurzem Verlauf endet (Abb. 5b). Zum anderen handelt es sich um eine innere Struktur direkt anterior des Stomodaeums, die transversal verläuft und dann an beiden Enden nach anterior umbiegt wobei sie sich in jeweils zwei Äste aufzweigt (Abb. 5c, a, b). Auch die nach A-Markierung noch sehr prominente Zentralstruktur im medianen anterioren Kopfbereich ist im 1A-Muster enthalten, ihre Ausdehnung ist nur deutlich geringer (Abb. 5a bis c) und sie reicht von der inneren transversal verlaufenden Struktur unter steter Verbreiterung bis knapp unterhalb der anterioren Kopfepidermis.

Im Gegensatz zur A-Markierung fehlen bei 1A lediglich alle links-ventralen epidermalen Bereiche sowie (s. o.) einen Großteil des median-anterioren Musters.

1a-Mikromere



Eine Markierung der ersten Mikromere des A-Quadranten im Achtzellstadium sollte zusammen mit einer Markierung der Makromere 1A desselben Stadiums all jene Strukturen färben, die auch nach Injektion der Vorgängerzelle, der A-Blastomere im Vierzellstadium, hervortreten. Die Mikromere 1a trägt zum Gesamtvolumen des Keims lediglich 3,4 % bei (DORRESTEIJN 1990a). Insgesamt wuchsen drei der in 1a-injizierten Embryonen zu normalgestalteten dreisegmentigen Würmern heran.

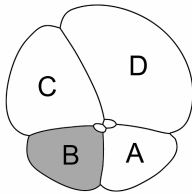
Im Rumpf erkennt man, außer den autofluoreszierenden parapodialen Strukturen auch Fasern des Bauchmarks, die allerdings nur bei starker Kontrastanhebung sichtbar werden. Sie treten beiderseits des Stomodaeums ins Neuropilem des Kopfes über (Abb. 6d).

Im Kopf sind hauptsächlich Bereiche links der Medianebene markiert. Neben der Epidermis des linken ventralen Kopfsektors betrifft dies einen schmalen Zentralteil, der um die Medianebene herum angeordnet ist (Abb. 6a und b), er durchspannt den Kopf von ventral bis dorsal. Von der anterior-dorsalen Basis dieses durchgängig markierten Zentralbereichs aus ziehen große Zellen oberflächlich nach dorsal und gleichzeitig nach posterior (Abb. 6b). Hierbei dürfte es sich um großvolumige cilienbesetzte Zellen handeln, die einen Teil des Prototrochs bilden.

Zwischen dem Zentralbereich und den Prototrochzellen befindet sich noch weiteres Material, dessen Natur zunächst nicht eindeutig erscheint. In zwei Exemplaren erkennt man in diesem Winkel zwei diskrete Zellen die eine hohe Fluorochromkonzentration aufweisen (Abb. 6c). Nun zeigt ein Wurm aus den Farbmarkierungen der Mikromere 1b anterior rechts ventral im Kopf drei globuläre, markierte Strukturen, die sich klar als larvale Drüsenzellen des Kopfes identifizieren lassen (Abb. 9d, s. u.; sie sind auch auf DIK-Aufnahmen leicht erkennbar). Linkerhand heben sich ebenda gegen die Hintergrundfluoreszenz zwei kugelförmige Bereiche markierungslos ab, bei denen es sich um die restlichen beiden der insgesamt fünf larvalen Drüsenzellen handelt. Daher ist anzunehmen, daß die nach 1a-Injektion markierten Strukturen am selben Ort die beiden von 1a

abgeleiteten larvalen Drüsenzellen sind. Da der Inhalt dieser Drüsenzellen beim Fixieren leicht quillt, kann angenommen werden, daß zumindest ein Teil des markierten Materials zwischen Zentralmarkierung und Cilienzellen von gequollenem Drüsenmaterial herrührt.

B-Blastomere



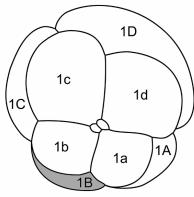
Das Volumen der Blastomere B des Vierzellstadiums liegt mit 14 % am Gesamtvolumen (DORRESTEIJN 1990a) minimal über dem der Blastomere A, sie ist damit die zweitkleinste Zelle des Vierzellstadiums. Insgesamt gelangen drei Injektionen in die B-Blastomere, aus denen sich dreisegmentige Jungwürmer entwickelten.

Im Bereich des Rumpfes B-markierter Keime erkennt man die terminale Makromere der B-Zellinie (Abb. 7a und b). Die Fluoreszenz weiterer Strukturen des Rumpfes läßt sich nicht eindeutig auf die Anwesenheit des Fluoreszenzfarbstoffes zurückführen und ist wohl ausschließlich durch Autofluoreszenz bedingt.

Eine Besonderheit, die aber nur eines der untersuchte Tiere aufweist, sind zwei schmale markierte Bereiche an der Berührungsfläche der beiden Halbtelle des (nicht markierten) Stomodaeums die von den beiden autofluoreszierenden Kieferanlagen eingerahmt werden (Abb. 7c).

Im Kopf sind wenige Strukturen fluoreszenzmarkiert. Anterior um die Medianebene herum ist ein schmaler Bereich gefärbt, der sich von ventral nach dorsal erstreckt, wobei er dorsal breiter ist (Abb. 7a bis c). Von der ventralen Basis dieser Zentralstruktur aus verläuft nach dorsal und rechts bis zur Frontalebene ein Band von zerklüfteten Markierungen. Im selben Bereich zeigen DIK-Aufnahmen cilientragende Zellen des Prototrochs. Daß sich diese bewimperten Zellen im Gegensatz zu denen in der Nachkommenschaft von Blastomere A lückenhaft und sehr schwach abzeichnen, erklärt sich bei allen drei B-Markierungen dadurch, daß die Menge injizierten Farbstoffs gering war. Das dürfte auch der Grund dafür sein, daß weitere Strukturen des Kopfes, die sich nach Markierung von 1B klar zeigen hier nicht, oder aber sehr undeutlich zu erkennen sind. Auf diese Markierungen wird in der Besprechung der Markierungsdomänen von 1B eingegangen.

1B-Makromere



Beim Übergang zum Achtzellstadium spaltet sich die B-Blastomere in die animale 1b-Mikromere und die vegetale 1B-Makromere auf, aus der sich in den folgenden Teilungszyklen die Mikromeren 2b, 3b und 4b abschnüren werden.

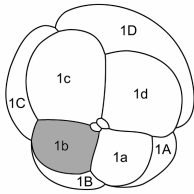
Von drei Tieren die die Entwicklung zum dreisegmentigen Wurm erfolgreich durchliefen, schied ein Exemplar für die Auswertung aus, da hier zwar ein Kopf mit umhüllender Epidermis ausgebildet wurde aber das Gehirn offensichtlich nicht oder nur rudimentär. Die beiden verbleibenden Würmer zeigen leichte Unterschiede im Markierungsmuster.

Im Rumpf zeichnet sich die markierte Masse der terminalen B-Makromere ab (Abb. 8a bis e).

Im Inneren des Kopfes befindet sich weit dorsal, etwa im anterioren Anschluß an das Stomodaeum eine transversal verlaufende Struktur, die lateral nach anterior umbiegt. Die beiden nach vorne ragenden Äste berühren die epidermale Oberfläche aber nicht (Abb. 8a bis e). Aus der Mitte der transversalen Struktur ragt direkt nach anterior noch ein weiterer, sehr dünner Fortsatz (Abb. 8d und e). Markierungen des F-Actingerüsts dreisegmentiger Würmer legen nahe, daß es sich bei diesen inneren Strukturen um Muskulatur handelt (Abb. 4e). Die transversal verlaufende Struktur setzt sich nach anterior steil abfallend bis zur ventralen Oberfläche fort, um von dort aus der Oberfläche entlang, beide Flanken des Kopfes umgreifend, wieder ein ganzes Stück nach dorsal aufzusteigen (Abb. 8a bis c). In einem anderen, älteren Exemplar konnte diese nach dorsal umgreifende oberflächliche Markierung nicht gefunden werden (Abb. 8e). Andererseits zeigten auch zwei dreisegmentige Tiere bei denen die B-Blastomere injiziert worden war bilateralsymmetrische Markierungen, einmal nur an den Kopfseiten bei einem viertägigen Tier (Abb. 7c, B-Markierung), und von ventral bis an die Kopfseiten reichend, bei einem dreitägigen Tier. Dieses Muster könnte also durchaus der Normalentwicklung entsprechen und bei dreitägigen Tieren ausgeprägter sein als bei viertägigen. Denn der Körperbau des dreisegmentigen Wurmes erfährt zwischen beiden Entwicklungsstufen recht große Veränderungen (vergl. Abb. 18b und c). Wenngleich in diesem Punkt also gewisse Unterschiede gefunden werden konnten, so läßt sich doch feststellen, daß es in

jedem Fall zur Ausbildung eines bilateralsymmetrischen Musters kommt, das Strukturen im Inneren des Kopfes wie auch der epidermalen Oberfläche umfaßt.

1b-Mikromere



Mit einem Volumen von 3,3 % am Gesamtvolumen des Achtzellstadiums ist die Mikromere 1b die kleinste aller Blastomeren dieser Entwicklungsstufe, dicht gefolgt von 1a (3,4 %; DORRESTEIJN 1990a). Wie auch für 1a kann also erwartet werden, daß nach der Markierung von 1b nur wenige Strukturen im dreisegmentigen Wurm markiert sind.

Von vier erfolgreichen Injektionen, die zu dreisegmentigen Würmern führten, waren die Markierungsverhältnisse in einem Fall so verwirrend, daß eine Auswertung nicht möglich war – leider ein Hinweis darauf, daß auch schwerere Entwicklungsstörungen nicht durch den vorzeitigen Tod der Tiere eliminiert werden. Die weiteren drei Exemplare zeigen dessen ungeachtet sehr ähnliche Markierungsmuster, die sich allerdings durch eine etwas variable räumliche Anordnung unterscheiden. Wie bereits erwähnt, weichen gerade die cilientragenden Zellen bei Tieren mit destabilisierter Vitellinhülle leicht von ihrer regulären Lage ab. Da diese Zellen sehr groß sind, verändert sich das Erscheinungsbild der Markierungsmuster dadurch deutlich.

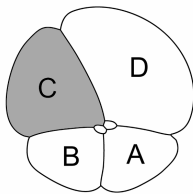
Im Rumpf treten fast nur Strukturen in Erscheinung, die durch Autofluoreszenz hervorgerufen werden. Einzig Fasern des Bauchmarks heben sich bei hoher Kontrastverstärkung schwach ab. Sie gehen anterior in den Kopf über (Abb. 9c).

Im Kopf ist ebenso wie nach Markierung von 1a ein Zentralbereich um die Medianebene herum gefärbt. Dieses Muster ist ventral breiter als dorsal. Von der ventralen Basis dieser Zentralstruktur aus zieht nun ein Band von markierten Zellen nach rechts bis etwa zur mittleren Frontalebene hoch. Es harmoniert in seiner Lage mit derjenigen cilientragender Zellen des Prototrochs (Abb. 9a, b, d). Die Anzahl der Zellen läßt sich leider nicht eindeutig ermitteln, da die cilientragenden Zellen DTE/Trypsinbehandelter Keime ihre geordnete Form verlieren und sich dann nicht mehr eindeutig voneinander abgrenzen lassen.

Anterior und ein wenig weiter dorsal von dieser Zellreihe gelegen, treten drei großvolumige, blasenartige Strukturen in Erscheinung, die sich mit den Drüsen-

zellen des Kopfes zur Deckung bringen lassen (Abb. 9d). „Blasenartig“ vom optischen Eindruck her, da lediglich ein äußerer dünner Saum den Farbstoff trägt und ein farbstoffreies Lumen umgibt. Im Tier der Abb. 9d liegt eine dieser „Blasen“ in der Medianebene relativ weit dorsal, während die anderen beiden weiter ventral und weiter rechts davon zu finden sind. Es ist bekannt, daß *Platynereis* fünf juvenile Drüsenzellen im Kopf besitzt. Interessanterweise lassen sich bei starker Kontrastanhebung auf derselben Höhe die Silhouetten zweier ähnlicher Strukturen gegen die schwache Hintergrundfluoreszenz erkennen. Dabei handelt es sich eindeutig um die beiden restlichen Drüsenzellen, zu deren Bildung 1b offensichtlich nicht beiträgt.

C-Blastomere

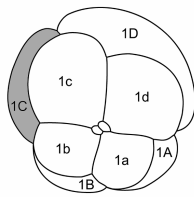


Die C-Blastomere besitzt nach den Untersuchungen von DORRESTEIJN (1990a) mit 22 % am Gesamtvolumen des Embryos das zweitgrößte Volumen unter den Zellen des Vierzellstadiums. Auch hier gelang nur ein einziger Markierungsversuch und führte zu einem recht gut entwickelten Jungwurm.

Im Rumpf hebt sich ein Dotterbereich auf der rechten Seite im dorsal gelegenen Abschnitt des Körpers ab, dabei handelt es sich um die terminale C-Makromere (Abb. 10a bis c). Ansonsten findet sich im Rumpf des Wurmes nur noch eine weitere, eindeutig auf Farbstofffluoreszenz rückführbare Struktur, die rechte Hälfte des Stomodaeums nämlich. Sie erstreckt sich dorsal vom markierten Makromerenbereich aus nach ventral, wo sie in den Kopfbereich hinein verläuft (Abb. 10a bis b).

Kopfstrukturen sind aufgrund der geringen injizierten Farbstoffmenge wenig differenziert wiedergegeben. Trotzdem zeigt sich klar, daß Abkömmlinge der Blastomere C die rechte Partie des Kopfes bilden und zwar in einem Bereich, der sich von dorsal weit nach ventral erstreckt und Gehirn wie Epidermis umfaßt. Dorsal reicht die Markierung dabei weiter nach posterior als ventral. Anterior-medial findet sich eine schmale Markierungslücke (Abb. 10a und b). Von der Markierung eingeschlossen ist auch derjenige Bereich, in dem sich im viertägigen Jungwurm bewimperte Zellen des Prototrochs befinden.

1C-Makromere

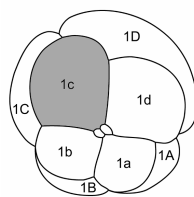


Einen Teilungszyklus weiter hat sich die Blastomere C in die animal gelegene Mikromere 1c sowie die vegetale Makromere 1C geteilt. Es gelangen zwei Injektionen in die 1C-Makromere von Keimen, die sich zu dreisegmentigen Würmern weiterentwickelten. Das Schicksal der Nachkommen von 1C ist hier dokumentiert.

Im Rumpf hebt sich durch ausgeprägte Fluoreszenz die terminale Makromere der C-Zelllinie ab. Anterior, im Übergangsbereich zum Kopf, tritt scharf die rechte Hälfte des Stomodaeums in Erscheinung (Abb. 11a und c). Das Stomodaeum wird von einer einlagigen Zellhülle umsäumt, die ebenfalls nur in der rechten Hälfte markiert ist (Abb. 11b).

Im Kopf erscheint eine deutliche Markierung nur an der Oberfläche der rechten Flanke (Abb. 11a); beim nicht präsentierten Exemplar greift diese Markierung auch nach dorsal über und reicht bis an die dorsale Mittellinie heran. DIK-Aufnahmen offenbaren in beiden Bereichen cilientragende Zellen. Möglicherweise handelt es sich also um bewimperte Zellen, die dann aber nicht dem ursprünglichen Prototroch angehören würden (dieser leiten sich vom ersten Quartett Mikromeren ab), sondern sekundär entstanden wären.

1c-Mikromere



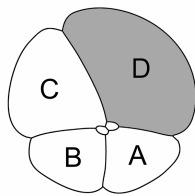
Das Abstammungsmuster der Mikromere 1c ergänzt sich mit dem der Makromere 1C zum Beitrag der Blastomere C am Achtzellstadium. 1c trägt praktisch zu keinerlei Markierung im Rumpf bei, statt dessen aber zu ausgeprägten Mustern in der rechten Kopfhälfte. Das wird dem Volumen dieser Mikromere von 5,7 % am Gesamtvolumen des Keimes gerecht, sie ist die voluminöseste der Mikromeren des 1. Quartetts (DORRESTEIJN 1990a), dicht gefolgt von 1d. Zweimal gelang es, Achtzeller nach Injektion in 1c zu Jungwürmern heranzuziehen.

Das Markierungsmuster des Kopfes beschränkt sich auf dessen rechte Seite und umfaßt das Gehirn sowie die Epidermis, wobei sich die dorsalen Abschnitte weiter nach posterior erstrecken als die ventralen (Abb. 12b). Am anterioren Ende des Kopfes reicht die Markierung aber nicht ganz an die Medianebene, hier

bleibt ein Bereich ausgespart, der dorsal schmaler ist als ventral (Abb. 12a und c).

Das Neuropilem ist rechts stark gefärbt, seine Markierung reicht über die Medianebene hinaus aber auch noch in die linke Hälfte des Kopfes hinein. Vom Neuropilem aus ziehen markierte Fasern beiderseits um das Stomodaeum herum ins Bauchmark, wo sie sich langsam verlieren, vermutlich wegen der erhöhten Lichtabsorption in tiefer gelegenen Gewebsschichten (Abb. 12c). Bis auf diese Fasern ist der Rumpf gänzlich unmarkiert.

D-Blastomere



Aus der D-Zelle des Vierzellstadiums von *Platynereis dumerilii* gehen sämtliche Mikromeren des D-Quadranten sowie letzten Endes die terminale Makromere der D-Zelllinie hervor. Eine Farbstoffinjektion in diese Blastomere führt entsprechend ihrem großen Volumen von 51 % am Gesamtkeim (DORRESTEIJN 1990a) zu umfangreichen Markierungen im dreisegmentigen Wurm, welche sowohl den Rumpf als auch den Kopf umfassen. Zwei Keime, deren D-Blastomere injiziert worden war, wuchsen zu vitalen Jungwürmern heran und konnten untersucht werden.

Der Rumpf ist fast vollständig markiert (Abb. 13a und b). Die Markierung umfaßt die Epidermis einschließlich des Pygidiums mit den Uriten und auch die anterior gelegenen Peristomialzirren (Abb. 13c und d). Auf der rechten Seite, die keine Kopfmarkierungen mit einschließt, reicht die epidermale Markierung dorsal bis zur Höhe der anterioren Basis des ersten Parapodienpaares, während die Grenze ventral weiter vorne, auf Höhe des anterioren Endes des Stomodaeums liegt. Das Stomodaeum selbst ist nicht gefärbt.

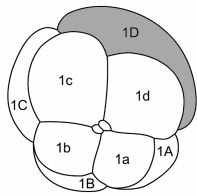
Im Inneren treten neben der erwartungsgemäß markierten terminalen D-Makromere die ektodermalen Borstensäcke deutlich in Erscheinung (Abb. 13c), und ebenso kann das Bauchmark andeutungsweise lokalisiert werden (Abb. 13d). Auch die parapodialen Drüsen sind klar fluoreszierend auszumachen. Wie schon erwähnt zeigen diese Drüsen starke Autofluoreszenz, insbesondere bei vier Tage alten Tieren. Daher läßt sich ihre klonale Abstammung mit der Methode der Fluoreszenzmarkierung nicht eindeutig bestimmen. Angemerkt sei

hier aber, daß nach Markierung von D bzw. 1D (s. u.) die Fluoreszenz dieser Drüsen besonders ausgeprägt ist.

Nennenswerte Markierungslücken im Rumpf finden sich nur im Bereich des Stomodaeums, das also offensichtlich nicht der D-Zelllinie entstammt sowie in Teilen des Entoderms, nämlich den terminalen Makromeren der A-, B- und C-Zelllinien.

Die rechte Seite des Kopfes ist ohne Befund wohingegen die linke Hälfte stark gefärbt ist und zwar in einem weiten Bereich, der von dorsal bis nach ventral reicht und sowohl das Gehirn wie die darüberliegende Epidermis umfaßt, aber nicht ganz die Medianebene erreicht (Abb. 13a und b). Cilienzellen des Prototrochs lassen sich nicht diskret erkennen, der Bereich den sie einnehmen wird jedoch von der Markierung einbezogen. Als einzige deutlich differenzierbare innere Struktur hebt sich das Neuropilem ab. Seine linke Hälfte ist intensiv und weiträumig markiert, die rechte Hälfte dagegen weniger intensiv und ausgedehnt (Abb. 13c).

1D-Makromere



Eine Farbstoffinjektion in die Blastomere 1D des Achtzellstadiums schränkt die im Wurm markierten Bereiche gegenüber dem Injektionsresultat bei der Blastomere D weiter ein, da die Mikromere 1d bereits abgeschnürt ist und der Farbstoff mithin nur noch auf die Zellen des zweiten sowie aller weiteren Mikromerenquartette dieses Quadranten aufgeteilt wird – nebst der jeweils entsprechenden Makromere und ihrer Nachkommen bis hin zur Zelle 4D. 1D besitzt am Gesamtvolumen des Keims einen Anteil von 46 %. Fünf Keime entwickelten sich nach Injektion in 1D zu Jungwürmern.

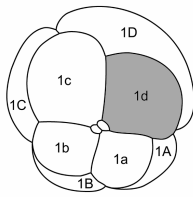
Große Partien des Rumpfes zeichnen sich deutlich ab. Das betrifft zunächst die äußere Gestalt des Tieres, hier sind alle Bereiche eingeschlossen: angefangen posterior bei den Uriten des Pygidiums bis hin zu den anterior gelegenen Peristomialzirren. Die Epidermis des Rumpfes tritt also geschlossen hervor (Abb. 14a und b). Beiderseits der ventralen Mittellinie, etwas unterhalb der Epidermis, erkennt man schwach zwei breite Bänder, deren Lage nach es sich

um das Bauchmark handelt (ohne Abbildung). Anterior enden diese Bänder etwa auf Höhe des vordersten Parapodienpaares. Weiter im Inneren sind die Borstensäcke deutlich zu erkennen, auch die parapodialen Drüsen treten stark hervor (Abb. 14c und d). Aufgrund ihrer Autofluoreszenz läßt sich ihre klonale Abstammung mit der Methode der Fluoreszenzmarkierung nicht eindeutig bestimmen. Nun ist die Autofluoreszenz der Drüsen dreitägiger Tiere deutlich geringer als die viertägiger (Abb. 18). Eines der untersuchten Tiere wurde im Alter von drei Tagen fixiert und die Fluoreszenz seiner Drüsen ist recht stark ausgeprägt (Abb. 14d), wie auch die Fluoreszenz der Drüsen viertägiger Exemplare nach 1D-Injektion diejenige reiner Autofluoreszenz zu übersteigen scheint. Aus diesem Grund kann angenommen werden, daß die Drüsen aus 1D hervorgehen.

Unterhalb der Epidermis bzw. der ektodermalen Strukturen des Rumpfes setzt sich der markierte Bereich im Mesoderm fort. Das ist daran erkennbar, daß die ersten nicht fluoreszenzmarkierten Abschnitte eindeutig den entodermalen Makromeren des A-, B- und C-Quadranten zuzuordnen sind – die terminale D-Makromere ist davon natürlich ausgenommen. Am anterioren Ende des Rumpfes zeigt eine weitere Markierungslücke die Lage des Stomodaeums an, das offensichtlich nicht von der D-Zelllinie abstammt (Abb. 14c und d). Ausgenommen ist die linke Hälfte einer einschichtigen Zellhülle, die das Stomodaeum umfaßt (Abb. 14d).

Im Kopf hebt sich das Neuropilem schwach markiert ab (Abb. 14c). Etwas dorsal des Neuropilems erkennt man nach starker Kontrastanhebung eine transversal verlaufende lineare Struktur, die lateral nach posterior umbiegt und auch nach anterior kurze Projektionen zu entsenden scheint (Abb. 14c, Einschaltbild). Das Muster ähnelt sehr stark Strukturen, die nach F-Actinmarkierung durch Phalloidin-Texas Red zu erkennen sind (Abb. 4e). Hier handelt es sich vermutlich um Anteile des primären Mesoderms, also um Strukturen, die sich von der Mikromere 4d ableiten, die ja integraler Bestandteil des Markierungsmusters von 1D sein müssen. Dieser Befund aus einem viertägigen Wurm ergänzt die Informationen zur 4d-Markierung eines dreitägigen Tieres (Abb. 16d), da sich entsprechende Markierungen dort noch kaum abzeichnen.

1d-Mikromere



Die klonale Nachkommenschaft der Blastomere D spaltet sich im dritten Teilungszyklus in diejenigen Bereiche auf, die von der Makromere 1D bzw. der Mikromere 1d beigesteuert werden. Injektionen in 1d gelangen bei drei Keimen, die zu sehr gut entwickelten Jungwürmern heranreifen.

Wie auch bei den anderen Mikromeren des ersten Quartetts, treten nach der Markierung von 1d Bereiche im Jungwurm hervor, die ausschließlich im Kopf lokalisiert sind und zwar links-dorsal. Der Rumpf bleibt mit Ausnahme neuronaler Strukturen von einer Tracermarkierung ausgespart. Der gefärbte Bereich im Kopf ist recht ausgedehnt, was dem Volumen der Mikromere 1d von 4,8 % am Gesamtvolumen des Keimes entspricht – sie ist die zweitgrößte Mikromere des ersten Quartetts.

Eine detaillierte Betrachtung ergibt, daß in der linken Kopfhälfte Epidermis und Gehirn markiert sind (Abb. 15a bis c). Das exakte Muster variiert in den verschiedenen Exemplaren etwas, ist im Prinzip aber stets gleich: betroffen ist ein Bereich, der lateral weit nach ventral hinabreicht. Am anterioren Ende des Kopfes reicht die Markierung nicht bis an die Medianebene heran; die entstehende Markierungslücke bis zur Medianebene weitet sich von dorsal nach ventral etwas aus und korrespondiert spiegelbildlich zu einer Lücke in der Markierungsdomäne der Blastomere 1c (Abb. 12a). Nach posterior rückt der gefärbte Bereich der Medianebene näher, bis er sie etwa am breitesten Punkt des Kopfes erreicht. Posterior-dorsal wird der Kopf von drei großvolumigen Zellen abgeschlossen. In diesem Bereich finden sich großvolumige, cilientragende Zellen des Prototrochs (Abb. 15a bis c). Insgesamt erstrecken sich die dorsalen Partien weiter nach posterior als die ventralen.

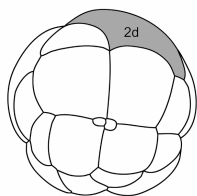
Das beide Kopfhälften überspannende Neuropilem ist in seinem dorsalen Abschnitt linkerseits bis etwa zur Medianebene des Tieres gefärbt. Weiter ventral verlaufen aber einzelne Fasern über die Mittellinie nach rechts hinaus. Genauso wie Fasern die der linken Seite entspringen, treten sie nach beiderseitigem Umlaufen des Stomodaeums ins Bauchmark über, wo zwei dicke Bündel Nervenstränge beiderseits der Medianebene erkennbar sind (Abb. 15d). Dies ist jedoch nur nach starker Kontrastanhebung und bei solchen Exemplaren der Fall, die auf dem Objektträger mit der Ventralseite nach oben orientiert waren. Die

gleichen Exemplare zeigen links lateral eine weitere Projektionen, bei der es sich vermutlich um periphere Nerven handelt, die vom Schlundkonnektiv aus bis weit nach posterior ziehen (Abb. 15e). Auf der rechten Körperseite war keine vergleichbare Markierung zu finden, auch nicht nach Markierung der 1c-Mikromere, die vermutlich das rechte Gegenstück beisteuert, das man erwarten darf.

Im Rumpf treten, mit Ausnahme der eben geschilderten neuronalen Strukturen, keine eindeutig auf Tracerfluoreszenz zurückführbaren Strukturen in Erscheinung.

Eine Trochophora, bei der die Mikromere 1d markiert worden war, zeigt eine interessante Struktur, die ihrem Erscheinungsbild nach sehr an die „Kopfniere“ erinnert, die WILSON (1892) bei der Entwicklung von *N. succinea* beschrieb (Abb. 17d). Diese Trochophora wurde während ihrer Untersuchung zerquetscht, so daß die genaue Lage dieser Struktur nicht ermittelt werden konnte.

2d-Mikromere

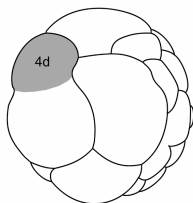


Nach dem vierten Teilungszyklus schnürt der Keim von *Platynereis* aus der Makromere 1D die Mikromere 2d ab, die aufgrund ihres Anteils von etwa 15 % am Gesamtvolumen des Embryos eine der größten Einzelzellen im Verlaufe der Entwicklung überhaupt darstellt und fast ausschließlich aus klarem Cytoplasma besteht.

Markierungen von 2d gestalteten sich äußerst schwierig, da diese Zelle sehr empfindlich auf Injektionen reagiert. Meistens lysierte diese Zelle dabei vollständig, wenn nicht, so doch immerhin teilweise. Dadurch war die Anzahl von Keimen die sich überhaupt weiterentwickelten sehr gering und alle diese Tiere zeigten deutliche Fehlentwicklungen. Das noch am besten entwickelte Exemplar, eine Trochophora, belegt aber trotz der Störungen, daß aus 2d die ektodermale Hülle der Hyposphäre entsteht, mit einer einschichtigen Epidermis und Verdickungen beiderseits der Medianlinie, aus denen die Borstensäcke sowie das Bauchmark hervorgehen (Abb. 17). Lediglich dort, wo das Stomodaeum an die Oberfläche tritt, ist die Markierung unterbrochen.

Zu einem etwas späteren Entwicklungszeitpunkt gelang es, die Blastomere $2d^{112}$ zu injizieren. Daraus erwuchs eine recht gut entwickelte Trochophora, bei der die Hyposphäre weitere Markierungslücken aufweist und zwar beiderseits des Stomodaeums (d. h. die Markierungslücke der Hyposphäre dort, wo das Stomodaeum an die Oberfläche tritt, ist gegenüber den Verhältnissen nach Injektion in $2d$ erweitert) sowie median-dorsal. Die Abwesenheit einer Markierung im Bereich des Stomodaeums ist verständlich, da dieses anderen Ursprungs ist; die weiteren Markierungslücken könnten jedoch Areale darstellen, die von den Blastomeren $2d^2$, $2d^{12}$ und $2d^{111}$ stammen, die zum Zeitpunkt der Injektion bereits abgespalteten waren (siehe Diskussion, Seite 103).

4d-Mikromere



Nach Vollendung des 16-Zellstadiums werden die Teilungszyklen von *Platynereis* deutlich asynchron. Zu einer Zeit, zu der andere Blastomeren noch einen Zyklus zurückliegen, teilt sich die Makromere 3D in die Makromere 4D und die relativ großvolumige Mikromere 4d (3,2 % des Gesamtvolumens). Nach einer Tracerinjektion in diesen Abkömmling der D-Zelllinie kann folglich eine weitere Einschränkung im Markierungsbereich erwartet werden. Ein in 4d injizierter Keim entwickelte sich zu einem dreisegmentigen Wurm; fünf Versuchskeime dieser Art wurden ausnahmsweise im Stadium der Trochophora fixiert.

Bereits im Stadium der 24 Stunden alten Trochophora bildet das Mesoderm eine klar abgegrenzte Struktur. Sie besteht aus zwei Ästen, die vom posterioren Pol aus in entgegengesetzter Richtung nach anterior, hin zum Prototroch verlaufen, auf dessen Höhe sie abschließen (Abb. 16e und f).

Im dreitägigen Wurm umfaßt der markierte Bereich Strukturen des Rumpfes, welche die Epidermis unterlagern. Posterior endet die Markierung an der Grenze zum Pygidium, anterior umfaßt sie ringförmig noch das – selbst nicht hervortretende – Stomodaeum (Abb. 16a bis d). Die Borstensäcke der drei Parapodienpaare sind bar jeglicher Markierung (Abb. 16c und d). Nach innen hin schließt die Markierung an der Grenze zur Dotter- und Lipidmasse ab, das Entoderm ist also ausgespart. Dieses Markierungsmuster ist deckungsgleich mit der Rumpfmuskulatur des dreisegmentigen Wurms, wie sie nach Anfärbung des F-Actins mit Phalloidin-Texas Red zu erkennen ist (Abb. 18e). Im vier Tage alten Tier dürften

dazu noch Strukturen kommen, die bis in den dorsalen Bereich des Kopfes hineinreichen und die ebenfalls mit der Lage von Muskeln harmonieren. Dieser Befund ist allerdings nicht direkt aus einer 4d-Markierung abgeleitet, sondern ergibt sich aus der Untersuchung eines Tieres, dessen Makromere 1D injiziert worden war und in dem entsprechende Muster nach Kontrastverstärkung sichtbar wurden (vergl. Abb. 14, Einschaltbild mit Abb. 4e oben, Actinsystem im Kopf des viertägigen Tieres). Nicht nur die positive Actinanfärbung sondern auch die Lage im Inneren des Kopfes spricht für den mesodermalen Charakter dieses Teilbereichs der 1D-Markierung und damit für eine Abstammung von 4d. Bereits der drei Tage alte 4d-markierte Wurm zeigt sehr schwache, sagittal verlaufende lineare Markierungsmuster im anterioren Teil des Kopfes (Abb. 16d).

Sehr Interessant ist eine kleinräumige, intensive Markierung die median posterior dem Darm an der Grenze zum Enddarm ventral aufliegt, der ebenfalls intensiver als die umgebenden Gewebe gefärbt ist (Abb. 16c und d). Auch eine Trochophora zeigt posterior-ventral einen kleinen Zellklumpen, der besonders intensiv gefärbt ist (Abb. 16f).

Die Mikromere 4d teilt sich nachfolgend bilateralsymmetrisch in die Blastomeren $4d^1$ und $4d^2$. In die Zelle $4d^1$ gelangen zwei erfolgreiche Injektionen in Keime, die zu Trochophorae heranwachsen sowie eine weitere in einen Embryo, der zum dreisegmentigen Wurm reifte. Im Ergebnis zeigt sich, daß auf der Entwicklungsstufe der Trochophora jeweils nur ein Mesodermband markiert ist und im dreisegmentigen Wurm nur eine Hälfte der Rumpfmuskulatur (ohne Abbildungen).

Abbildungen

Abb. 1a bis d: Vitellinhülle eines Keimes im Vierzellstadium. Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen. Alle Abbildungen mit gleichem Maßstab.

L1 – L4: Die vier Schichten, aus denen die Vitellinhülle nach KLUGE et al. (1995) aufgebaut ist.

Abb. 1a: Nativzustand mit den Schichten L1 - L4, wie von KLUGE et al. beschrieben.

Abb. 1b: Nach 5 minütiger Inkubation in Trypsin (4 mg/ml, siehe Text) bei Raumtemperatur. Die innerste Schicht L4 erscheint nun strukturlos und von mittlerer Elektronendichte.

Abb. 1c: Nach 5 minütiger Inkubation in DTT (1 mg/ml, siehe Text) bei Raumtemperatur. Wie auf Abb. 1b für die Behandlung mit Trypsin gezeigt, verändert auch Dithiothreitol lediglich die innerste Schicht L4 – sie erscheint größtenteils unstrukturiert. Lediglich eine an L3 angrenzende Verdichtung scheint erhalten.

Abb. 1d: Nach 6 minütiger Inkubation in einem Gemisch aus DTT (1 mg/ml, siehe Text) und Trypsin (4 mg/ml, siehe Text), beide frisch gelöst in Ca-Mg-freiem Seewasser + TRIS pH 8,0).

L1 ist in kleine Bruchstücke zerfallen, L3 tritt dagegen noch durchgehend in Erscheinung. Von L2 findet sich keine Spur, sie ist aber auch im Nativzustand nur als elektronenlichte Spalte zwischen L1 und L3 zu erkennen. L4 schließlich erscheint fast vollkommen amorph, andeutungsweise erkennt man noch kleine Fibrillen.

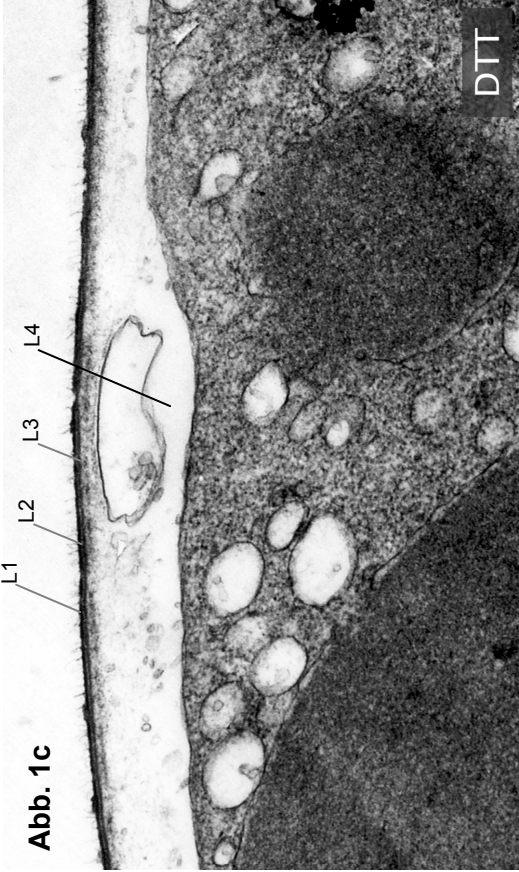
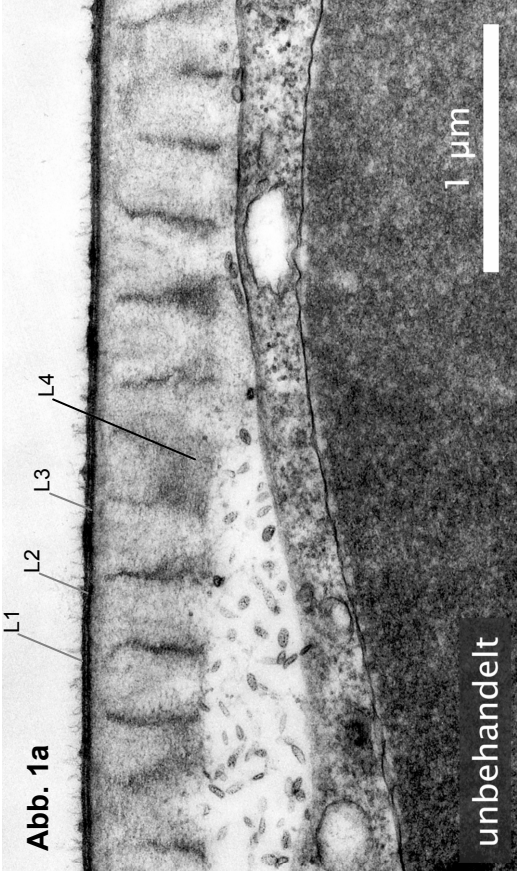
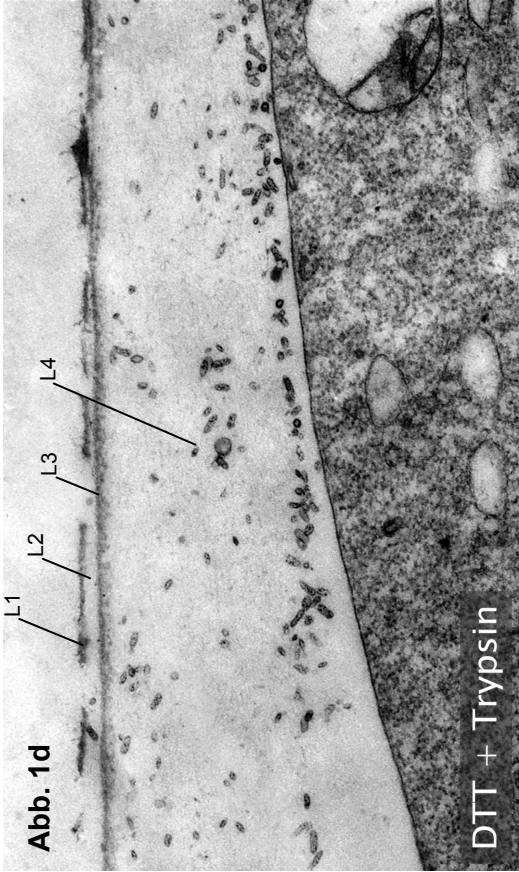
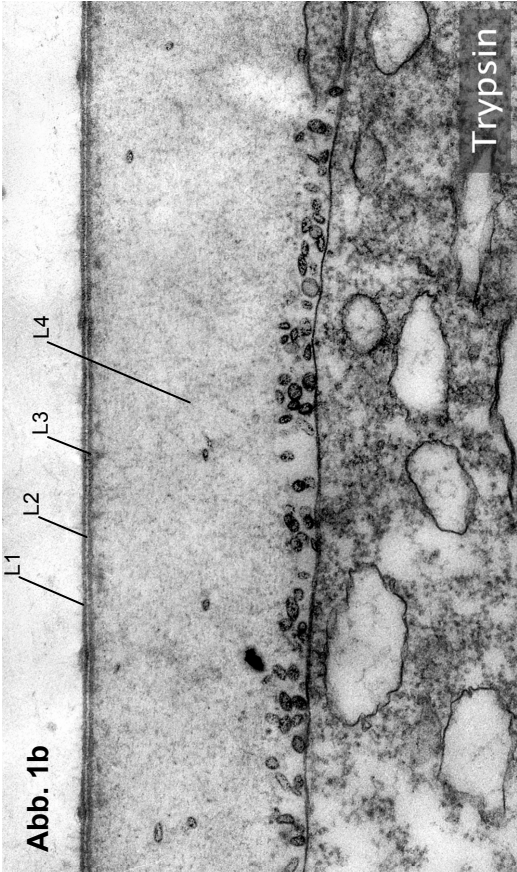


Abb. 2 a bis c: Markierungsmuster nach Injektion in Blastomere AB. Dreidimensionale Oberflächenansichten der markierten Bereiche eines vier Tage alten Wurms, überlagert mit den ungefähren Umrissen des Gesamttieres.

Die Verhältnisse im Rumpf sind am besten auf den Abb. 2a und b zu erkennen. Neben der linken Hälfte des Stomodaeums (St) läßt sich nur noch die Masse der terminalen Makromeren der A- und B-Zelllinie (M) eindeutig der Farbstofffluoreszenz zuschreiben. Die parapodialen Drüsen (D) treten nur aufgrund ihrer Autofluoreszenz in Erscheinung (vergleiche Abbildungen drei Tage alter Tiere mit denen vier Tage alter Exemplare – erst letztere zeigen deutliche Autofluoreszenz).

Alle Abbildungen veranschaulichen aus verschiedenen Ansichten die markierten Kopfstrukturen. Man erkennt, daß der Markierungsbereich im Kopf in der Hauptsache aus einem von ventral nach dorsal reichenden Zentralbereich (Z) um die Medianebene besteht, von dessen ventraler Basis aus nach beiden Seiten ein stark markiertes Band (entlang der blauen, transparenten Linien auf Abb. 2a) nach dorsal und anterior entspringt. Ein farbstofftragender Zellklumpen trat während der Verarbeitung des Exemplars aus und lagerte sich an der Außenfläche des Kopfes an (X).

Abb. 2d: Markierungsmuster nach Injektion in die Blastomere AB. Projektive Überlagerung von 45 optischen Einzelschnittbildern (konfokales Rasterlichtmikroskop; Ausdehnung in der z-Achse 25 µm) desselben Markierungsversuchs wie auf Abb. 2a bis c. Zur Verdeutlichung des Wurmkörpers wurden schwach fluoreszierende Bereiche verstärkt wiedergegeben. Auch nicht markierte Strukturen zeigen nämlich meistens eine zumindest schwache Eigenfluoreszenz. Z = Zentralstruktur, (rote gestrichelte Linie) = transversal verlaufende Struktur mit lateralen Fortsätzen nach anterior, M = Bereich der terminalen A- und B-Makromere, St = linker Teil des Stomodaeums, D = parapodiale Drüsen, B = Borsten der Parapodien, Py = Pygidium, X = ausgetretene Zellmasse.

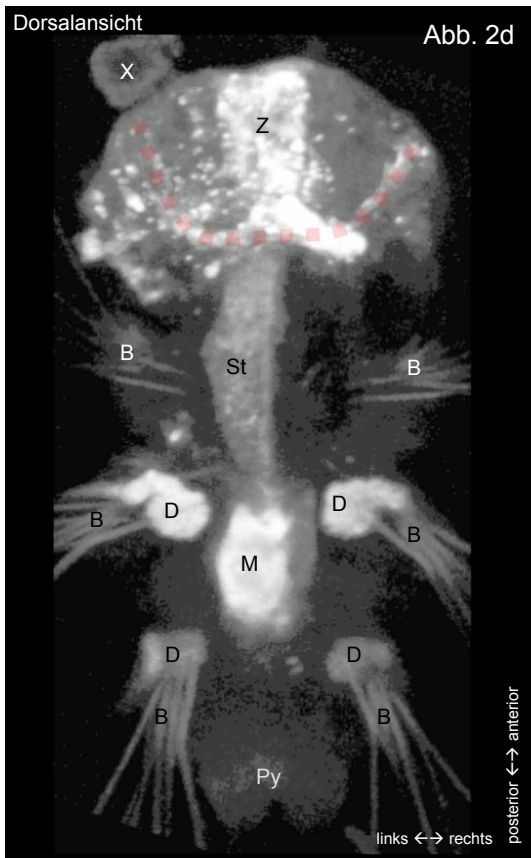
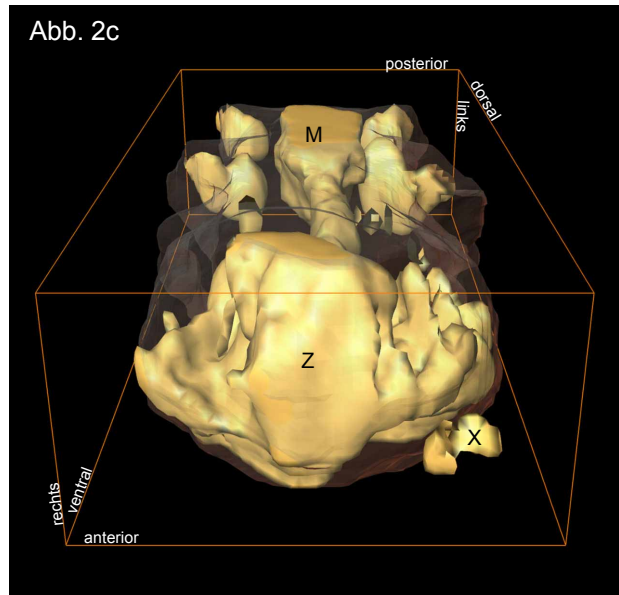
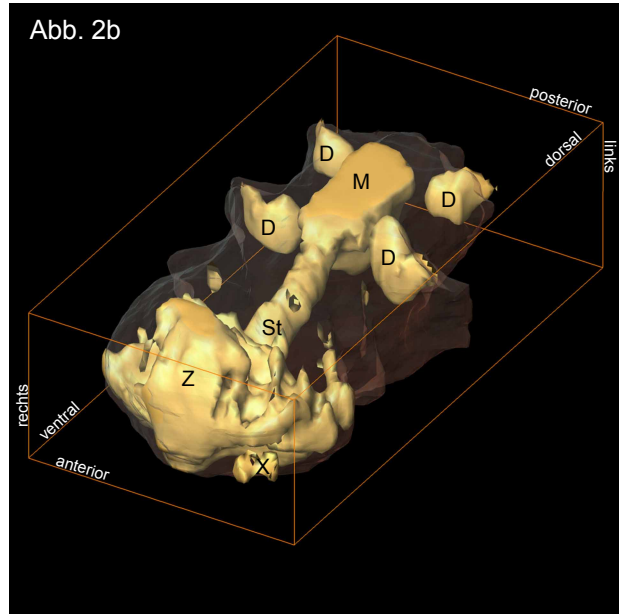
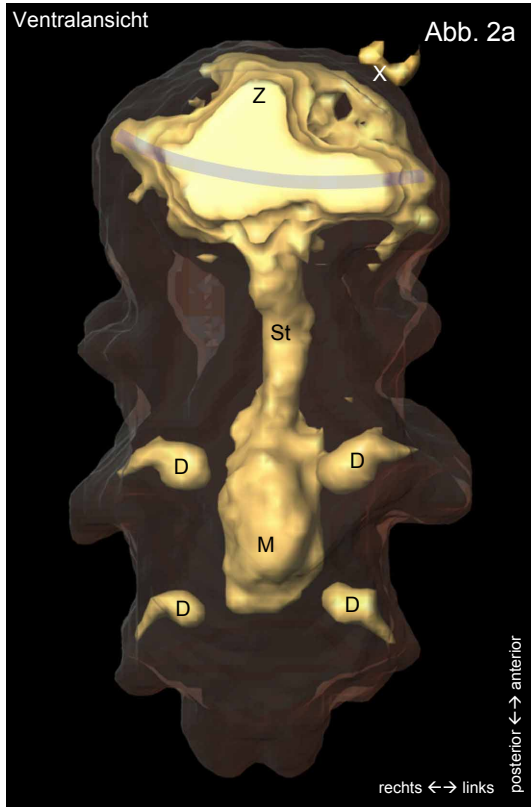


Abb. 3a und b: Markierungsmuster nach Farbstoffinjektion in die Blastomere CD des Zweizellstadiums. Dreidimensionale Oberflächenansichten der markierten Bereiche in einem vier Tage alten Wurm, überlagert mit den ungefähren Körperumrissen.

Beide Abbildungen zeigen die nahezu geschlossene Markierung der Oberfläche nach Injektion in die große CD-Blastomere. Das betrifft den gesamten Rumpf sowie fast den gesamten Kopf des dreisegmentigen Jungwurmes. Lediglich median, am anterioren Kopfende, befindet sich ein nicht markierter Spalt (★), ein Bereich, der nach Tracerinjektion in AB gefärbt ist.

Abb. 3c und d: Optische Einzelschnittbilder (konfokales Rasterlichtmikroskop) des schon auf Abb. 3a und b wiedergegebenen, vier Tage alten Wurmes, nach Farbstoffinjektion in die Blastomere CD. Der Schnitt auf Abb. 3c stammt aus einem eher ventral gelegenen Bereich des Tieres, der auf Abb. 3d aus dem dorsalen Bereich.

Im Rumpf zeichnen sich die Konturen des Tieres genau ab, was zeigt, daß die Epidermis markiert ist. Auch das Bauchmark (violette Linie, Abb. 3c) hebt sich als Doppelstrang ab. Je nach Schnitt treten die parapodialen Drüsen (D) unterschiedlich hervor, sie autofluoreszieren allerdings stark und lassen sich deswegen nicht eindeutig einer Zelllinie zuschreiben. Von den Parapodien aus ragen die autofluoreszierenden Borsten (B) nach außen. Das Entoderm ist durch den markierten Dotterbereich der terminalen C- und D-Makromere (M, Abb. 3d) sowie deren große Lipidtropfen (L, Abb. 3d) gekennzeichnet. Der Bereich der terminalen A- und B-Makromeren ist hingegen nicht markiert, was wegen deren geringerem Volumen weniger deutlich zu erkennen ist (★, Abb. 3d). Vom Stomodaeum ist nur die rechte Hälfte markiert (St, Abb. 3c), gemeinsam mit der punktförmigen Autofluoreszenz der Kieferanlage (Ki, Abb. 3c), die auch im unmarkierten linken Teil zu sehen ist. Das gesamte Stomodaeum wird von einer Hüllschicht von Zellen umfaßt (grüne Linie, Abb. 3c). Ganz posterior ist das Pygidium (Py, Abb. 3d) mit seinen beiden Uritenanlagen (U, Abb. 3d) auszumachen, im Übergang zum Kopf zeichnen sich auch schwach die beiden Peristomialzirren ab (P, Abb. 3c). Zwischen äußerem Ektoderm und innerem Entoderm ist die Markierung nirgends unterbrochen, so daß sie auch das Mesoderm umfassen muß.

Im Kopf erkennt man das Neuropilem (rote Linie, Abb. 3c). Anterior median ist die Markierung unterbrochen (★, Abb. 3c), der Rest des Kopfes tritt dagegen deutlich bis zur Epidermis hervor. Die blaue Linie auf Abb. 3d zeigt den vermutlichen Bereich der Cilienzellen des Kopfes.

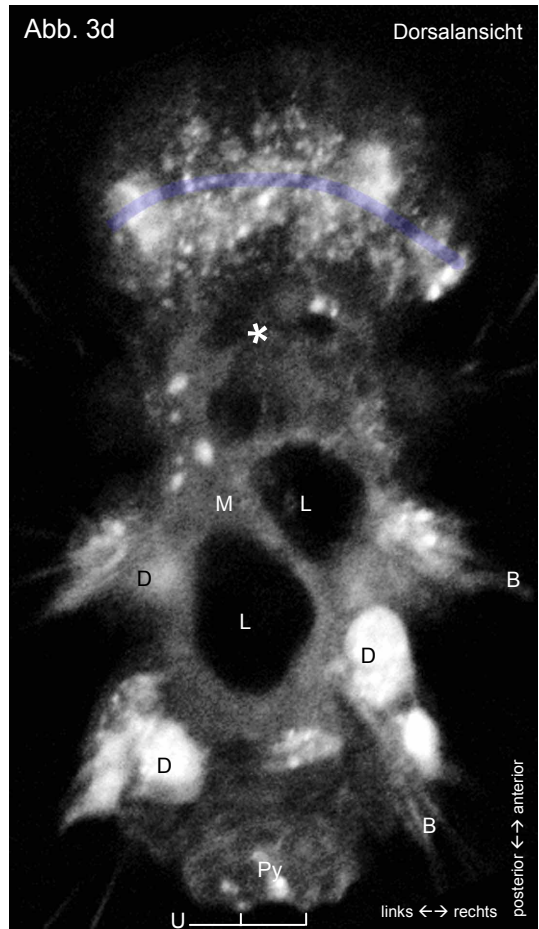
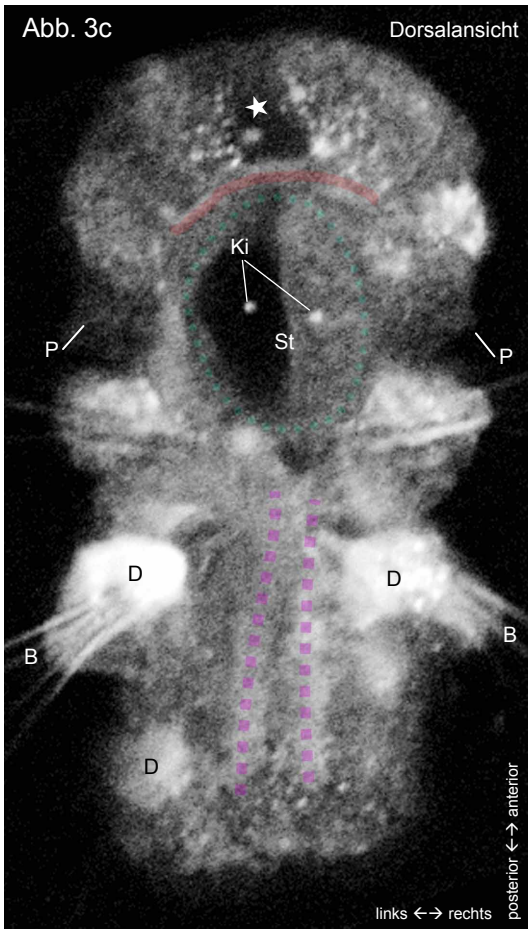
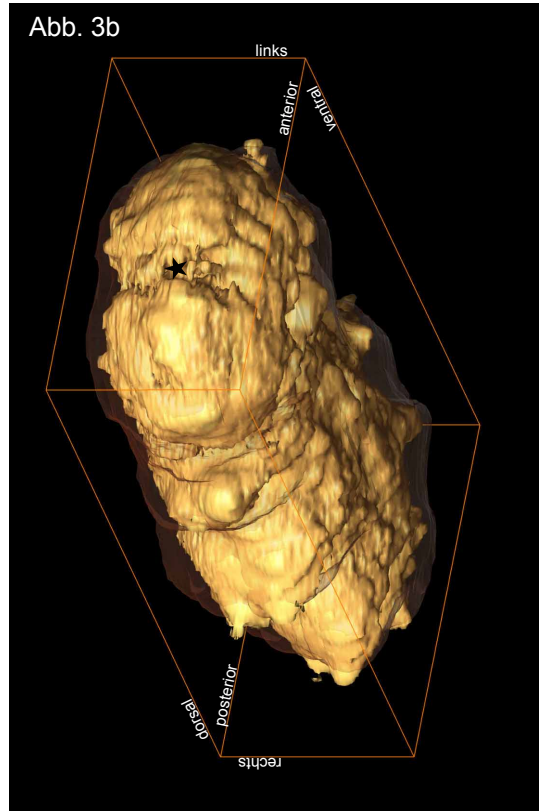
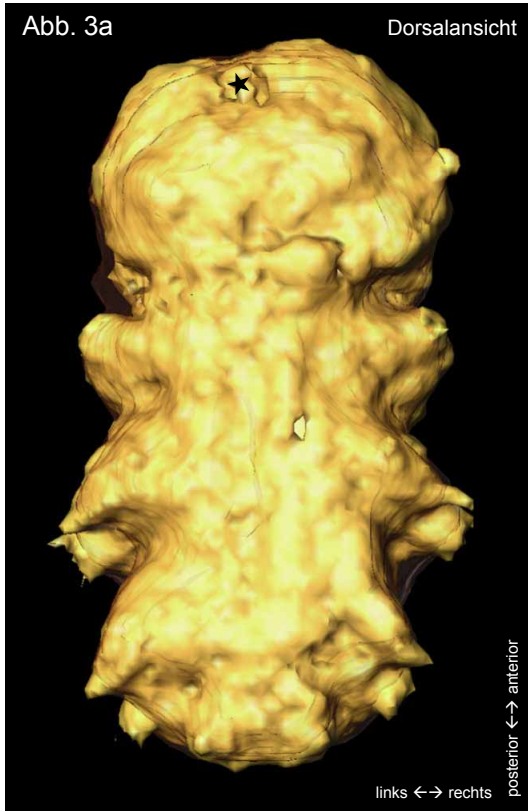


Abb. 4a und b: Markierungsmuster nach Farbstoffinjektion in die Blastomere A des Vierzellstadiums. Dreidimensionale Oberflächenansichten der markierten Bereiche in einem vier Tage alten Wurm, überlagert mit den ungefähren Körperumrissen.

Im Rumpf ist lediglich die terminale Makromere der A-Zelllinie (M) sowie der linke Teil des Stomodaeums markiert (St). Die parapodialen Drüsen (D; nur drei ausgebildet) zeigen lediglich Autofluoreszenz.

Im Kopf besteht das Muster aus einem median anterior gelegenen zentralen Bereich, der besser auf Abb. 4c zu erkennen ist (Z); er erstreckt sich nur bis zur Frontalebene. Von seiner ventralen Basis aus verläuft nach links dorsal und posterior ein Band von Markierungen. Dabei dürfte es sich zum einen um cilienbesetzte Zellen des Prototrochs (durchgezogene blaue Linie) handeln und zum anderen um einen weiteren ektodermalen Teil (gestrichelte blaue Linie) der eventuell ebenfalls bewimperte Zellen trägt, die dann aber nicht dem ursprünglichen Prototroch angehören würden, wie der - allerdings nicht vollkommen klare - Vergleich mit entsprechenden DIK-Aufnahmen nahelegt.

Abb. 4c und d: Optische Einzelschnittbilder (konfokales Rasterlichtmikroskop) des schon auf Abb. 4a und b wiedergegebenen, vier Tage alten Wurmes, nach Farbstoffinjektion in die Blastomere A. Zur besseren Orientierung wurde die Hintergrundfluoreszenz verstärkt, so daß sich die Konturen des Tieres besser abzeichnen. Abb. 4c gibt ungefähr die Frontalebene wieder, Abb. 4d entstammt einem weit dorsal gelegenen Bereich.

Auf beiden Bildern erkennt man im Bereich des Rumpfes hauptsächlich die Farbstofffluoreszenz des Cytoplasmas und in geringerem Maße des Dotters der terminalen A-Makromere (M). Auf Abb. 4c sind zusätzlich autofluoreszierende parapodialen Drüsen (D) zu erkennen.

Im Kopf zeigt Abb. 4c neben der median gelegenen Zentralmarkierung (Z) eine transversal verlaufende Struktur mit Verzweigungen nach anterior und posterior an beiden Enden (1). Im gleichen Bereich, nur weiter dorsal gelegen, zeigt Abb. 4d eine fast identisch orientierte Struktur, die aber nicht durchgängig verläuft, sondern aus Einzelmarkierungen besteht (2).

Abb. 4e: Projektion aller optischen Einzelschnittbilder (konfokales Rasterlichtmikroskop) von Aufnahmen der Köpfe zweier nicht injizierter *Platynereis*, einem vier (oben) und drei (unten) Tage alten Stadium nach Phalloidin-Texas Red-Färbung zur F-Actinmarkierung. Man erkennt sowohl im Rumpf, als auch im Kopf viele markierte Strukturen, bei denen es sich mit Ausnahme des Neuropilems (Np) wohl ausschließlich um Muskelzüge handeln dürfte.

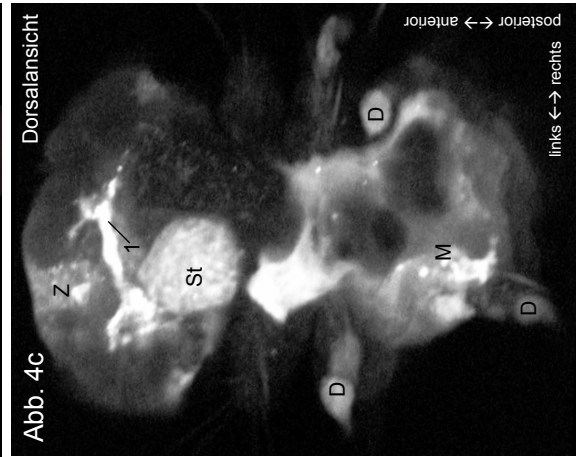
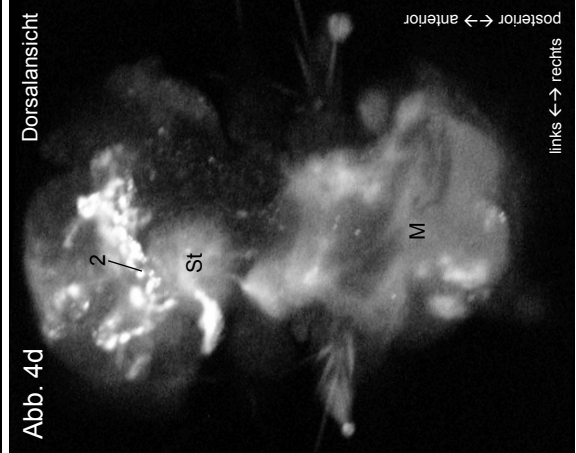
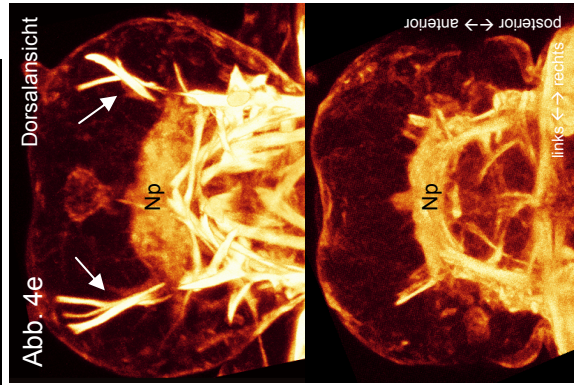
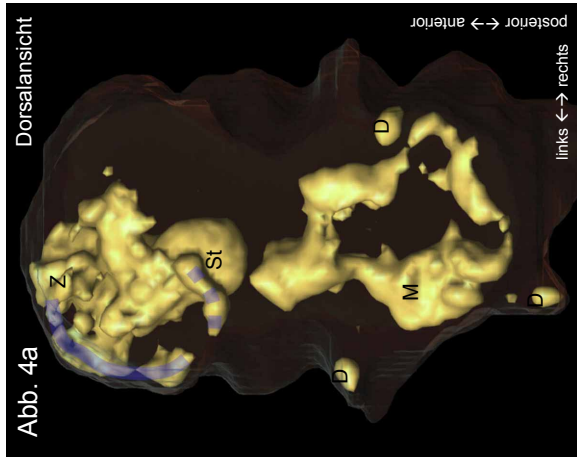
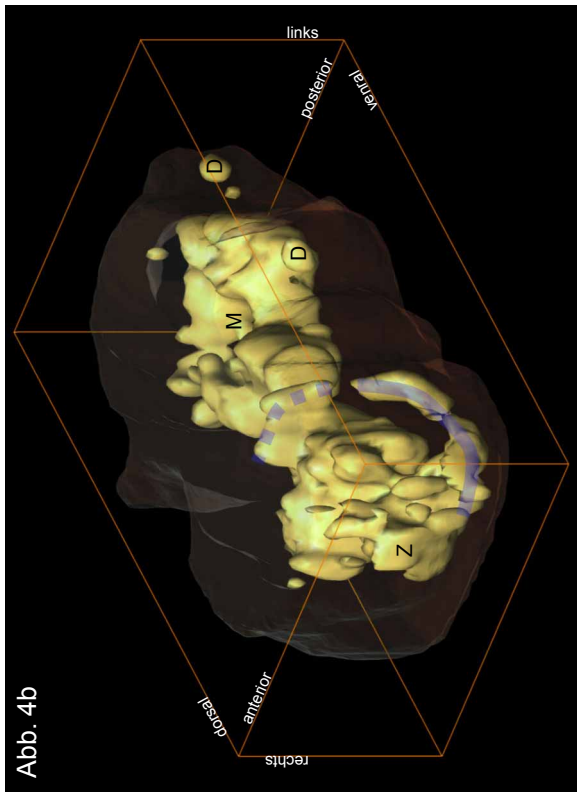


Abb. 5a und b: Markierungsmuster nach Farbstoffinjektion in die Makromere 1A des Achtzellstadiums. Dreidimensionale Oberflächenansichten der markierten Bereiche in einem vier Tage alten Wurm, überlagert mit den ungefähren Körperumrissen.

Die irreguläre Form des Tieres läßt auf eine nicht ganz ordnungsgemäße Entwicklung schließen. Im Rumpf ist die Masse der terminalen A-Makromere (M) markiert, die parapodialen Drüsenzellen (D) treten durch Autofluoreszenz hervor. Der linke Teil des Stomodaeums (St) ist sehr weit in die Länge gestreckt und scheint die dorsale Oberfläche zu durchbrechen (★). Direkt im anterioren Anschluß an das Stomodaeum verläuft eine transversal ausgerichtete Struktur, die lateral unter Verzweigung in jeweils zwei Äste nach anterior umlenkt (1, besser zu erkennen auf Abb. 5c). Von der Mitte des dorsalen Abschnitts der transversalen Struktur aus zieht ein Ausläufer etwa median nach anterior, erreicht aber nicht die Oberfläche (Z, besser zu erkennen auf Abb. 5c).

In der äußersten linken Kopfflanke ragt eine Markierung von ventral aus senkrecht nach oben, um auf der Dorsalseite transversal nach innen umzubiegen (gestrichelte blaue Linie auf Abb. 5b).

Abb. 5c: Markierungsmuster aus dem ventralen Bereich nach Injektion in die Blastomere 1A. Projektive Überlagerung von 55 optischen Einzelschnittbildern (konfokales Rasterlichtmikroskop; Ausdehnung in der z-Achse 30 µm) des Markierungsversuchs von Abb. 5a und b. Zur Verdeutlichung des Wurmkörpers wurde schwache Fluoreszenz digital verstärkt wiedergegeben.

In diesem Bild sind vor allem die transversale Struktur mit ihren terminalen Verzweigungen (1) sowie die Zentralstruktur (Z) deutlicher zu erkennen. St = Stomodaeum, M = terminale A-Makromere, D = parapodialen Drüsen (autofluoreszierend), B = Borsten (autofluoreszierend).

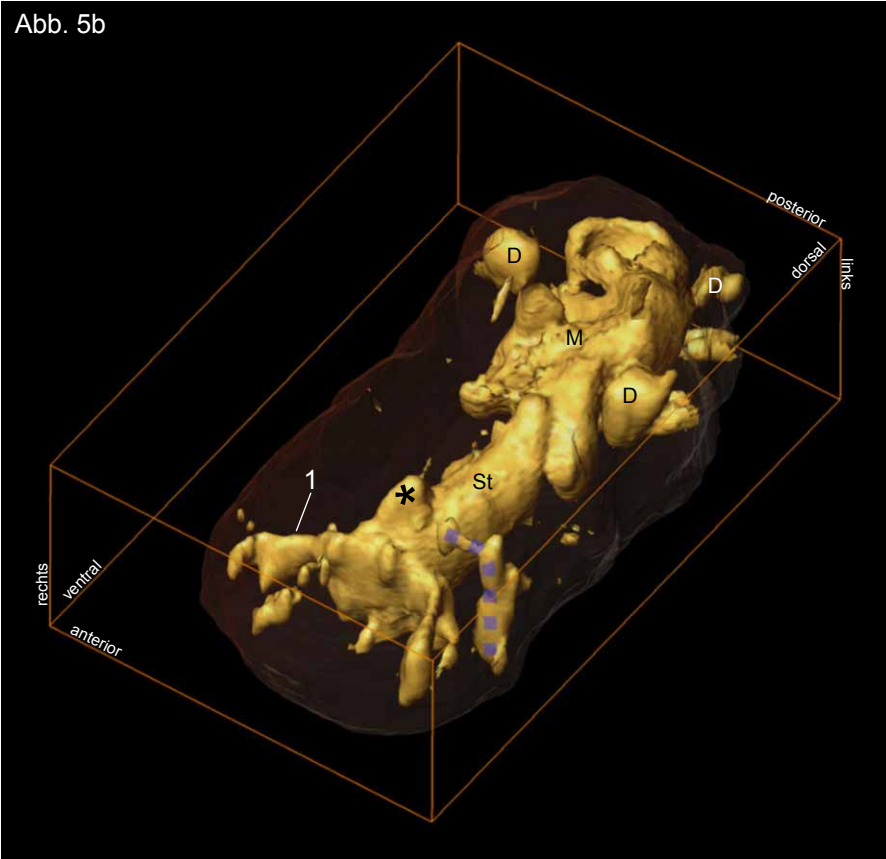
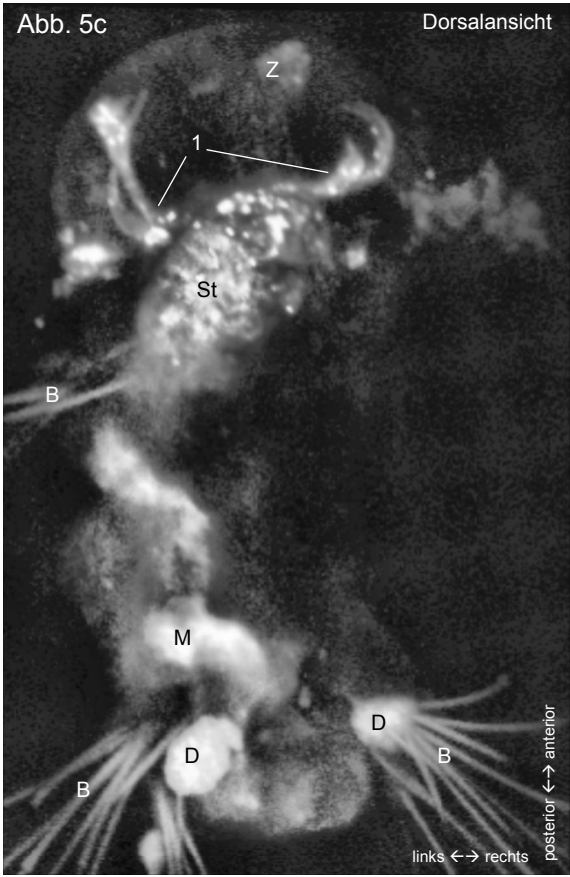
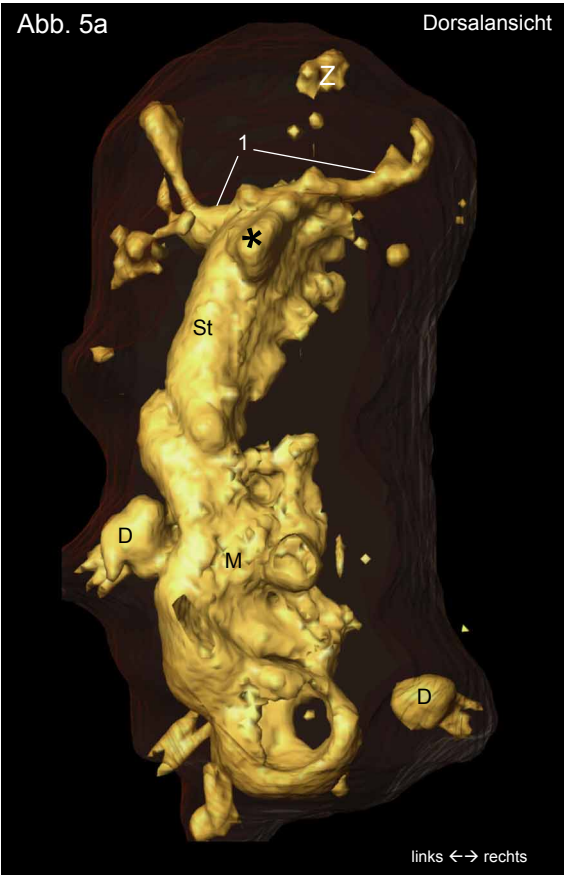


Abb. 6a und b: Markierungsmuster nach Farbstoffinjektion in die Mikromere 1a des Achtzellstadiums. Dreidimensionale Oberflächenansichten der markierten Bereiche in einem drei Tage alten Wurm, überlagert mit den ungefähren Körperumrissen.

Im Rumpf sind lediglich Strukturen zu erkennen, die Autofluoreszenz zeigen, nämlich die parapodialen Drüsen (D) und die nach außen weisenden Borsten, die hier nur in Ansätzen sichtbar sind.

Von einem anterior von ventral nach dorsal verlaufenden zentral gelegenen Markierungsbereich (Z) im Kopf verläuft ein Band von Zellen an der Oberfläche nach dorsal posterior (blaue Linie). Zwischen diesem Band und der Zentralstruktur befinden sich weitere Markierungen, die zumindest teilweise von zwei der fünf larvalen Drüsenzellen herrühren dürften, die hier aber vermutlich gequollen sind und daher nicht diskret in Erscheinung treten.

Abb. 6c: Projektion von 44 optischen Einzelschnittbildern (konfokales Rasterlichtmikroskop; Ausdehnung in der z-Achse 21 μm) aus der ventralen Region eines drei Tage alten Wurms, bei dem die Nachkommenschaft der Mikromere 1a fluoreszenzmarkiert wurde. Es handelt sich dabei um ein anderes Exemplar als das der vorhergehenden beiden Abbildungen.

Links der Medianebene erkennt man zwei blasenförmige dichte Markierungen (\star), bei denen es sich vermutlich um zwei der insgesamt fünf larvalen Drüsenzellen handelt.

D = autofluoreszierende parapodiale Drüsen, B = autofluoreszierende Borsten.

Abb. 6d: Projektion von 75 kontrastverstärkten optischen Einzelschnitten (konfokales Rasterlichtmikroskop; Ausdehnung in der z-Achse 32 μm) eines dritten, ebenfalls drei Tage alten Tieres. Durch die Bearbeitung erscheinen die markierten kompakten Kopfstrukturen überstrahlt. Es ist aber leicht zu erkennen, daß farbstofftragende Fasern (Pfeile) aus dem Neuropilem (Np) beiderseits um das (nicht sichtbare) Stomodaeum herum ins Bauchmark übertreten. Im Bereich der autofluoreszierenden terminalen Makromeren (M) läßt sich der Verlauf wegen der optischen Überlagerung nicht mehr klar verfolgen. Die Umrisse des Tieres sind durch die Bildbearbeitung ebenfalls hervorgehoben, insbesondere erkennt man die autofluoreszierenden Borsten der Parapodien (B) sowie autofluoreszierendes Pigment im Pygidium (Py).

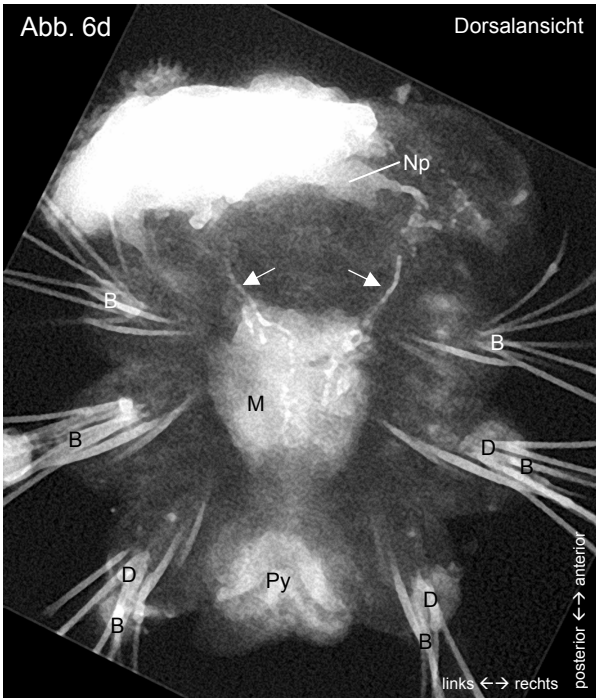
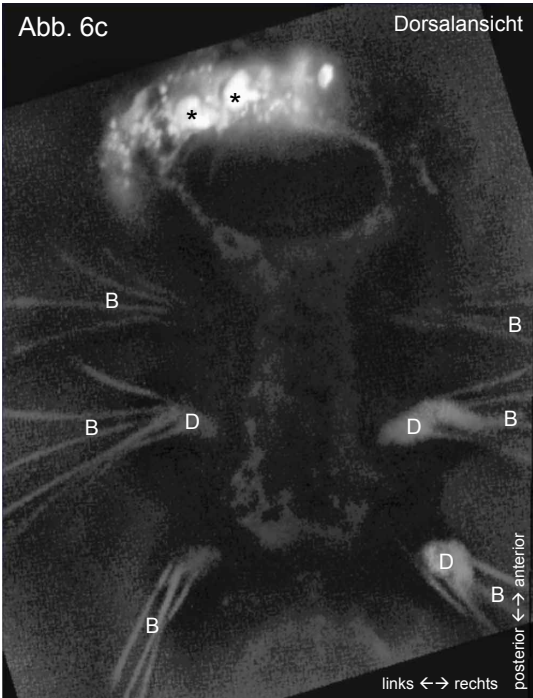
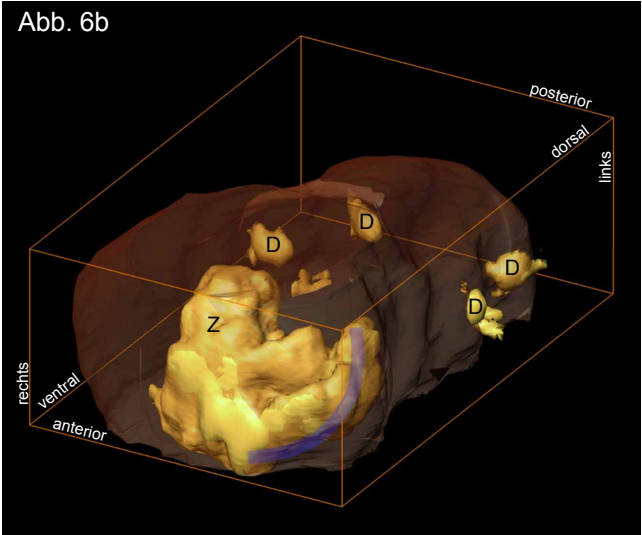
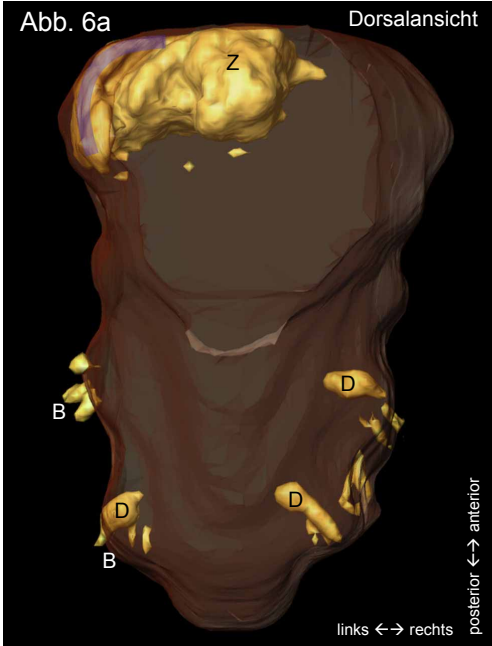


Abb. 7a und b: Markierungsmuster nach Farbstoffinjektion in die Blastomere B des Vierzellstadiums. Dreidimensionale Oberflächenansichten der markierten Bereiche in einem vier Tage alten Wurm, überlagert mit den ungefähren Körperumrissen. Die Menge injizierten Fluoreszenzfarbstoffs in diesem Exemplar war sehr gering, weswegen autofluoreszierende Strukturen (D, parapodiale Drüsen im Rumpf, A, Augen) übermäßig stark hervortreten.

Im Rumpf erkennt man die terminale B-Makromere (M). Wegen der geringen Farbstoffmenge mußte das Signal hoch verstärkt werden, daher tritt wahrscheinlich auch noch die Autofluoreszenz des Dotters anderer Makromeren in Erscheinung.

Im Kopf ist ein anterior gelegener zentraler Bereich um die Medianebene (Z) gefärbt, von dessen ventraler Basis aus ein Band von cilientragenden Zellen des Prototrochs an der Oberfläche entlang nach rechts und dorsal (blaue Linie) verläuft.

Abb. 7c: Projektion von 44 optischen Einzelschnittbildern (konfokales Rasterlichtmikroskop; Ausdehnung in der z-Achse 24 µm) des auch auf Abb. 7a und b gezeigten Exemplars. Im Rumpf kann man den markierten Dotter der terminalen B-Makromere (M) erkennen, an den weitere, vermutlich autofluoreszierende Dotterbereiche anschließen. Ebenfalls durch Autofluoreszenz sind die parapodialen Drüsen (D) und Borsten (B) sichtbar. Im Kopf erkennt man gut die zentral gelegene Markierung (Z) und teilweise die rechts daran anschließenden Muster der Cilienzellen (Ci). Im posterioren Anschluß an den Dotter hebt sich eine kreuzförmige Struktur ab, die (senkrecht im Bild) die Lage des Spaltes zwischen den beiden Hälften des Stomodaeums anzeigt, eingerahmt von den punktförmigen, autofluoreszierenden Anlagen der beiden Kiefer (Ki). (★) bezeichnen eine epidermale Struktur, auf die bei Besprechung der Markierungen von 1B in Text eingegangen wird.

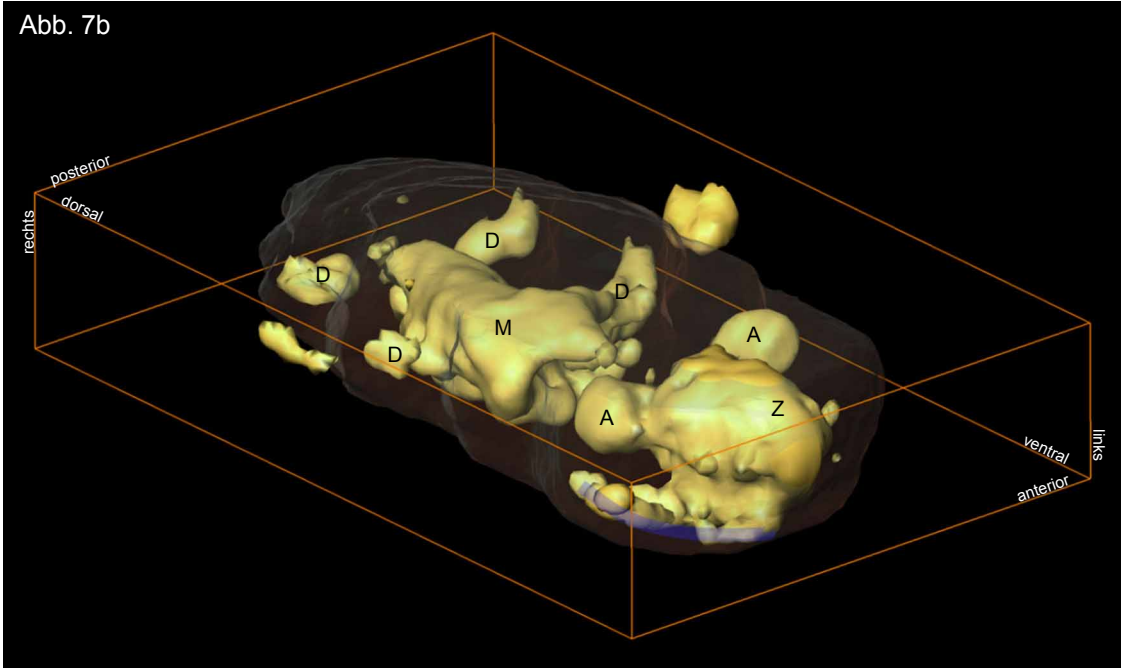
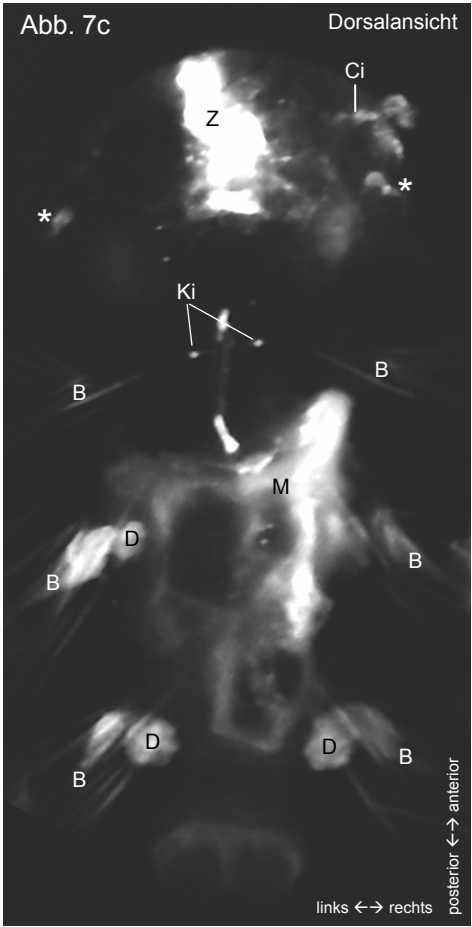
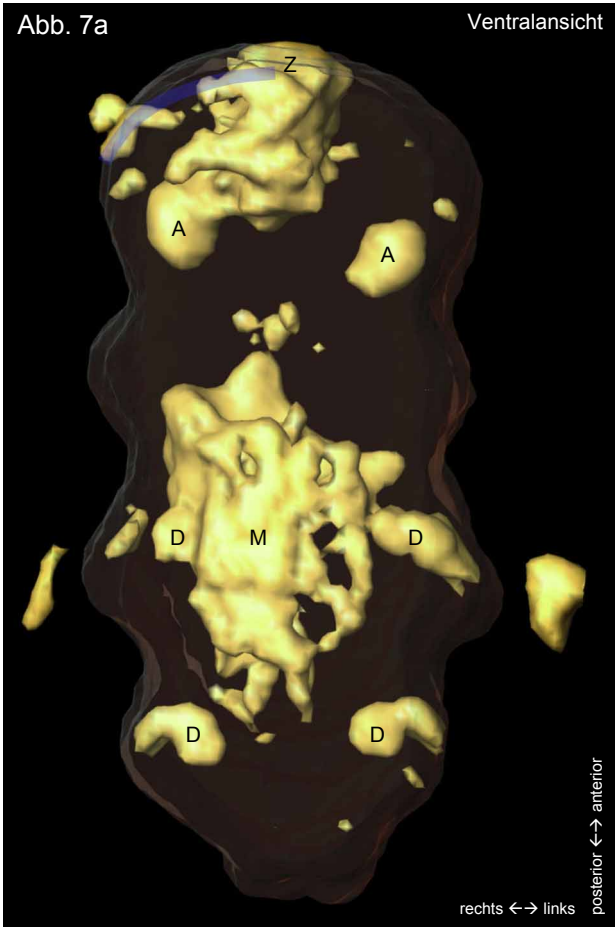


Abb. 8a bis c: Unterschiedliche dreidimensionale Oberflächenansichten eines drei Tage alten Wurmes nach Farbstoffinjektion in die 1B-Makromere des Achtzellstadiums, überlagert mit den ungefähren Körperumrissen.

Im Rumpf erkennt man lediglich die Fluoreszenz der markierten terminalen B-Makromere (M). Die parapodialen Drüsen die auf anderen Aufnahmen aufgrund ihrer Autofluoreszenz zu erkennen sind, heben sich beim hier gewählten Schwellenwert für die Darstellung nicht ab, zumal die Autofluoreszenz bei dreitägigen Tieren noch recht gering ist.

Im Kopf sieht man dorsal eine transversal verlaufende Struktur, die lateral auf beiden Seiten nach anterior umbiegt (durchgezogene grüne Linie, Abb. 8a). Der transversal verlaufende Teil setzt sich steil nach ventral ziehend anterior fort (breiter blauer Pfeil, Abb. 8a und b). Beiderseits der Basis der transversalen Struktur zieht je ein markierter Bereich steil nach dorsal posterior hoch (★).

Abb. 8d: Projektion von 70 kontrastverstärkten optischen Einzelschnitten (konfokales Rasterlichtmikroskop; Ausdehnung in der z-Achse 37,5 µm) des auf den Abb. 8a bis c gezeigten drei Tage alten Tieres. Im Rumpf sind schwach die autofluoreszierenden parapodialen Drüsen (D) und Borsten (B) zu erkennen. Besonders stark hebt sich die farbstofftragende Masse der terminalen B-Makromere ab (M). Im Kopf erkennt man eine transversal verlaufende Struktur die lateral nach anterior umlenkt (große Pfeile) und, auf den dreidimensionalen Oberflächenansichten nicht darstellbar, einen schmalen, nach anterior ragender Fortsatz, der der Mitte des transversalen Abschnitts entspringt (kleiner Pfeil). An der linken und rechten Flanke des Kopfes sind Teile der Markierungen zu erkennen, die von der ventralen Basis der transversalen Struktur aus nach posterior dorsal verlaufen (★).

Abb. 8e: Projektion von 55 kontrastverstärkten optischen Einzelschnitten (konfokales Rasterlichtmikroskop; Ausdehnung in der z-Achse 26 µm) eines zweiten, vier Tage alten Tieres, bei dem die Makromere 1B markiert worden war. Alle strukturellen Bezeichnungen analog zu Abb. 8d. Mit Ausnahme der fehlenden epidermalen lateralen Markierungen (★ auf Abb. 8d) gleichen sich die Muster der beiden Exemplare sehr.

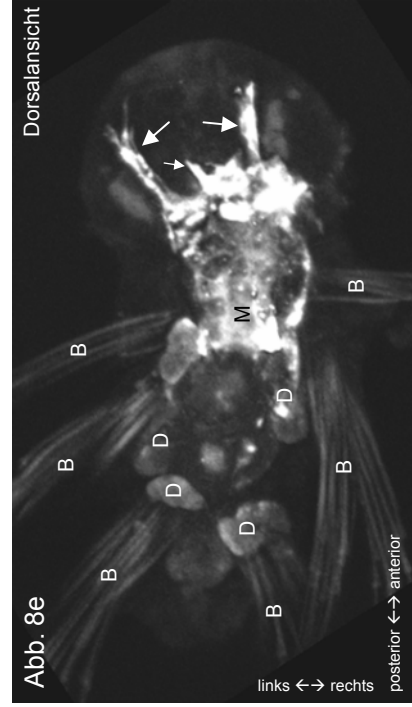
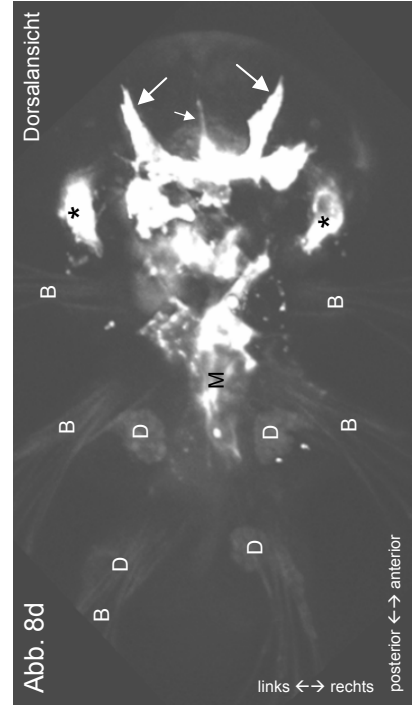
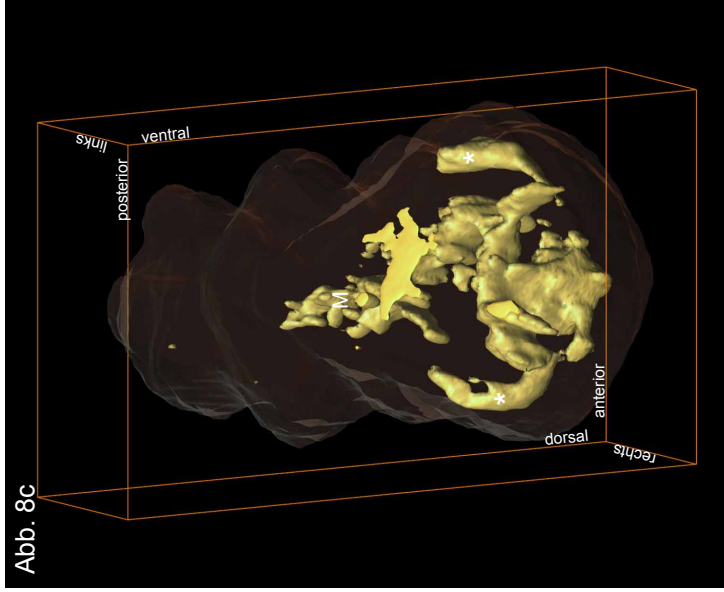
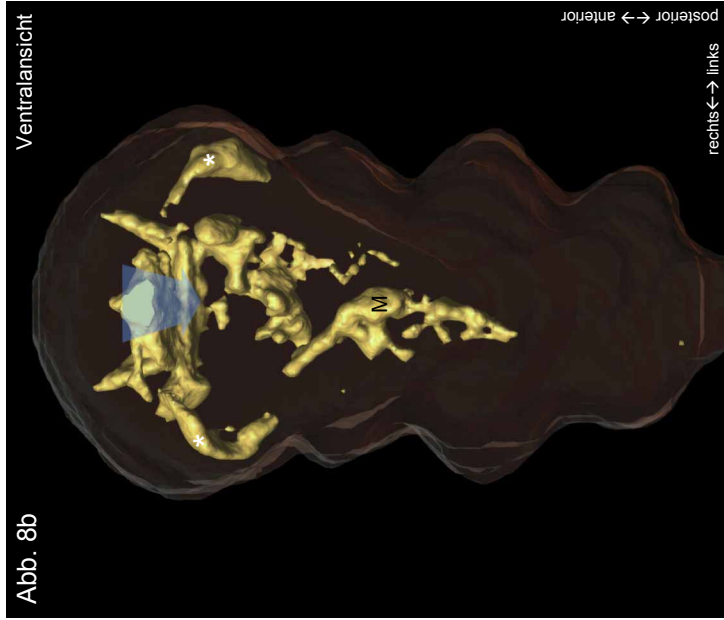
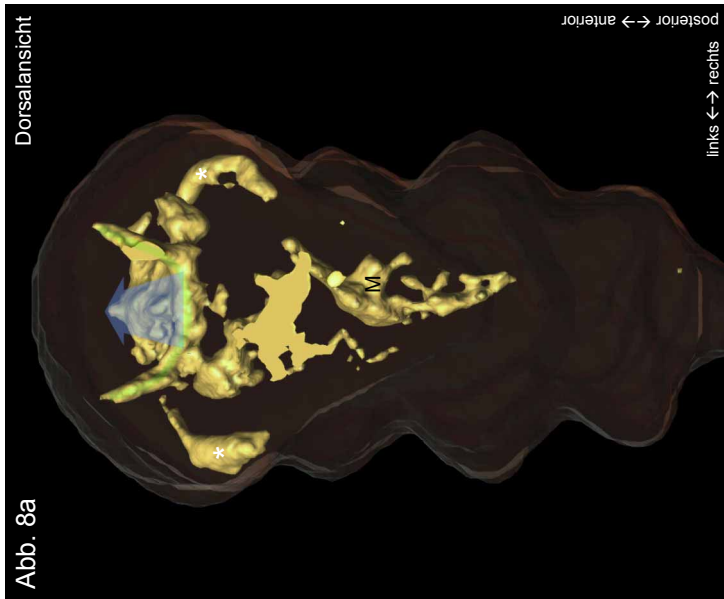


Abb. 9a und b: Markierungsmuster nach Farbstoffinjektion in die Mikromere 1b des Achtzellstadiums. Dreidimensionale Oberflächenansichten der markierten Bereiche in einem drei Tage alten Wurm, überlagert mit den ungefähren Körperumrissen.

Im Rumpf ist in dieser Darstellungsweise lediglich der autofluoreszierende Farbpigmentring am Pygidium (Py) zu sehen. Die Autofluoreszenz der parapodialen Drüsen dreitägiger Tiere ist erst sehr schwach ausgeprägt.

Im Kopf erkennt man einen zentralen Markierungsbereich um die Medianebene (Z). Von der ventralen Basis dieser Zentralstruktur aus verläuft ein Band großvolumiger Zellen nach rechts bis etwa zur mittleren Frontalebene (blaue Linie). Dabei handelt es sich um cilientragende Zellen des Prototrochs.

Abb. 9c: Projektion von 45 optischen Einzelschnittbildern (konfokales Rasterlichtmikroskop; Ausdehnung in der z-Achse 25 μm) eines anderen als auf Abb. 9a und b gezeigten, drei Tage alten Exemplars. Durch starke Anhebung des Kontrastes lassen sich hier andeutungsweise Fasern erkennen, die zwischen dem Neuropilem und dem Bauchmark verlaufen (Pfeile).

Der markierte Kopfbereich ist durch die digitale Nachbehandlung überstrahlt. Im Rumpf erkennt man autofluoreszierende Strukturen, nämlich Dotter in den terminalen Makromeren (M), eine parapodiale Drüse (D) sowie das Pygidium mit seinem Pigmentring (Py).

Abb. 9d: Additive Überlagerung von 47 optischen Einzelschnittbildern (konfokales Rasterlichtmikroskop; Ausdehnung in der z-Achse 31 μm) aus der ventralen Region des auf Abb. 9a und b gezeigten, drei Tage alten Wurms, nach Markierung der Mikromere 1b. Zur besseren Veranschaulichung der Körperform wurde die Hintergrundfluoreszenz stark angehoben.

Im posterioren Kopfabschnitt erkennt man in dieser Projektion ebenfalls die großvolumigen Zellen, die zum Cilienkranz des ehemaligen Prototrochs gehören (blaue Linie). Bei drei weiteren großvolumigen Zellen (gelb umrandet; 1 – 3) handelt es sich um larvale Drüsenzellen des Kopfes. Beachte, daß von diesen Zellen nur ein Randsaum markiert ist (am besten zu erkennen in 1), der zudem nicht durchgängig ist, sondern aus getrennten Schollen zu bestehen scheint. Neben diesen drei fluoreszenzmarkierten Drüsenzellen kann man als Aussparung der Hintergrundfluoreszenz noch zwei Hohlräume erkennen (gelb umrandet; 4 – 5), bei denen es sich um die indirekte Abbildung der restlichen beiden larvalen Drüsenzellen handeln dürfte.

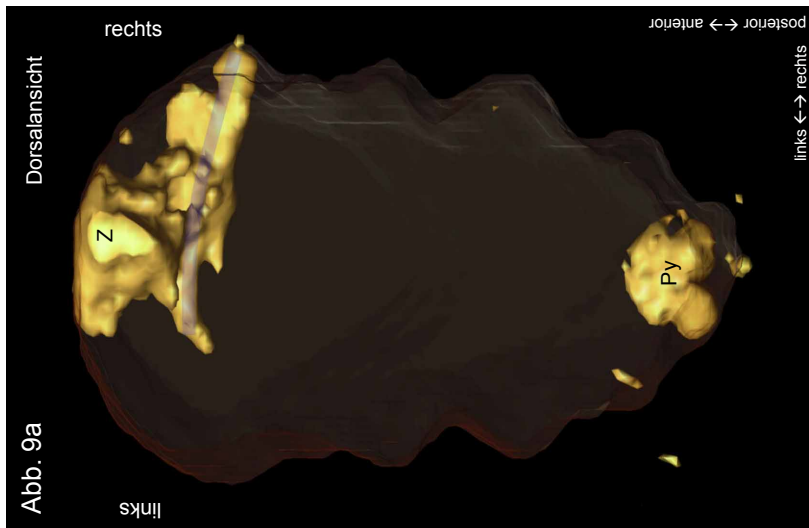
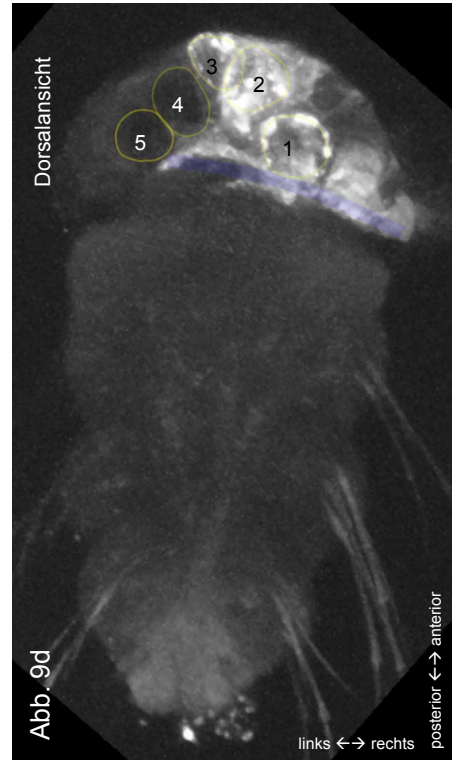
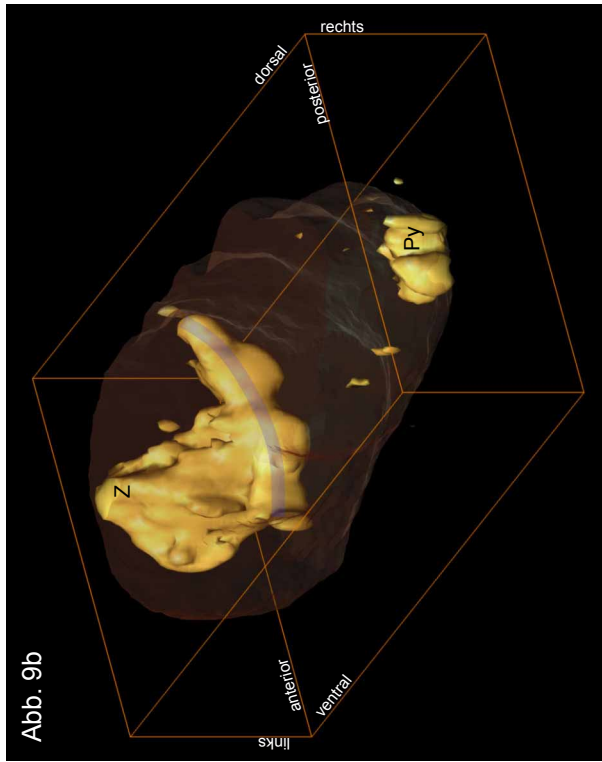
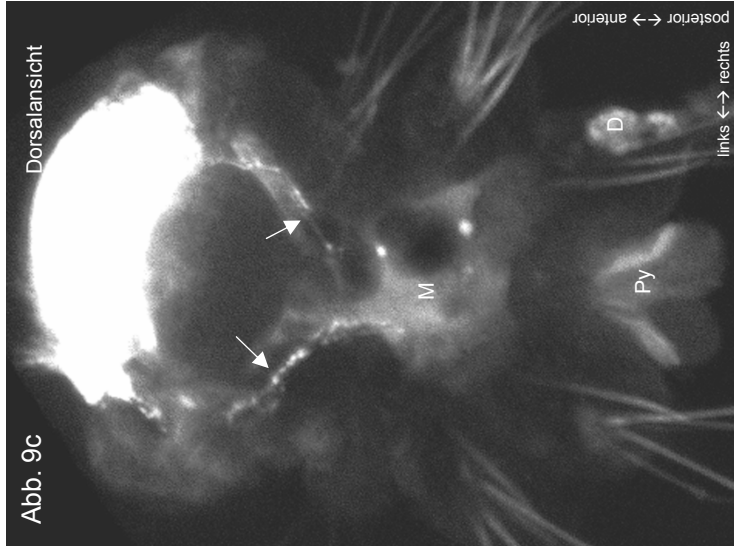


Abb. 10a und b: Markierungsmuster nach Farbstoffinjektion in die Blastomere C des Vierzellstadiums. Dreidimensionale Oberflächenansichten der markierten Bereiche in einem vier Tage alten Wurm, überlagert mit den ungefähren Körperumrissen.

Die injizierte Farbmenge in dieses Exemplar war sehr gering, weswegen der Bildkontrast stark angehoben werden mußte um Strukturen deutlich sichtbar zu machen. Aus diesem Grund treten autofluoreszierende Bereiche besonders stark hervor: die parapodialen Drüsen (D), die Borsten (B), die Kieferanlage im linken Teil des Stomodaeums (Ki) sowie ein Auge (A), aber auch der Dotter aller nichtmarkierten terminalen Makromeren (M; die *markierte* terminale C-Makromere tritt aber stärker hervor, siehe Abb. 10c).

Auf Farbstofffluoreszenz rückführbar sind nur wenige Partien. Im Rumpf ist das der Dotter der terminalen C-Makromere (besser zu erkennen auf Abb. 10c, s. u.) und der rechte Teil des Stomodaeums (St). Im Kopf beschränkt sich die Markierung auf die dorsale rechte Seite, wobei ein schmaler, ganz anterior gelegener Sektor rechts der Medianebene ausgespart bleibt (★). Insgesamt reicht die Kopfmarkierung weit nach ventral. Bei einigen markierten Bereichen anterior des Kopfes handelt es sich um ausgetretenes Zellmaterial (X).

Abb. 10c: Projektion aller 118 optischen Einzelschnittbilder (konfokales Rasterlichtmikroskop; Ausdehnung in der z-Achse 60 µm) des auf Abb. 10a und b gezeigten Exemplars. In dieser Darstellung lassen sich einzelne Strukturen teilweise besser erkennen. So sieht man, daß der rechte Bereich der Dottermasse etwas stärker in Erscheinung tritt (M), hier hebt sich der Anteil der terminalen C-Makromere von der Autofluoreszenz des übrigen Dotters ab (auf Abb. 11 läßt sich die Ausdehnung des Dotters der terminalen C-Makromere besser erkennen, da er sich dort vollständig von dem der anderen Makromeren abhebt). Im Gegensatz zu Abb. 10a und b erkennt man in dieser Darstellung nicht nur die Autofluoreszenz der linken, sondern auch der rechten Kieferanlage (Ki) sowie des rechten Augenpaares (A). Weitere gekennzeichnete Strukturen siehe Abb. 10a und b.

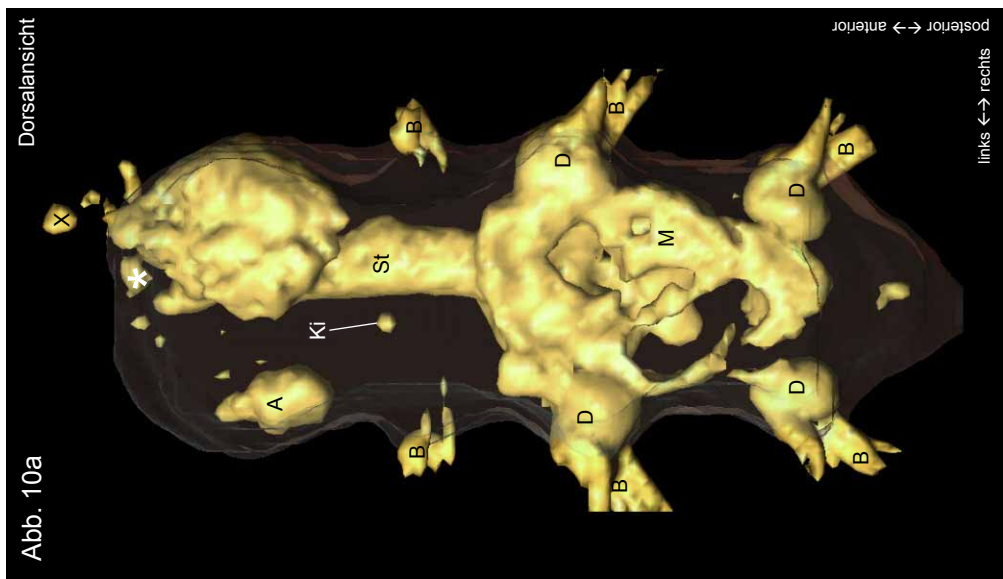
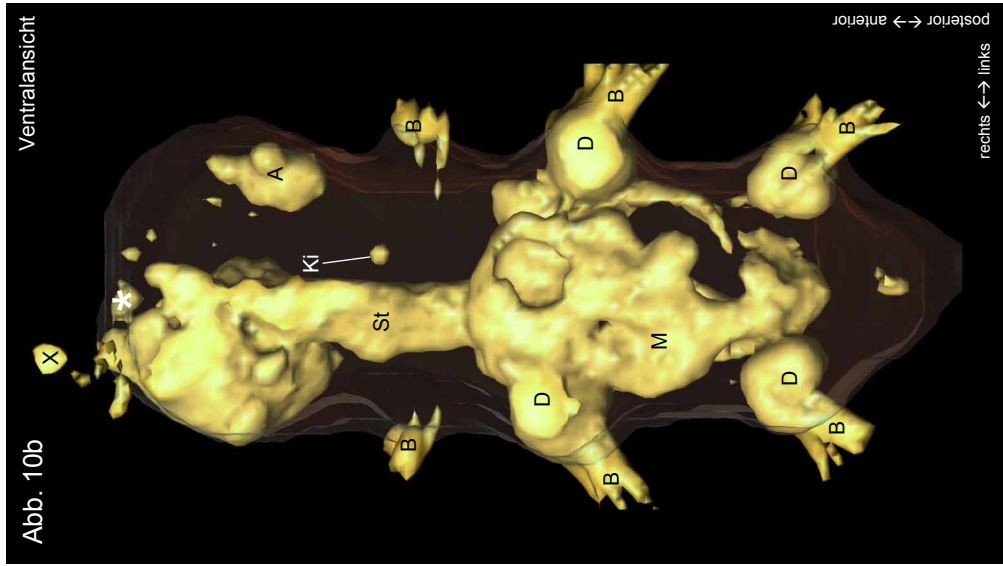
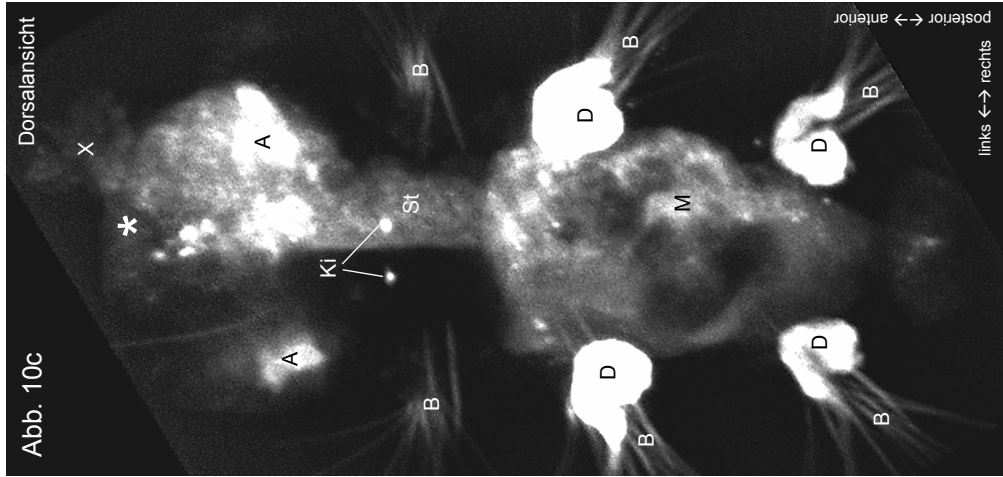


Abb. 11a: Markierungsmuster nach Farbstoffinjektion in die Makromere 1C des Achtzellstadiums. Dreidimensionale Oberflächenansicht der markierten Bereiche in einem drei Tage alten Wurm, überlagert mit den ungefähren Körperumrissen.

Die Autofluoreszenz parapodialer Drüsenzellen dreitägiger Tiere ist noch sehr schwach, weswegen sie in dieser Schwellenwertdarstellungsart, anders als auf Abb. 10a und b (C-Markierung), nicht zu sehen sind. An markierten Strukturen im Rumpf erkennt man zum einen die zerklüftet wirkende terminale Makromere der C-Zelllinie (M) - sie ist in dieser Darstellung scheinbar zweigeteilt, beide Partien sind aber über eine schwach fluoreszierende Brücke miteinander verbunden. Zum anderen zeigt sich die rechte Hälfte des Stomodaeums (St). Rechts-lateral im Kopf bezeichnet (★) eine oberflächlich gelegene, markierte Struktur.

Abb. 11b: Optisches Einzelschnittbild (konfokales Rasterlichtmikroskop) aus der Frontalebene desselben Tieres. Deutlich erkennt man die rechte Hälfte des Stomodaeums (St), das von einer einlagigen Zellhülle umgeben ist, deren rechte Hälfte markiert ist (Pfeile). Bezeichnung weiterer Strukturen siehe Abb. 11a.

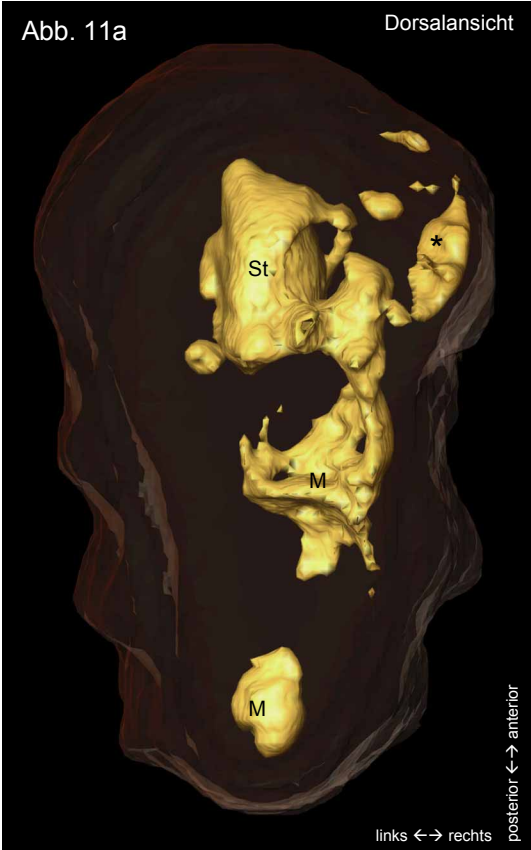


Abb. 12a und b: Markierungsmuster nach Farbstoffinjektion in die Mikromere 1c des Achtzellstadiums. Dreidimensionale Oberflächenansicht der markierten Bereiche in einem drei Tage alten Wurm, überlagert mit den ungefähren Körperumrissen.

Der Rumpf erweist sich unauffällig, lediglich die parapodialen Drüsen (D) sind durch ihre Autofluoreszenz zu erkennen.

Anders die Verhältnisse im Kopf, dessen rechte dorsale Hälfte markiert ist. Die markierten Bereiche greifen aber auch auf die Ventralseite über und zwar anterior-lateral weiter als posterior-lateral. Anterior-median ist ein schmaler Bereich nicht markiert (★).

Abb. 12c: Projektion von 86 optischen Einzelschnittbildern (konfokales Rasterlichtmikroskop; Ausdehnung in der z-Achse 42 µm) des auf Abb. 12a und b gezeigten Exemplars. Durch starke Kontrastanhebung werden Fasern sichtbar (Pfeile), die aus dem Neuropilem (etwa entlang der roten Linie) austreten und beiderseits des Stomodaeums ins Bauchmark übergehen.

Alle weiteren erkennbaren Strukturen des Rumpfes kommen durch Autofluoreszenz zustande (parapodiale Drüsen (D) und die Borsten (B)).

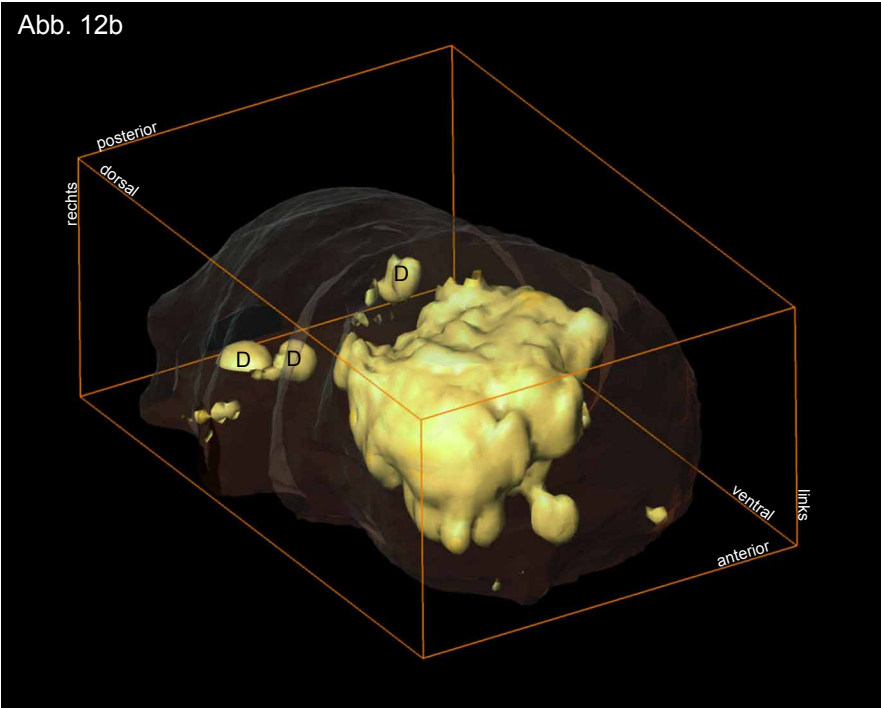
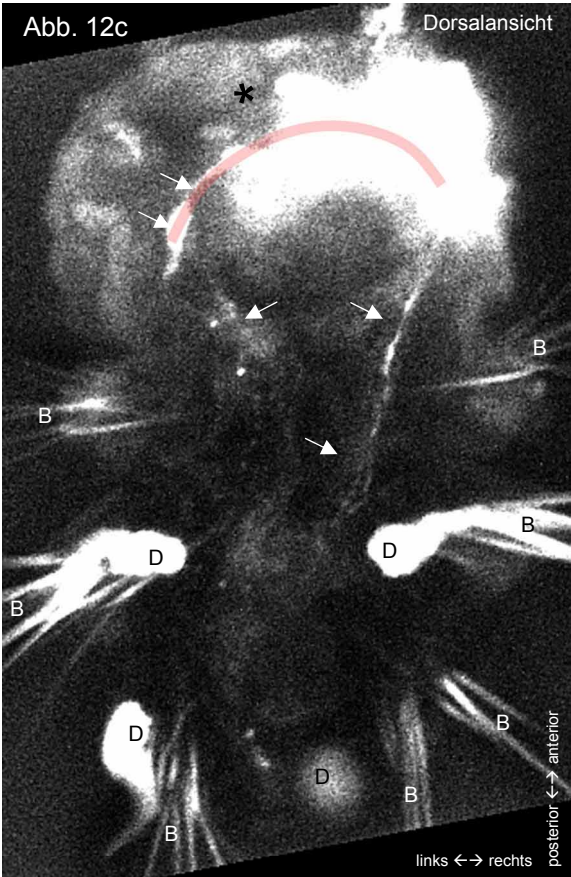
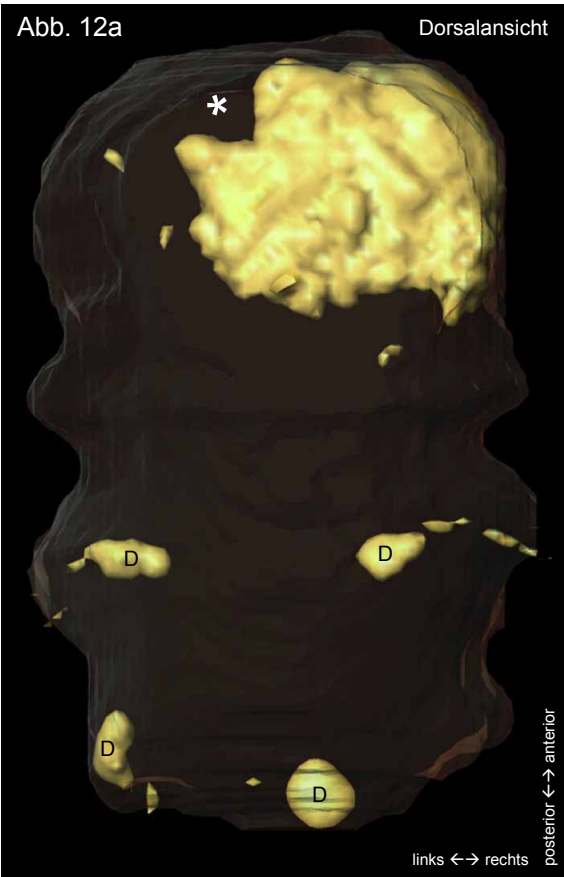


Abb. 13a und b: Markierungsmuster nach Farbstoffinjektion in die Blastomere D des Vierzellstadiums. Dreidimensionale Oberflächenansicht der markierten Bereiche in einem vier Tage alten Wurm, überlagert mit den ungefähren Körperumrissen.

Fast der gesamte Wurmkörper erscheint in der Fluoreszenzansicht, einzig der rechte Teil des Kopfes fehlt. In der Dorsalansicht erkennt man rechts eines der beiden Augenpaare (A), was sich aber auch durch Autofluoreszenz erklären lässt. Posterior ist das Pygidium markiert (Py), anterior endet die Markierung rechtsseitig dorsal an der anterioren Basis des ersten Parapodienpaares, nach ventral hin verschiebt sich diese Grenze weiter nach anterior und liegt etwa auf Höhe vom anterioren Ende des Stomodaeums bzw. der Peristomialzirren (letztere zu erkennen auf Abb. 13c).

Abb. 13c: Optisches Einzelschnittbild (konfokales Rasterlichtmikroskop) etwa aus der Frontalebene des vier Tage alten Wurmes der Abb. 13a und b. Schwach fluoreszierende Strukturen wurden zur besseren Erkennbarkeit digital verstärkt.

Dem umfassenden Markierungsmuster der Oberflächenansicht entsprechend, sind auch im Inneren die meisten Strukturen angefärbt. An ektodermalen Bestandteilen erkennt man neben der umgebenden Epidermis auch die Borstensäcke (Bs) und anterior rechts schwach einen der beiden Peristomialzirren (Pz). Im Entoderm ist die große Masse der terminalen D-Makromere (M) zu sehen. Der nicht markierte Bereich der terminalen Makromeren der A-, B- und C-Zelllinie ist in dieser Darstellung nicht gut auszumachen, da durch die Kontrastverstärkung die Autofluoreszenz ihrer Dotteranteile sichtbar ist. Das Stomodaeum (St), innerhalb dessen die Anlagen der Kiefer (Ki) durch Autofluoreszenz sichtbar sind, zeichnet sich indirekt als nichtmarkierter Bereich ab. Auch die parapodialen Drüsen (D) leuchten, sie zeigen allerdings Autofluoreszenz.

Da sich zwischen entodermalen und ektodermalen Geweben des Rumpfes keine Markierungslücke auftut, müssen dort folglich auch sämtliche mesodermalen Strukturen markiert sein.

Abb. 13d: Einzelschnittbild (konfokales Rasterlichtmikroskop) aus dem ventralen Bereich des vier Tage alten Wurmes der vorhergehenden Abbildungen. Teilweise sind hier auch noch Borstensäcke zu sehen (Bs). Posterior der Markierungslücke des Stomodaeums (St) erkennt man entlang der violetten gestrichelten Doppellinie das Bauchmark.

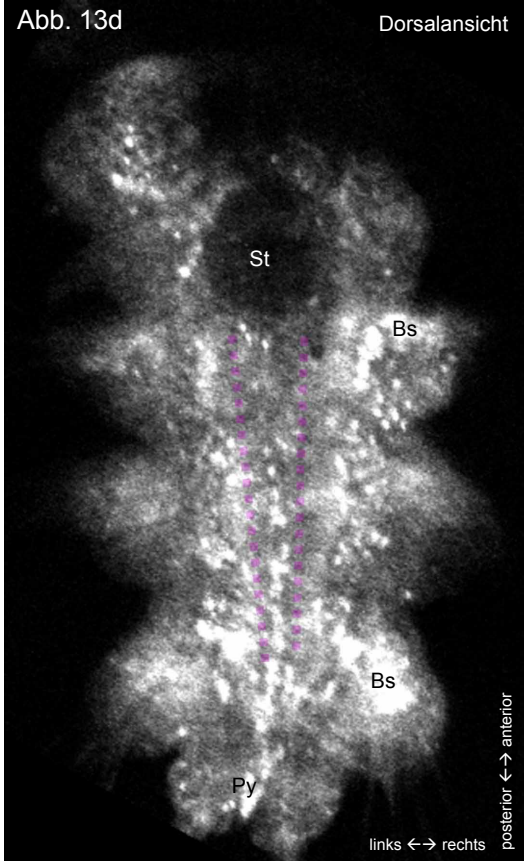
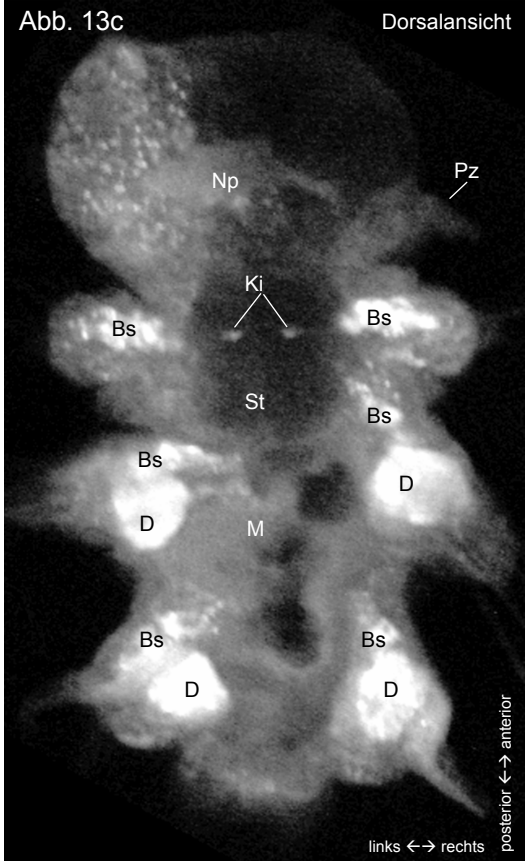
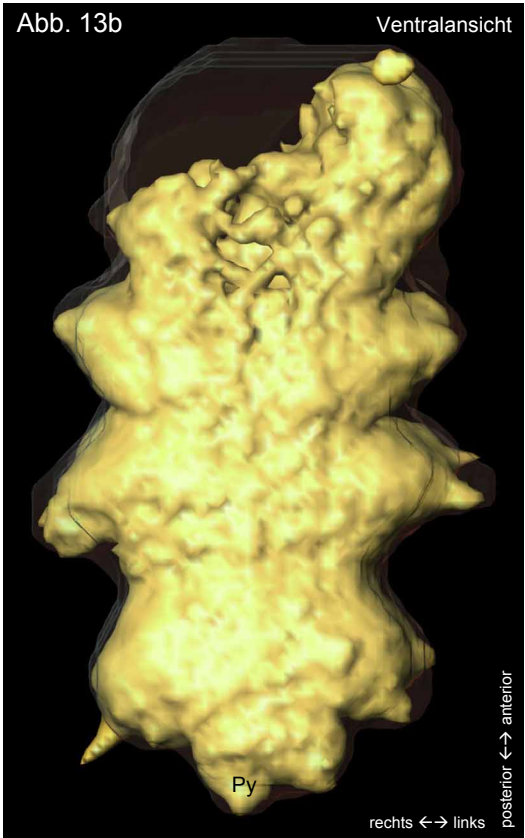


Abb. 14a und b: Markierungsmuster nach Farbstoffinjektion in die Makromere 1D des Achtzellstadiums. Dreidimensionale Oberflächenansicht der markierten Bereiche in einem vier Tage alten Wurm, überlagert mit den ungefähren Körperumrissen.

Fast der gesamte Rumpf des Wurmes ist nach Injektion der Makromere 1D angefärbt. Die Markierung reicht vom posterior gelegenen Pygidium (Py) bis anterior-dorsal an die anteriore Basis des ersten Parapodienpaares; nach ventral hin verschiebt sich die vordere Grenze noch weiter nach anterior und liegt etwa auf Höhe vom anterioren Ende des Stomodaeums bzw. der Peristomialzirren (Pz). In der Dorsalansicht (Abb. 14a) erkennt man die beiden Augen (A), deren Erscheinen sich aber auch durch Autofluoreszenz erklären läßt. Zum Teil treten auch Borsten durch Autofluoreszenz in Erscheinung (B).

Abb. 14c: Optisches Einzelschnittbild (konfokales Rasterlichtmikroskop) aus der Frontalebene des vier Tage alten Wurmes aus den Abb. 14a und b. Schwache Fluoreszenz wurde zur besseren Erkennbarkeit der Strukturen digital verstärkt.

Im Rumpf sind so gut wie alle Strukturen gefärbt. Lediglich Bereiche im Entoderm (M), bei denen es sich um die terminalen Makromeren der A-, B- oder C-Zelllinie handelt (die Grenzen sind hier nicht deutlich sichtbar), und der Raum des Stomodaeums (St) sind davon ausgenommen. Anterior reicht die Markierung bis zu den Peristomialzirren (Pz) bzw. zum Neuropilem (Np).

Im Einschaltbild erkennt man eine Projektion 13 optischer Schnittbilder (konfokales Rasterlichtmikroskop z-Ausdehnung 6,5 µm) aus dem Bereich dorsal des Neuropilems desselben Wurms. Über dem Neuropilem sind muskuläre Strukturen zu erkennen, die nach posterior direkt mit der Rumpfmuskulatur in Verbindung stehen. Die Verbindung selbst ist hier wegen der starken Kontrastanhebung nicht gut zu erkennen, da sie vom markierten Rumpfgewebe überstrahlt wird.

Abb. 14d: Projektion von 30 optischen Schnittbildern (konfokales Rasterlichtmikroskop; Ausdehnung in der z-Achse 15 µm) aus der Frontalebene eines anderen als dem in den obigen Abbildungen gezeigten Wurms. Dieses Exemplar ist nur drei Tage alt, und man erkennt nahe der Borstensäcke (Bs) der beiden hintersten Segmente sehr intensiv fluoreszierende parapodiale Drüsen (D). Andere Präparate zeigten, daß die Autofluoreszenz dieser Drüsen bei dreitägigen Tieren deutlich geringer ist als bei viertägigen. Die außergewöhnlich starke Fluoreszenz der Drüsen nach Injektion in 1D führt zur Annahme, daß es sich hier zusätzlich um Tracerfluoreszenz handelt, zumal die injizierte Farbstoffmenge in diesem Präparat relativ hoch war, die Verstärkung der Signale daher relativ niedrig gehalten werden konnte und sich die relativ schwache Autofluoreszenz somit wahrscheinlich gar nicht abgehoben hätte.

Weiterhin erkennt man, daß der linke Teil einer Hülle von Zellen, die das Stomodaeum umgibt, markiert ist (R). Eine analoge Struktur kann man auch auf dem Datensatz des Tiers von Abb. 13a bis c (D-Blastomere) finden, sie tritt dort aber undeutlich in Erscheinung.

Im Dotter des Entoderms ist keine Markierung wahrnehmbar, da der Farbstoff sich bei der Injektion fast ausschließlich im Cytoplasma verteilt hat. Wegen der hohen Farbstoffkonzentration im Cytoplasma dieses Wurms tritt die geringe Autofluoreszenz des Dotters in der Belichtung praktisch nicht hervor.

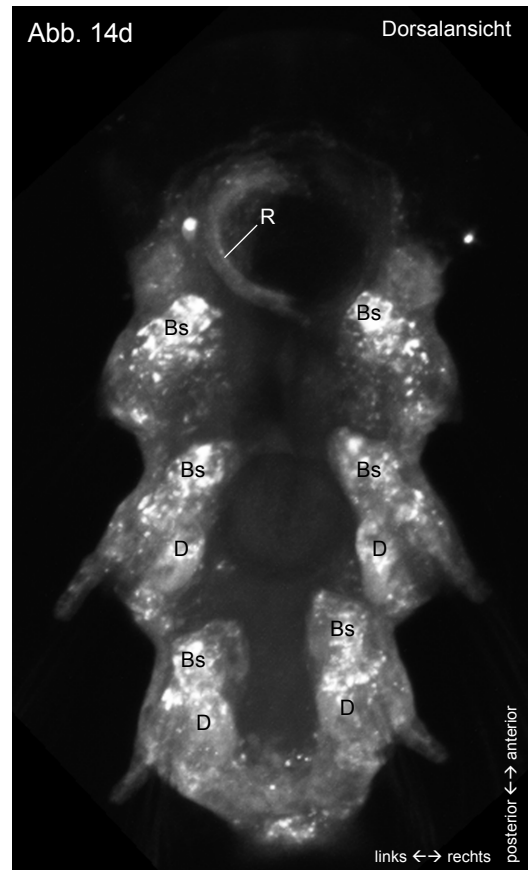
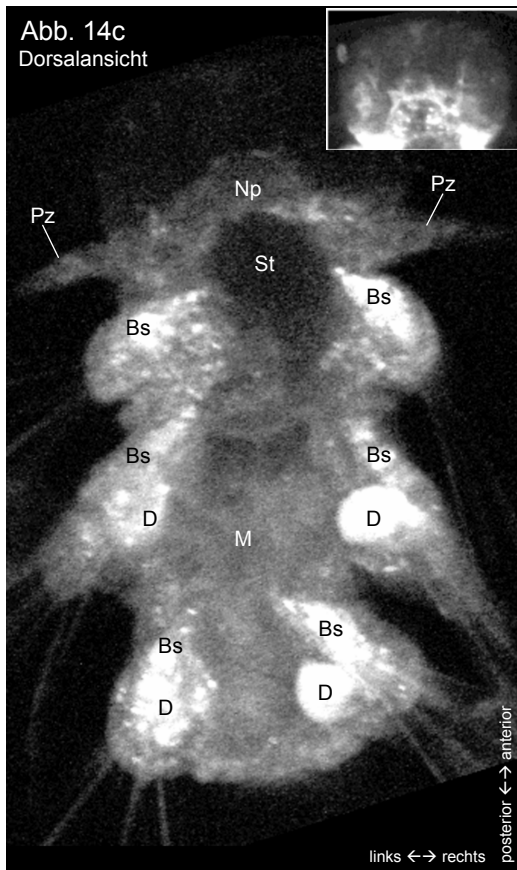
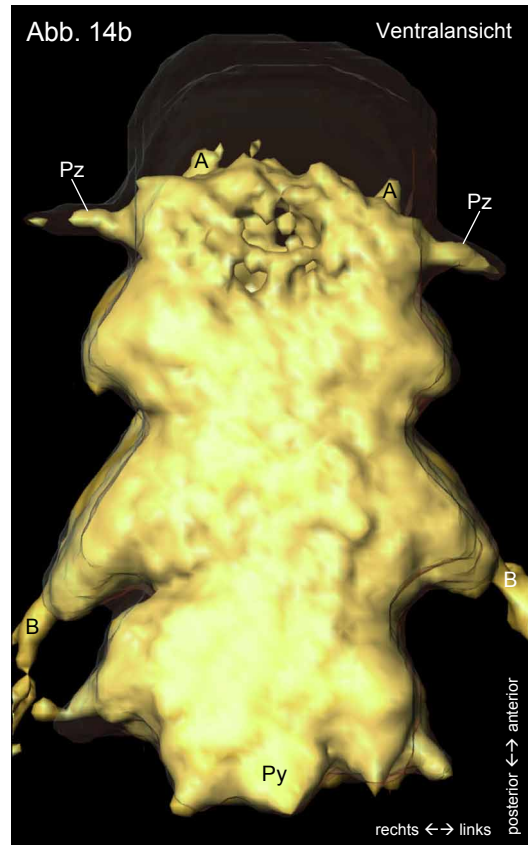
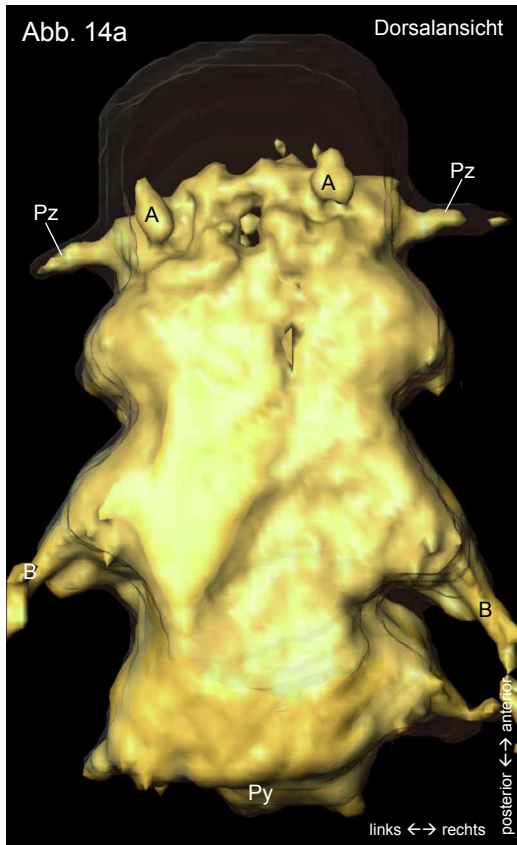


Abb. 15a bis c: Markierungsmuster nach Farbstoffinjektion in die Mikromere 1d des Achtzellstadiums. Dreidimensionale Oberflächenansicht der markierten Bereiche in einem drei Tage alten Wurm, überlagert mit den ungefähren Körperumrissen.

Die Nachkommenschaft von 1d trägt zur Bildung von Gehirn und Epidermis der linken Seite des Kopfes bei. Die Markierung reicht weit nach ventral hinab, am weitesten lateral anterior. Im anterior-medianen Bereich erreicht die Markierung nicht ganz die Medianebene, hier bleibt eine Lücke ausgespart (★). Posterior dorsal schließt der markierte Bereich mit drei großen Zellen ab, die an analoger Stelle zu cilientragenden Zellen des Prototrochs liegen (blaue Linie auf Abb. 15a und c). Im Rumpf sind in dieser Schwellenwertdarstellung keinerlei Strukturen auszumachen.

Abb. 15d: Projektion von 100 optischen Schnittbildern (konfokales Rasterlichtmikroskop; Ausdehnung in der z-Achse 42 µm) aus dem ventralen Bereich eines anderen als dem auf den Abb. 15a bis c gezeigten Wurm. Er wurde im Alter von vier Tagen fixiert. Durch die verwendete Projektionstechnik wurden auch noch feinste Strukturen sichtbar gemacht, die bei normaler Ansicht des Bildmaterials gar nicht in Erscheinung treten, darunter natürlich auch autofluoreszierende.

Neben der Markierung im linken Teil des Kopfes, erkennt man auf diesem Bild zahlreiche Strukturen, die alleine durch Autofluoreszenz sichtbar sind, nämlich die parapodialen Drüsen (D), die Borsten der Parapodien (B) sowie ganz posterior das Farbpigment des Pygidiums (Py). Daneben sind aber auch farbstoffmarkierte Fasern zu erkennen, die dem Neuropilem (Np) entspringen und nach beiderseitigem Umlaufen des Stomodaeums in die beiden Stränge des Bauchmarks (Bm) übergehen.

Abb. 15e: Rechter Teil eines einzelnen optischen Schnittes aus dem ventralen Bereich desselben Präparats wie auf Abb. 15d. Neben dem Bauchmark (Bm) verläuft an der rechten Körperperipherie eine lineare Struktur (Pfeile), die mit dem rechten Teil des Schlundkonnectivs verbunden ist. Auf der linken Seite (nicht dargestellt) ist keine analoge Markierung zu finden.

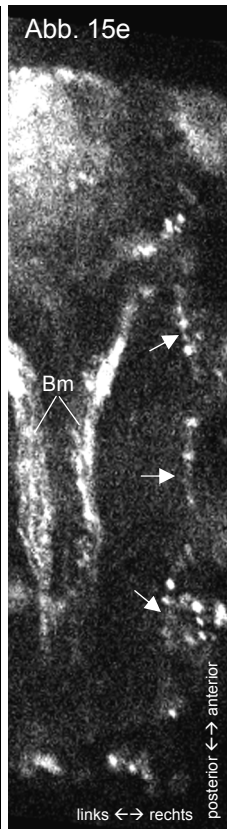
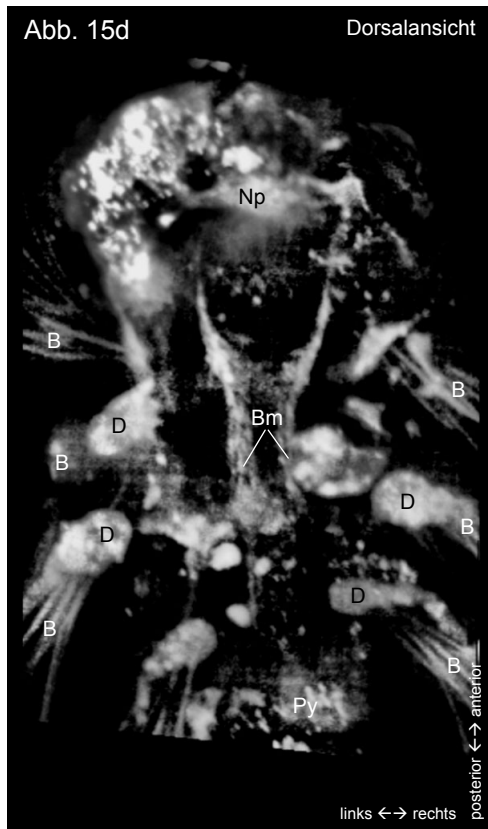
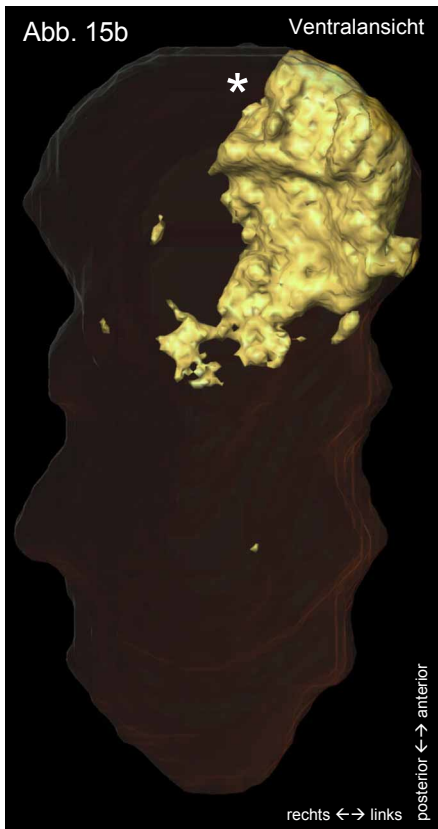
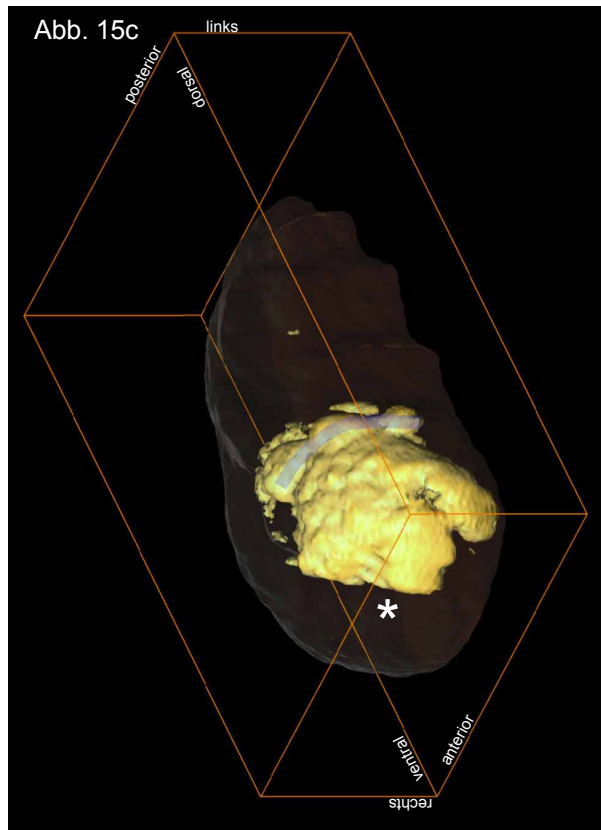
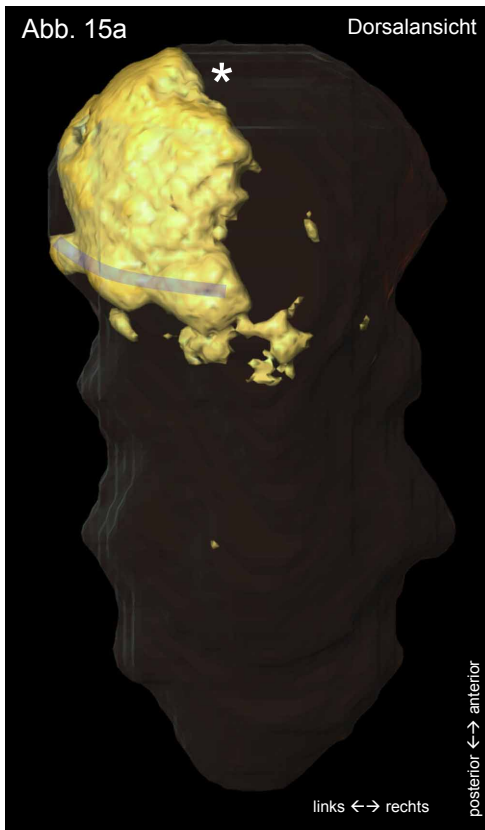


Abb. 16a und b: Markierungsmuster nach Farbstoffinjektion in die Mikromere 4d. Dreidimensionale Oberflächenansicht der markierten Bereiche in einem drei Tage alten Wurm, überlagert mit den ungefähren Körperumrissen.

Man erkennt die Lage der markierten Strukturen zwischen einem inneren, nicht markierten Bereich, dem Entoderm, und einer peripheren, nicht markierten Domäne, dem Ektoderm (die Markierung berührt die Körperkontur nicht). Die anteriore Grenze des Musters liegt bei einem Ring, der das selbst nicht markierte Stomodaeum (St) umfaßt, die posteriore Grenze vor dem Pygidium (Py), am Übergang zum Mitteldarm. In der Dorsalansicht ist das Mesoderm nicht geschlossen, was allerdings eine Folge der Beobachtungsgeometrie sein könnte: bei der Aufnahme der Bilder im konfokalen Rasterlichtmikroskop lag der Wurm mit der Dorsalseite nach unten. Eine schwache Fluoreszenz der Dorsalseite könnte durch Absorption ausgelöscht worden sein.

Abb. 16c: Projektion aller 178 optischen Schnittbilder (konfokales Rasterlichtmikroskop; Ausdehnung in der z-Achse 76 μm) desselben 4d-markierten Wurms der Abb. 16a und b.

Durch die Transparenz dieser Darstellungsweise werden die inneren Verhältnisse gegenüber der Oberflächenansicht verdeutlicht. Insbesondere treten nun die ektodermalen Borstensäcke (Bs) als nicht gefärbte Strukturen in Erscheinung. Auch die anteriore Grenze die von ringförmig das Stomodaeum umgebender Muskulatur gebildet wird, ist hier klarer zu erkennen, ebenso wie das Fehlen deutlicher Markierungen im Kopf. Py = Pygidium, dessen Pigmentierung durch Autofluoreszenz in Erscheinung tritt.

Abb. 16d: Überlagerung 6 optischer Schnittbilder (konfokales Rasterlichtmikroskop; Ausdehnung in der z-Achse 2,5 μm) des 4d-markierten Wurms der vorhergehenden Abbildungen. Der Stapel gibt aber nur einen schmalen Bereich, etwas ventral von der mittleren Frontalebene gelegen, wieder. Die einzelnen in den obigen Abbildungen erwähnten Strukturen treten hier z.T. klarer in Erscheinung, insbesondere erkennt man feine Fasern im Kopf (Pfeile), bei denen es sich um Muskelfasern handeln könnte. Bs = Borstensäcke.

Abb. 16e: Markierungsmuster nach Farbstoffinjektion in die Mikromere 4d bei einer 24 h alten Trochophora. Dreidimensionale Oberflächenansicht der markierten Bereiche, überlagert mit der Hintergrundfluoreszenz des Keimes.

Das Mesoderm stellt sich in der Trochophora als hufeisenförmiges, zweiästiges Gebilde dar, wobei der Punkt, an dem sich die beiden Äste berühren (★) dem posterioren Pol entspricht. Von dort aus ragen die beiden Äste lateral nach anterior hoch, um auf Höhe des Prototrochs zu enden. (X) markiert die ungefähre Lage der Öffnung des Stomodaeums, auf halber Strecke zwischen dem posterioren Pol und dem Prototroch (blaue Linie).

Abb. 16f: Ein weiteres Markierungsmuster nach Farbstoffinjektion in die Mikromere 4d bei einer anderen 24 h alten Trochophora, als der aus Abb. 16e, überlagert mit der Hintergrundfluoreszenz des Keimes.

In diesem Fall stand 4d zum Zeitpunkt der Injektion kurz vor ihrer Teilung wobei der Farbstoff von der Seite der späteren Blastomere $4d^1$ injiziert wurde. Bis zur Teilung konnte sich das TRITC-Dextran nicht mehr homogen im Cytoplasma verteilen, so daß $4d^1$ mehr Farbstoff erhielt als $4d^2$. Man erkennt auf dem Bild, daß aus diesen beiden Blastomeren jeweils ein Mesodermband hervorgegangen ist. Die blaue Linie gibt den ungefähren Verlauf des Prototrochs wieder, (X) die ungefähre Lage der Mundöffnung des Stomodaeums. An der Berührungsstelle der beiden Mesodermbänder liegt ventral ein Zellklumpen an, der sich durch eine besonders starke Fluoreszenz abhebt (grauer Kreis), sichtbar ist das in dieser Darstellung nur auf Seite der $4d^1$ -Nachkommen. Beachte auch, daß die ektodermalen Zellen, die den Mesodermbändern anliegen, in unterschiedlichem Maße selbst Fluoreszenzfarbstoff zu enthalten scheinen. Das ist besonders gut im Ektoderm das dem stark markierten Band der $4d^1$ -Nachkommen benachbart ist zu erkennen.

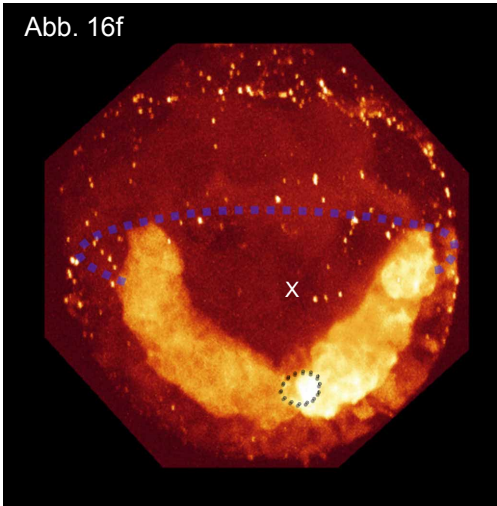
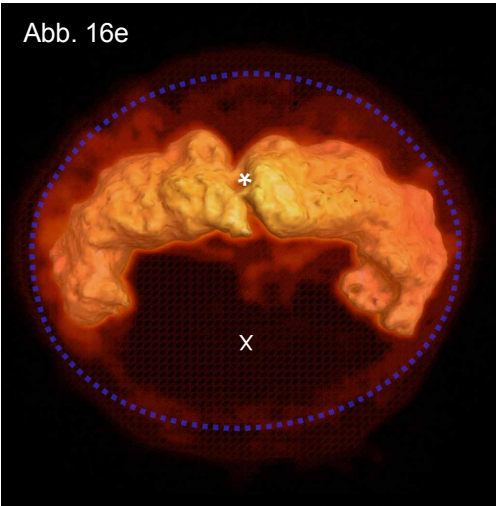
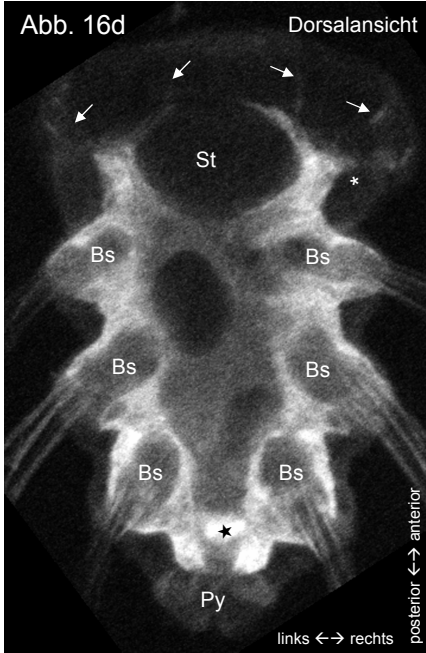
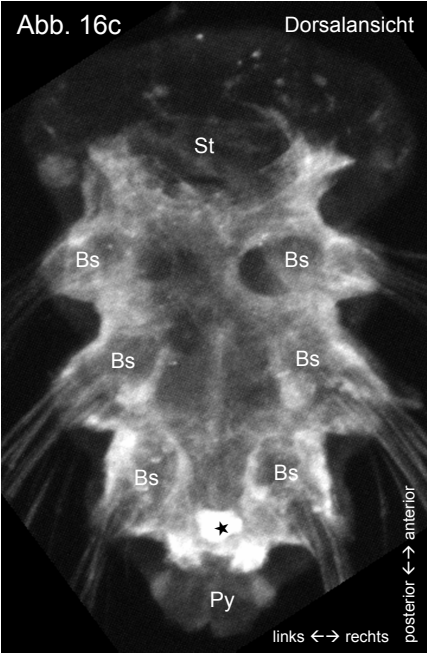
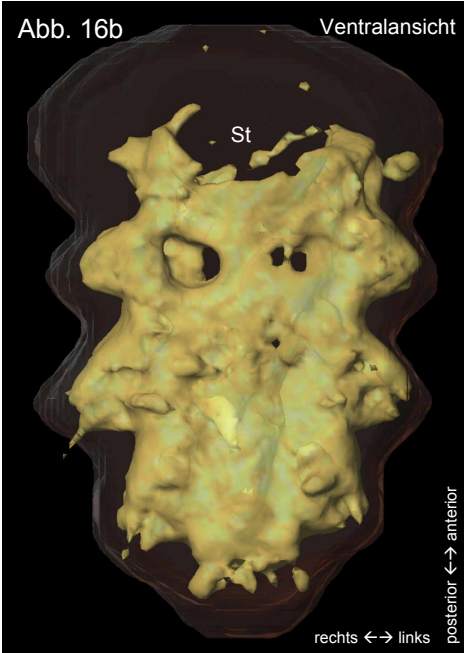


Abb. 17a: Volume Rendering des Musters einer 24 h alten Trochophora nach Markierung der Blastomere D im Vierzellstadium. Alle Bilder dieser Aufnahmeserie mit dem konfokalen Rasterlichtmikroskop wurden dazu verwendet (Ausdehnung in z-Achse 130 μm). Weil die Farbstoffkonzentration hier besonders hoch war, konnte das Rasterlichtmikroskop auch noch tiefgelegene Strukturen abbilden. Blick von schräg links auf die Ventralseite. Die blaue Linie zeigt den Verlauf des Prototrochs an. Oberhalb des Prototrochs befindet sich die Episphäre, in der lediglich der dorsal-linke Bereich markiert ist. Im Gegensatz dazu ist praktisch die gesamte Hyposphäre, unterhalb des Prototrochs gefärbt. Die einzige Ausnahme stellt den Bereich dar, in dem das Stomodaeum die Oberfläche berührt, das Stomodaeum ist durch den grün umrandeten Ring angedeutet. Aus der Hyposphäre geht im Wurm der Rumpf hervor, aus der Episphäre entsteht der Kopf.

Abb. 17b: Volume Rendering des Musters nach Markierung der Blastomere $2d^{112}$ in der 24 h alten Trochophora. Projektion aller optischen Schnittbilder nach der Aufnahme mit dem konfokalen Rasterlichtmikroskop. Blick direkt von anterior (animal) auf die Hyposphäre. Alle sichtbaren Bereiche gehören also der Innenseite des Ektoderms der Hyposphäre an. Während aus $2d$ das gesamte Ektoderm der Hyposphäre gebildet wird, fehlen hier bereits alle Anteile der Zellen, die sich von $2d$ zum Zeitpunkt der Injektion bereits abgespalten hatten. Wie in der Diskussion begründet wird (Seite 103), spricht einiges dafür, daß die gestrichelt gelb umrandeten Bereiche von $2d^2$ und $2d^{12}$ gebildet werden und das gestrichelt grün umrandete Areal von $2d^{111}$. Das grüne Oval bezeichnet die Lage des Stomodaeums (St) und der blaue Kreis gibt die Position des Prototrochs wieder. (★) zeigt die Lage des posterioren Pols an. Die grau gestrichelte Linie entspricht der Medianebene.

Abb. 17c: Optisches Einzelschnittbild (konfokales Rasterlichtmikroskop), einer 24 h alten Trochophora, nachdem die Mikromere $2d$ des 16-Zellstadiums injiziert worden war, überlagert mit einer DIK-Aufnahme der Larve.

Die Anordnung der Lipidtropfen in der Trochophora weist die einzelnen Quadranten aus (A, B, C und D). Der Blick richtet sich in dieser Ansicht auf die terminale D-Makromere, also auf die Dorsalseite. Die von $2d$ gebildete Hyposphäre dieses Keimes ist relativ zur Episphäre zu klein und zwar nicht nur auf diesem Einzelbild sondern durchgängig. Man kann also annehmen, daß die Umwachsung des vegetalen Abschnitts durch $2d$ nur unzureichend erfolgt ist. Der markierte Bereich ist an seinen Flanken einschichtig, zur Medianebene hin (Pfeil) aber mehrschichtig. Hier hat sich die Ventralplatte gebildet, aus der das Bauchmark hervorgeht. Bei den nach innen ragenden Wülsten könnte es sich um die ersten Anzeichen der Bildung der Borstensäcke handeln.

Abb. 17d: Einzelnes optisches Schnittbild (konfokales Rasterlichtmikroskop) einer 24 h alten Trochophora nach Markierung der Mikromere $1d$ im Achtzellstadium. Der Keim wurde beim Hantieren zerquetscht. Die Pfeile weisen auf eine Struktur, die an die Kopfnieren von *N. succinea* erinnert, die WILSON beschrieb. Diese soll aus zwei Zellen bestehen, die sich von den Mikromeren $1d$ und $1c$ ableiten. Soweit WILSON ihre Entwicklung verfolgen konnte, teilte sich keine dieser beiden Zellen. Die hier abgebildete Struktur erweckt allerdings den Eindruck, Multizellulär zu sein, da es sich bei den dunklen Flecken, auf welche die Pfeile weisen, um Zellkerne handeln könnte.

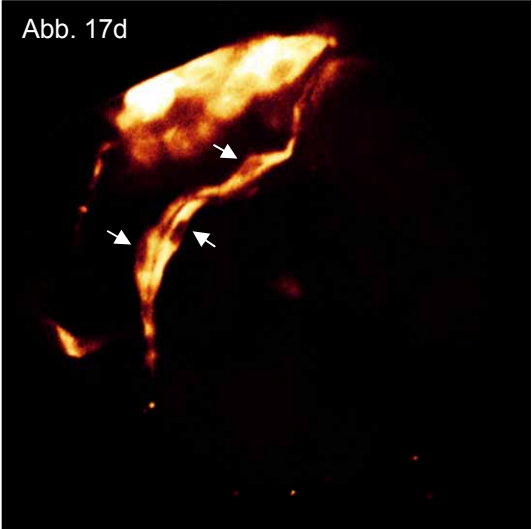
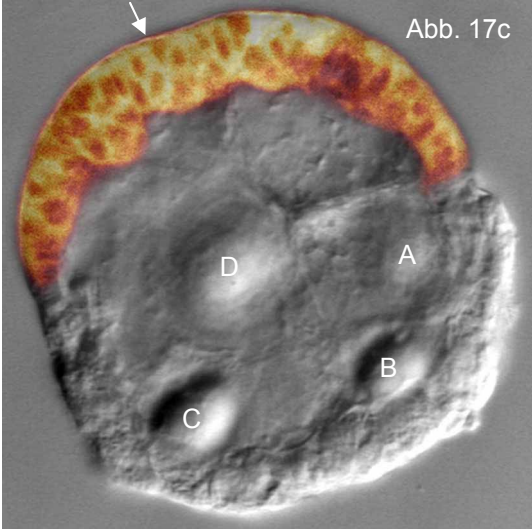
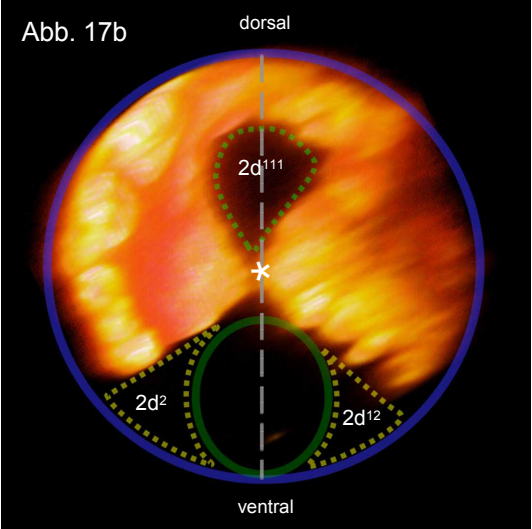
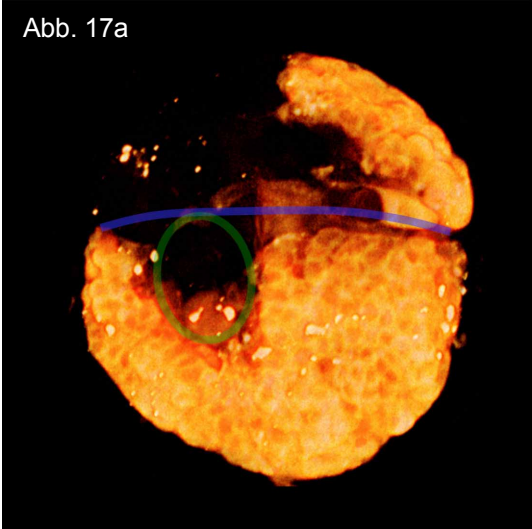


Abb. 18a: Gerenderte Oberflächenansicht eines viertägigen unbehandelten Jungwurms. Zugrunde lag die mechanische Schnittserie eines fixierten Wurmes. Die etwa 100 Schnitte wurden mit dem Durchlichtmikroskop digital photographiert, mit Adobe Photoshop räumlich zur Deckung gebracht und damit auch dreidimensional rekonstruiert. Dieser Bildstapel wurde dann mit dem Programm Amira zu einer dreidimensionalen Oberflächenansicht des Tieres verarbeitet. Die Oberfläche wurde zuletzt mit Adobe Photoshop eingefärbt um in unterschiedlichen Farben alle die Oberfläche erreichenden Markierungsdomänen derjenigen Blastomeren darzustellen, die in dieser Arbeit untersucht wurden (z. T. handelt es sich um abgeleitete Resultate, siehe Diskussion). Die Zuordnung zu den einzelnen Blastomeren zeigt die einkopierte Farbtabelle. Beachte, daß sich die genauen Grenzen der Markierungsfelder nicht eindeutig bestimmen ließen und diese Abbildung daher eine Idealisierung darstellt.

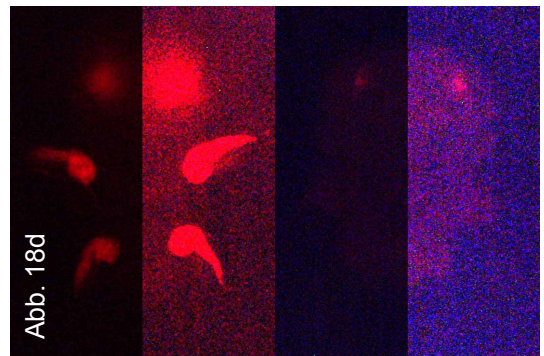
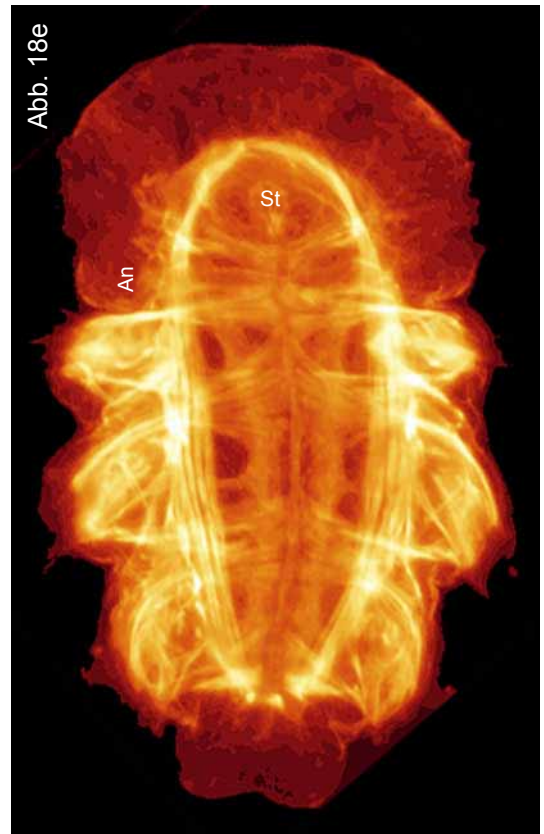
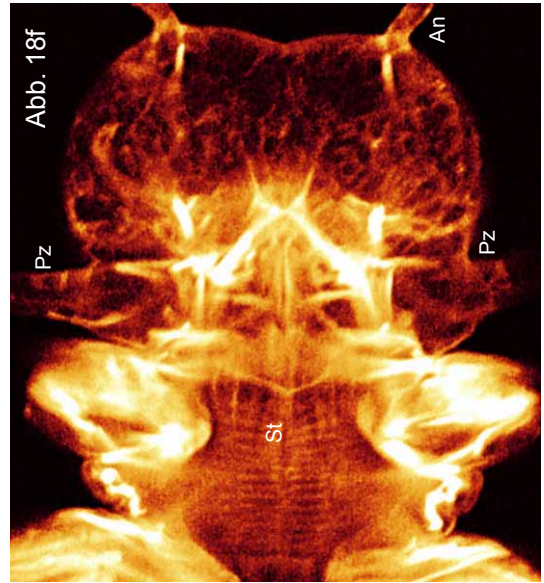
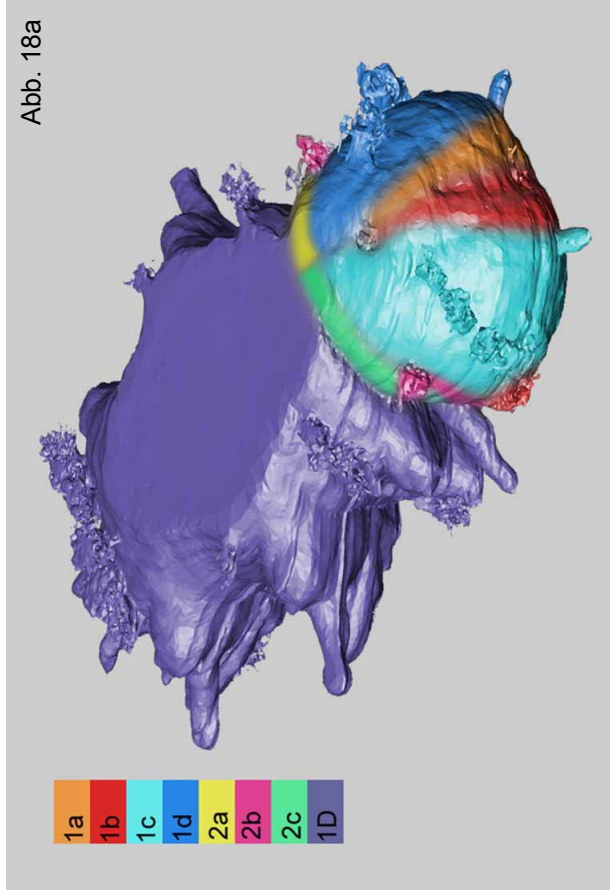
Abb. 18b und c: DIK-Aufnahmen eines dreitägigen (Abb. 18b) und eines viertägigen (Abb. 18c) Wurmes. Ansicht jeweils von dorsal. Das Augenpigment des dreitägigen Exemplars ist durch die Fixierung ausgebleicht. Größenmaßstab 50 µm (gültig für beide Abbildungen). A = Auge, An = Antenne, D = parapodiale Drüsen, L = Lipidtropfen, M = dottererfüllter Mitteldarm, Pz = Peristomialzirren, St = Stomodaeum, U = Uriten am Pygidium.

Abb. 18d: Autofluoreszenz eines viertägigen (oben) und eines dreitägigen (unten) Wurmes bei TRITC-Anregung im Epifluoreszenzmikroskop. Beide Aufnahmen sind zweigeteilt, in der jeweils unteren Bildhälfte wurde der Kontrast digital so weit als möglich verstärkt, um die Konturen der Tiere darzustellen.

Abb. 18e: Projektion aller optischen Einzelschnittbilder (konfokales Rasterlichtmikroskop; Ausdehnung in der z-Achse 80 µm) eines drei Tage alten Wurms nach Markierung des F-Actingerüstes mit Phalloidin-Texas Red.

Das Bauchmark erscheint im Rumpf als zweigeteiltes Band. Im Stomodaeum (St) lassen sich noch keine der transversal und sagittal verlaufenden Muskeln finden, die im viertägigen Tier (Abb. 18f) ausgebildet sind.

Abb. 18f: Projektion von vier optischen Schnittbildern (konfokales Rasterlichtmikroskop; Ausdehnung in der z-Achse 3,3 µm) eines vier Tage alten Wurmes nach Markierung des F-Actingerüstes mit Phalloidin-Texas Red. Dargestellt ist der anteriore Teil des Rumpfes sowie der Kopf. A = Antennen, Pz = Peristomialzirren. Das Stomodaeum (St) ist von regelmäßig angeordneten, transversal und sagittal verlaufenden Muskeln überzogen.



4. Diskussion

1892 publizierte E. B. WILSON seine berühmte, auf Beobachtung beruhende Arbeit über die Frühentwicklung des Polychaeten *Neanthes succinea* und ergänzte diese durch Befunde an *Platynereis megalops*. 1898 präzierte WILSON seine Beobachtungen noch um einige Punkte. DORRESTEIJN (1990a, 1987) fand bei seinen Studien an *Platynereis dumerillii* mittels modernerer Differentialinterferenz- und Videozeitrafferlichtmikroskopie eine hohe Übereinstimmung mit der Frühentwicklung von *Neanthes*: die Keime beider Spezies ähneln sich in der Größe; (*Neanthes* ca. 140 μm , *Platynereis* ca. 160 μm), sind relativ dotterreich und die Gastrulation erfolgt epibolisch⁹. Die einzelnen Furchungsschritte verlaufen bei beiden Spezies mit äußerster Konstanz, wobei die Zellteilungen ab dem 16-Zellstadium deutlich asynchron werden. Die Frühentwicklung der beiden Arten unterscheidet sich am gravierendsten darin, daß bei *N. succinea* die Makromeren 3A bis 3C ihre Teilungsaktivität nach der fünften Furchungsrunde einstellen und nur 3D einen weiteren Zellzyklus vollendet, der zur Bildung der Mikromere 4d führt (WILSON 1898). Bei *Platynereis* dagegen durchlaufen alle Makromeren 3A bis 3D einen sechsten Furchungszyklus, aus dem ein vollständiges Quartett von Mikromeren (4a bis 4d) und Makromeren (4A bis 4D) hervorgeht. Auch bei der Organogenese fand sich bislang kein erkennbarer Unterschied zu *Platynereis*.

Wegen der zunehmenden Bedeutung molekular- und evolutionsbiologischer Forschung an Spiralerkeimen sind heute dringend gesicherte Erkenntnisse über den Verlauf der Frühentwicklung speziell von Polychaeten, insbesondere von *Platynereis* erforderlich. Da ich eine Methode gefunden hatte, die zähe Vitellinhülle von *Platynereis* chemisch aufzuweichen und den Keim damit der Injektionstechnik zugänglich zu machen, war der Weg für eine Cell-lineage-Studie durch Fluoreszenzmarkierung von Blastomeren an diesem Organismus bereitet. Ich habe dabei alle Furchungszellen des Zwei-, Vier- und Achtzellstadiums, die Blastomere 2d, Abkömmlinge von 2d sowie den Mesentoblasten, die Zelle 4d

⁹ Ohne Ausbildung eines Blastocoels, wie es typisch für dotterreiche Polychaetenkeime ist (ANDERSON 1966).

injiziert und die Markierung bis zur Entwicklungsstufe drei- und viertägiger, dreisegmentiger Jungwürmer untersucht.

In der nachfolgenden Diskussion werde ich die einzelnen Ergebnisse der Injektionen in gegenseitigen Kontext setzen und mit den Befunden von E. B. WILSON und A. W. C. DORRESTEIJN an *Neanthes succinea* bzw. *Platynereis dumerilii* vergleichen, deren frühe Entwicklungsabläufe ich aus obengenannten Gründen hier als identisch annehme. Es ist davon auszugehen, daß Abweichungen zu WILSONS Befunden daher rühren, daß seine Beobachtungsmethode bei späteren Stadien mit ihren zahlreichen, kleinen Blastomeren an ihre Grenzen stieß¹⁰.

Nach einer kurzen Einführung über die Orientierung der Keime und die grundlegende räumliche Anordnung der Markierungsdomänen werden die Befunde am D-Quadranten besprochen, der in der Spiralierentwicklung eine entscheidende Rolle spielt, gefolgt von den Ergebnissen zur Herkunft des gesamten Mesoderms. In mehrere Abschnitte gliedert sich dann die Diskussion über den Aufbau des Kopfes und einzelner Strukturen, die diesen bilden. Nach einer Zusammenfassung über die Erkenntnisse zur Herkunft des Nervensystems steht dann eine Erörterung der Schicksale der Zellen des Urmundrandes. Dabei wird der Versuch unternommen, Strukturen im Jungwurm von *Platynereis* auf Klone von Blastomeren zurückzuführen, die nicht individuell markiert werden konnten.

4.1. Orientierung

Während die Orientierung im dreisegmentigen Wurm unmittelbar einsichtig ist, muß sie für die Trochophora definiert werden, um Verwirrungen zu vermeiden (siehe auch Fig. 1, Seite 17). Ich halte mich hier an das räumliche Bezugssystem, wie es VON WISTINGHAUSEN (1891) für *Platynereis massiliensis* gewählt hat. Demnach liegt das Stomodaeum median-ventral und die gegenüberliegende Unterbrechung des Prototrochs median-dorsal. Senkrecht dazu steht die anteroposteriore Achse, die zentral die Episphäre (anterior) und zentral die Hyposphäre (posterior) durchstößt. WILSON (1892) setzte die Achsen anders, nachdem er

¹⁰ Natürlich können Beobachtungen, die denen WILSONS widersprechen seine Befunde nicht zwangsläufig widerlegen, da es sich immerhin um zwei verschiedene Spezies handelt.

festgestellt hatte, daß die Trochophora noch gar keine eigentliche Dorsalseite besitzt, da diese erst durch Zellumlagerungen im Verlauf der Streckung der Larve zum Wurm entsteht, wodurch es zu einer Verlagerung der Achsen kommt. Wenngleich das VON WISTINGHAUSENSCHE Orientierungssystem den tatsächlichen Gegebenheiten also nur unzureichend Rechnung trägt, so ist es für den Leser doch nachvollziehbarer.

4.2. Symmetrieverhältnisse im *Platynereis*-Embryo

In der Literatur wird darauf hingewiesen, daß das Lehrbuchschema, wonach im Spiralerkeim der A-Quadrant zu links gelegen, der B-Quadrant zu ventralen, der C-Quadrant zu rechts gelegen und der D-Quadrant zu dorsalen Strukturen führt, eine grobe Vereinfachung darstellt (HENRY und MARTINDALE 1998, 1999; BOYER et al. 1998; RENDER 1997). Ein Grund dafür ist, daß die Mikromeren durch die Spiralfurchung gegenüber den Makromeren seitlich versetzt werden. Auch wenn man für *Platynereis* die Lage der Makromeren als räumliches Bezugssystem wählt, gelten die „Lehrbuchverhältnisse“ nur ungefähr. Denn die terminalen Makromeren sind in Folge der extrem inäqualen Teilungen von stark unterschiedlicher Größe, ihre Volumina entsprechen etwa dem Volumenanteil am Dotter des jeweiligen Quadranten (A: 7%, B: 9,5%, C: 14,7%, D: 26,6%; DORRESTEIJN 1990a). Dieses Ungleichgewicht der Größen bedingt, daß sich die terminalen Makromeren nicht in eine geometrisch genaue Anordnung links – ventral – rechts – dorsal bringen lassen. Und auch die isolierte Aussage „D = dorsal“ läßt sich für *Platynereis* in gewisser Weise gar nicht eindeutig treffen, denn der D-Quadrant macht entsprechend seinem überragenden Anteil am Volumen des vierzelligen Keimes einen Großteil der larvalen Zellen und derjenigen des Jungwurms aus. Das hat zur Folge, daß im Gegensatz zu äqual furchenden Spiraliern der D-Quadrant von *Platynereis* sowohl in der Trochophora, als auch im Jungwurm keinen dorsalen Charakter mehr erkennen läßt, da seine dominierenden Zellen, 2d und 4d, bilateralsymmetrisch fast den gesamten Rumpf bilden.

Nur die Mikromeren des ersten Quartetts, die ausschließlich zur Bildung des Kopfes beitragen, lassen sich einem räumlich klaren Muster zuordnen: 1a bildet die ventral links gelegene Domäne, 1b das rechte Gegenstück, 1c die dorsale rechte und 1d die dorsale linke Hälfte (Abb. 6a, Abb. 9a, Abb. 12a, Abb. 15a).

1a und 1b sowie 1c und 1d bauen als bilateralsymmetrisch angeordnete Paare den größten Teil des Kopfes auf. Gleichzeitig geht aus der Makromere 1D praktisch der gesamte Rumpf in bilateralsymmetrischer Weise hervor. Im Prinzip könnte man sagen, daß diese fünf Zellen die Bilateralsymmetrie des Tieres schon vorweggenommen haben, nur, daß die Mikromeren anfangs noch etwas gegen die Makromere versetzt sind und eine allumfassende Bilateralität nach strikt geometrischen Maßstäben erst zu einem späteren Zeitpunkt erreicht wird.

Der Beitrag aller anderen Blastomeren zum Aufbau des Tieres ist dagegen sehr gering: Ein Keim von *Platynereis* besteht zu 40 % aus klarem Cytoplasma, die restlichen 60 % gehen als Dotter in die Bildung des Darmes ein und sollen hier ausgeklammert werden. Der Anteil klaren Cytoplasmas des Tieres in den fünf Blastomeren 1a – 1d und 1D alleine beträgt nun bereits etwa 35 % am Gesamtvolumen so daß auf die Mikromeren des zweiten, dritten und vierten Quartetts der Quadranten A bis C lediglich 5 % des Gesamtvolumens entfallen. Aus dieser Überschlagsrechnung läßt sich ableiten, daß diese Zellen ganz offensichtlich nur geringe Anteile am Aufbau des Organismus haben können.

Weil die Mikromeren des zweiten bis vierten Quartetts (außer 2d und 4d) nicht einzeln markiert werden konnten, läßt sich ihre räumliche Anordnung auch nicht diskret beschreiben. Allerdings kann man gewisse Rückschlüsse über ihre räumliche Anordnung aus der Markierung ihrer Vorläuferzellen, den Makromeren 1A bis 1D ziehen, wie im Abschnitt 4.10 dargelegt wird. Da die Mikromeren des zweiten Quartetts laeotrop abgegeben werden, könnte man nach dem Lehrbuchschema der Spiralerentwicklung erwarten, daß 2a links lateral gelegene Strukturen markiert, 2b ventrale, 2c rechts lateral gelegene und 2d dorsale. Für das dritte Quartett ergäbe sich nach erneuter dexiotroper Teilung wieder eine Anordnung analog zum ersten Quartett (3a = links ventral, 3b = rechts ventral, 3c = rechts dorsal und 3d = links dorsal) und für das vierte Quartett wiederum eine solche analog zum zweiten Quartett. Ein Blick auf die Fig. 1D und G (Seite 17) zeigt, daß die Verhältnisse bei *Platynereis* anders sind. Das Lehrbuchschema orientiert sich also ganz offensichtlich an äqual furchenden Keimen und berücksichtigt dabei auch keine Zellwanderungen. Solche Prozesse müssen bei *Platynereis* aber stattfinden, denn im jungen Wurm weicht die Anordnung der Markierungsdomänen einzelner Vorläuferzellen deutlich von ihrer Lage im

Frühkeim (Fig. 1D und G, Seite 17) ab: im A-Quadranten finden sich nach Injektion in 1A auf der linken Seite zwar isolierte Markierungen, der überwiegende Teil ist aber bilateralsymmetrisch angeordnet (Abb. 5a bis c). Der B-Quadrant zeigt nach Markierung von 1B statt eines zu erwartenden rechts-ventral-lastigen Markierungsmuster vollständige Bilateralsymmetrie (Abb. 8a bis e). Nach Injektionen in 1C werden entsprechend der Erwartung aus den Verhältnissen im Frühkeim tatsächlich nur rechts gelegene Bereiche markiert (Abb. 11a und b). Die 1D-Injektionen schließlich belegen, daß der D-Quadrant nicht zu Strukturen führt, die auf den dorsalen Bereich beschränkt sind, sondern zu solchen die vollkommen bilateralsymmetrisch den gesamten Umfang des Tieres einnehmen (Abb. 14a und b), mit Ausnahme eines kleinen Bereichs der aber nicht, wie zu vermuten dorsal, sondern eher ventral liegt (Abb. 14d).

Diese Befunde belegen, daß es zu ausgeprägten Zellwanderungen im Keim kommen muß, die auch schon bei anderen Spiraliern beobachtet werden konnten. So beschreiben DAMEN und DICTUS (1994) bei *Patella vulgata* großräumige Umlagerungen von Zellen bei der Bildung des Prototrochs und DICTUS und DAMEN (1997) zeigen beim gleichen Tier, daß die Nachkommen der Blastomeren 2b, 3c, 3d, 3B und 3D ebenfalls ausgeprägte Wanderungen durchführen. Daraus ergibt sich, daß bei *Platynereis* das stereotype Teilungsmuster der Blastomeren nicht in eine exakte analoge räumliche Verteilung der aus diesen Blastomeren entstehenden Klone umgesetzt wird.

4.3. D-Quadrant

Bei aller Verschiedenheit, die Spiraliere im Detail aufweisen mögen: eine zentrale Gemeinsamkeit bildet die besondere Rolle, die der D-Quadrant auf die räumliche (dorsoventrale) Organisation des Keimes ausübt. Auch wenn die frühen Zellteilungen bei allen Spiraliern im Prinzip gleich ablaufen, so kann man dennoch zwei Untertypen unterscheiden:

Eier äqual furchende Spiraliere, die als ursprünglich gelten (FREEMAN und LUNDELIUS 1992), bleiben mehrere Furchungsrunden lang radiärsymmetrisch und lassen mithin keine Unterscheidung zwischen den vier Quadranten zu. Erst relativ spät (typischerweise kurz nach dem Erreichen des 32-Zellstadiums) wird bei ihnen der D-Quadrant dadurch etabliert, daß eine der vier vegetalen Makromeren mit einer animalen Mikromere in Kontakt tritt, wodurch diese Makromere durch

Induktion zum Vorläufer des Mesentoblasten 4d spezifiziert wird (VAN DEN BIGGELAAR 1977, VAN DEN BIGGELAAR und GUERRIER 1979, VAN DEN BIGGELAAR et al. 1987). Dadurch wird in der Folge die Phase strikter Spiralfurchungen durchbrochen und es beginnen erste bilateralsymmetrische Teilungen im D-Quadranten. Unterbleibt der induzierende Zellkontakt, so resultiert ein radialisierter Embryo. VAN DEN BIGGELAAR und GUERRIER (1979) zeigten weiterhin, daß jede der vier Makromeren den dorsalen Quadranten bilden kann, denn nach Deletion beliebiger Makromeren kann jede der verbleibenden Makromeren zur Stammzelle des Mesoderms, dem Mesentoblasten 4d werden. LARTILLOT et al. (2002) wiesen inzwischen nach, daß die induzierte Makromere bei *Patella vulgata* den mesodermspezifischen Transkriptionsfaktor Brachyury exprimiert. Während die induktive Etablierung der dorsoventralen Achse bislang nur bei Mollusken belegt war, fand HENRY (2002) kürzlich Hinweise auf gleichartige Verhältnisse bei dem äqualfurchenden Nemertinen *Cerebratulus lactaeus*. Hier wird nach Entfernung aller Mikromeren des ersten Quartetts die Ausbildung einer dorsoventralen Polarität verhindert. Wird hingegen eine geringere Anzahl Mikromeren ausgelöscht, so gründet der D-Quadrant in der Makromere, die zu den meisten der noch verbliebenen Mikromeren Kontakt besaß.

Den zweite Typus stellen die als abgeleitet geltenden inäqual furchenden Spiraliern dar (FREEMAN und LUNDELIUS 1992), bei denen bereits die erste Furchungsteilung zu zwei ungleichgroßen Blastomeren führt, eines Asymmetrie, die sich in der nächsten Teilung fortsetzt. Es resultiert im Vierzellstadium eine typischerweise besonders große Zelle, die fortan als D-Blastomere identifizierbar ist. Als mechanische Ursache für diese inäqualen Teilungen konnte eine asymmetrische Position der Teilungsspindeln ermittelt werden (DAN und INOUÉ 1987, DORRESTEIJN 1990a, b) oder aber die Ausbildung eines Pollappens, einer kernlosen Ausstülpung, die vor einer Teilung Cytoplasma beiseite nimmt um dieses nach der Teilung jeweils einer Zelle des Zweizellstadiums (CD) und dann des Vierzellstadiums überzuführen (D) (CLEMENT 1952, RENDER 1983, 1997). Daneben gibt es auch Mischformen mit inäqualer Teilung und dem Auftreten eines Pollappens (HENRY 1986; ECKBERG und HILL 1996). Gemeinsam ist allen inäqual furchenden Spiraliern, daß schließlich ein bestimmter Teil des vegetalen Plasmas der Zygote in eine Zelle des Vierzellstadiums übergeführt wird, und diese damit zur Blastomere D determiniert. Die Natur dieser Determinanten ist

nicht bekannt. Auf ihre Existenz schließen aber Experimente, etwa an pollappenbildenden Formen, bei denen die Entfernung des Pollappens zu einer Radialisierung des Embryos führt (CLEMENT 1952, RENDER 1983).

Eine alternative Vorstellung zur Determination des D-Quadranten schlägt DORRESTEIJN vor. Denn er fand bei *Platynereis* (1990a) eine strenge Korrelation zwischen dem Anteil an klarem Cytoplasma in den Blastomeren und ihrer Zellzyklusdauer, wobei Zellen des D-Quadranten besonders große Mengen an klarem Cytoplasma besitzen und besonders schnell proliferieren. Dieselben Verhältnisse wiesen DORRESTEIJN und EICH (1991) bei Keimen nach, deren zweite Furchungsteilung experimentell äqualisiert wurde. Auch hier zeigen die beiden daraus resultierenden großen und cytoplasmareichen Blastomeren des Vierzellstadiums und deren Nachkommen besonders kurze Zellzyklusdauern: sie verhalten sich also wie Blastomeren des D-Quadranten in der Normalentwicklung. Dies veranlaßte DORRESTEIJN und EICH (1991) zu der Vermutung, daß womöglich quantitative und nicht qualitative Unterschiede im Cytoplasma zur Determination des D-Quadranten beitragen. In diesem Zusammenhang sei auch noch auf die interessante Arbeit von DORRESTEIJN und LUETJENS (1994) hingewiesen, in der die Autoren durch exakte morphometrische Messungen nachwiesen, daß beim als äqual furchend geltenden Polychaeten *Pomatoceros triqueter* das Volumen der D-Blastomere zwar nur minimal, aber signifikant größer ist, als das der übrigen drei Furchungszellen.

Duplikationsexperimente zeigen darüber hinaus die spezifische Rolle des D-Quadranten auch bei der räumlichen Organisation der Keime inäqual furchender Spiralier. Dabei werden die Zellteilungen beim Übergang zum Zwei- bzw. zum Vierzellstadium mechanisch oder chemisch äqualisiert. Im Vierzellstadium resultieren daraus Furchungsstadien, die aus jeweils zwei großen und zwei kleinen Blastomeren bestehen, wobei die Zellen gleicher Größe sich entweder gegenüber oder aber nebeneinander liegen. Aus solchen Keimen entwickeln sich dann Tiere mit spiegelbildlich verdoppelten Rumpfstrukturen (GUERRIER et al. 1978 bei *Dentalium*; DORRESTEIJN et al. 1987 (s. o.) und DORRESTEIJN 1991 bei *Platynereis*, HENRY und MARTINDALE 1987 bei *Chaetopterus*, ASTROW et al. 1987 bei *Helobdella triserialis*), wobei die duplizierten Strukturen der posttrochalen

Region entstammen. Daraus folgt, daß die Stammzelle dieser Strukturen, 2d, verdoppelt worden sein muß.

Auch Isolationsexperimente können die räumliche Organisatorrolle des D-Quadranten belegen. So sind im bei *Chaetopterus* ausschließlich isolierte CD- und D-Blastomeren in der Lage, Larven mit bilateraler und dorsoventraler Achse auszubilden (HENRY 1986).

Wegen der geschilderten besonderen Bedeutung des D-Quadranten von Spiraliern konzentrierte sich meine Arbeit auf Markierungen von Zellen dieser Abstammungslinie. Zu diesem Zweck injizierte ich Blastomeren des D-Quadranten aus dem Zweizellstadium (Blastomere CD), dem Vierzellstadium (Blastomere D), dem Achtzellstadium (Makromere 1D und Mikromere 1d), dem 16-Zellstadium (Mikromere 2d) sowie etwa dem 29-Zellstadium (Mikromere 4d) sowie teilweise auch noch in spätere Nachkommen von 2d.

Das Markierungsmuster nach CD-Injektion im Zweizellstadium (Abb. 3a bis d) hat einen derartigen Umfang, daß fast schon der Eindruck entsteht, daß kein Teil des Organismus davon ausgespart bleibt, wobei hier natürlich der Anteil des gesamten C-Quadranten mit eingeschlossen ist.

Erfolgt die Injektion einen Zellzyklus später direkt in die D-Blastomere, so ändert sich an dem eben geschilderten Bild dennoch sehr wenig. Dieser Befund überrascht nicht, wenn man sich den Anteil der D-Zelle am Gesamtvolumen des Embryos klarmacht: etwa 60 % aller Strukturen (mit Ausnahme des Entoderms) werden von D gebildet¹¹. Dementsprechend zeigt es sich, daß sämtliche Gewebe des Rumpfes bis auf Teile des Stomodaeums und des Mitteldarmes bilateral-symmetrisch von der Blastomere D gebildet werden und dazu noch der links-dorsale Abschnitt des Kopfes; die dextrope Teilung beim Übergang vom Vier- zum Achtzellstadium bildet sich hierbei in einer Verschiebung des markierten Areals im Uhrzeigersinn ab.

D-markierte Keime konnten sowohl zur Trochophora, als auch zum Jungwurm herangezogen werden, und der Vergleich beider Entwicklungsstufen zeigt, daß

¹¹ Das entspricht dem Anteil klaren Cytoplasmas von D an der Gesamtmenge klaren Cytoplasmas im Keim.

sich dabei zwar die Proportionen, nicht aber die Lagebeziehung der Markierungsdomänen zueinander verändern (vergl. Abb. 13b mit Abb. 17a).

Eine weitere Differenzierung im Markierungsmuster des Rumpfes erfährt man erst durch Injektion späterer D-Abkömmlinge, 1D (Abb. 14a bis d) bleibt davon jedoch ausgenommen, denn das resultierende Markierungsmuster im Rumpf gleicht bis auf fehlende Kopfstrukturen, die von der Schwesterzelle 1d gebildet werden demjenigen nach Injektion in die Blastomere D.

Die Mikromere 2d trägt nach WILSON und DORRESTEIJN den größten Teil zum Aufbau des Rumpftoderms bei. Injektionen in 2d erwiesen sich als besonders schwierig und das, obwohl sich die Vorgängerblastomere 1D vergleichsweise einfach markieren ließ. 1D ist wahrscheinlich wegen ihres höheren Dottergehaltes stabiler als die große und praktisch nur aus Cytoplasma bestehende 2d. Diese Vermutung gründet auf der Tatsache, daß sich in der Zelle 1D das Cytoplasma vor der Abschnürung von 2d drastisch umlagert, wobei die Dotterbestandteile zur vegetalen Seite hin transportiert werden (DORRESTEIJN 1990a). Ähnliche cytoplasmatische Umlagerungsprozesse finden auch vor der ersten Furchungsteilung in der Zygote statt („ooplasmatische Segregation“), und DORRESTEIJN und KLUGE (1990) konnten nachweisen, daß an dieser Verlagerung sowohl Actinfilamente, als auch Mikrotubuli des Cytocortex beteiligt sind. ACKERMANN (1996) fand Hinweise darauf, daß die Dotterelemente über dicke Mikrotubulistränge mit dem Cytocortex verbunden sind. Man kann annehmen, daß die cytoplasmatischen Umlagerungen in der Zelle 1D nach einem ähnlichen Modus ablaufen und daß auch hier ein ausgeprägtes Cytoskelett existiert, das die Verlagerung der Dotterelemente mechanisch bewerkstelligen kann und der Zelle dabei gleichzeitig die notwendige Stabilität verleiht. Da 2d dagegen praktisch keinerlei Dotterbestandteile enthält, so könnte dies bedeuten, daß sie über einen wesentlich schwächeren Cytocortex verfügt und daher, zumal ob ihrer Größe, den Injektionsstreß besonders schlecht übersteht. Zur Klärung dieser Frage wären in den betreffenden Blastomeren Actin- und Tubulinmarkierungen zu unterschiedlichen Zeitpunkten des Zellzyklus nötig um Stärke und Dynamik ihres Cytoskeletts zu studieren.

Selbst wenn eine 2d-Mikromere im Zuge einer Farbstoffinjektion nicht lysierte, so führten diese Eingriffe doch stets zu ungewöhnlichen Verformungen der Zelle.

Daraus entwickelten sich dann in der Regel stark deformierte Trochophorae und im besten Falle solche, in denen die Hyposphäre nicht vollständig von 2d-Nachkommen umwachsen war. Trotzdem zeigt das gewonnene Material, daß die Nachkommen von 2d in der Trochophora eine kelchförmige, ektodermale Schicht bilden, die, mit Ausnahme einer Einbuchtung im Bereich des Stomodaeums, die posttrochale Region umhüllt (Abb. 17c). Erst im dreisegmentigen Wurm scheint das Stomodaeum nahezu vollständig ektodermal bedeckt, wofür wahrscheinlich auch Nachkommen von 2d verantwortlich sind, da 4d hierfür offensichtlich ausscheidet und 3d ausschließlich zur Bildung des Stomodaeums beiträgt (siehe 4.10).

Die Untersuchungen an Trochophorae lieferten Belege dafür, daß die Bilateralität der 2d-Zelllinie, die sich nach ihrem achten Teilungszyklus in Form der bilateralsymmetrisch angeordneten Blastomeren $2d^{1121}$ und $2d^{1122}$ einstellt (Fig. 1I, Seite 17), in der Trochophora fort dauert. Das deutet ein Injektionsversuch an, bei dem die Vorläuferzelle $2d^{112}$ kurz vor ihrer Teilung markiert wurde. Die bilaterale Symmetrie offenbart sich in der Trochophora noch ein wenig, da der Farbstoff in den rechten Teil der Zelle eingebracht wurde und bis zur Cytokinese keine Zeit mehr hatte, sich vollkommen homogen im gesamten Cytoplasma zu verteilen. Es resultierte eine Trochophora, deren rechte Hyposphäre etwas schwächer markiert ist, als die linke (Abb. 17b).

Dieser in die Zelle $2d^{112}$ injizierte Keim erlaubt aber noch weitere Beobachtungen und Schlußfolgerungen: bevor die Nachkommenschaft der Zelle 2d zur bilateralsymmetrischen äqualen Furchungsweise übergeht, werden noch drei weitere Zellen abgegeben, zum einen $2d^2$ nach rechts und $2d^{12}$ nach links, wobei beide eine Lage am Rande des Blastoporus einnehmen; und zum anderen $2d^{111}$ nach anterior-dorsal, der Mittellinie entlang vom Blastoporus weggerichtet (vergl. Fig. 1G, Seite 17 und Abb. 17b). Die Nachkommen aller drei Furchungszellen können in besagtem Keim natürlich nicht erkannt werden, da sie selbst keinen Farbstoff tragen. Nun ist auffällig, daß die Markierungslücke der 2d-Nachkommen die im Bereich des Stomodaeums zu erwarten ist, deutlich breiter ausfällt, als dies der Größe des Stomodaeums angemessen wäre (Abb. 17b, gelb umrandete Flächen). Das „fehlende“, also nicht gefärbte Zellmaterial könnte daher von $2d^2$ und $2d^{12}$ stammen, vorausgesetzt, daß die Nachkommenschaft dieser beiden

Zellen in der Trochophora eine vergleichbare Lagebeziehung zu den umgebenden Zellen und deren Nachkommen beibehalten hat, wie sie vor dem Blastoporus bestand. Zur Erläuterung betrachte man sich den Blastoporus auf Fig. 5, Seite 115, und beachte folgendes: zum dort wiedergegebenen Zeitpunkt befinden sich zwischen den Bildungszellen des Stomodaeums (den Stomatoblasten $2a^2$ und $2c^2$) und den Blastomeren $2d^{12}$ und $2d^2$ noch zwei weitere Zellen, nämlich $3d$ und $3c$. Weiter unten wird gezeigt¹², daß $3d$ und $3c$ schließlich ins Innere des Keimes abwandern und dort zu mesodermalen Strukturen beitragen. Nach ihrer Abwanderung liegen die Stomatoblasten aber in direktem Kontakt zu $2d^{12}$ bzw. $2d^2$. So kann angenommen werden, daß $2d^2$ und $2d^{12}$ den Bereich der Epidermis bildet, die das Stomodaeum zu beiden Seiten flankiert (Abb. 17b, gelb umrandete Flächen).

Während sich in besagtem Keim die beiden ektodermalen Hälften des posttrochalen Kelches posterior des Stomodaeums auf kurzer Strecke berühren, klafft anterior-dorsal davon eine Markierungslücke, die sich, schmal beginnend verbreitert, dann aber kurz vor Erreichen des Prototrochgürtels wieder schließt und daher etwa die Form eines Dreiecks hat (Abb. 17b, grün umrandete Fläche). Diese Lücke könnte sich nun aus dem (nicht markierten) Klon der nach anterior-dorsal abgegebenen Zelle $2d^{111}$ ableiten. Dies scheint bei erster Überlegung ausgeschlossen, denn gerade $2d^{111}$ fiel WILSON dadurch auf, daß sie sich etwa im 42-Zellstadium in den anfangs geschlossenen Prototrochgürtel hineinschiebt und zu einer dorsalen Unterbrechung desselben führt, die auch noch in der Trochophora fortbesteht. DORRESTEIJN (1990a) zeigte dasselbe Verhalten von $2d^{111}$ bei *Platynereis* auf (Fig. 1g, Seite 17). Mithin sollte man also erwarten, daß die resultierende Markierungslücke nach dorsal hin geöffnet und nicht von markierten $2d$ -Nachkommen abgeschlossen wird. Nun kann man allerdings WILSONS Abbildungen entnehmen, daß $2d^{111}$ nicht einen dauerhaften Keil in den Verband der Prototrochzellen treibt, sondern wieder nach posterior aus dem Gürtel weicht; sie wird anschließend anterior von Nachkommen der bilateralen Blastomeren

¹² Abschnitt „3c und 3d“, Seite 117

$2d^{1121}$ und $2d^{1122}$ umwachsen und damit vom Prototrochgürtel isoliert¹³. Weiterhin zeigt WILSON, daß die Nachkommen von $2d^{1121}$ und $2d^{1122}$ nach einigen Teilungsschritten von der Mittellinie divergieren und dabei ein Feld freigeben, das er als dreieckig beschreibt und das von kleinen, flachen, transparenten Zellen überzogen wird, über deren Abstammung er den Leser freilich im Unklaren lassen muß. Da nun die gefundene mediane Markierungslücke selbst nahezu dreieckig ist und sich an nämlicher Stelle wie das von WILSON beschriebene dreieckige Areal flacher Zellen befindet, ist die Annahme nicht abwegig, daß es sich hierbei um ein Feld handelt, das aus Nachkommen der Blastomere $2d^{111}$ besteht.

Natürlich kann die Möglichkeit nicht ausgeschlossen werden, daß sich der betreffende Keim nicht vollkommen normal entwickelt hat; seinem Habitus nach zu schließen, sollten eventuelle Störungen aber nicht all zu gravierend sein. Dennoch legen die gewonnenen Beobachtungen nahe, daß die Epidermis der Hyposphäre nach einem strengen Muster aufgebaut wird und einzelne Blastomeren, hier $2d^2$, $2d^{12}$, $2d^{111}$, $2d^{1121}$ und $2d^{1122}$ strikt voneinander abgegrenzte Domänen ausbilden.

Das Markierungsmuster von $2d$ in der Trochophora läßt keinen Beitrag am Aufbau von Kopfstrukturen erkennen und es fanden sich keinerlei Indizien für eine derartige Beteiligung im dreisegmentigen Wurm. $2d$ beschränkt sich also auf die Bildung des Rumpfektoderms. Betrachtet man das Schicksal aller anderen Mikromeren (siehe 4.10.), dann zeigt sich, daß $2d$ sogar das gesamte Rumpfektoderm liefert.

4.4. Mesoderm

Spiralier verfügen im allgemeinen über zwei Typen von Mesoderm: der bedeutendste Anteil wird gewöhnlich in Form vom sogenannten „primären“ Mesoderm von der Blastomere $4d$ geliefert, die meistens auch zur Bildung entodermaler Anteile beiträgt. Daneben bilden Mikromeren des zweiten und/oder

¹³ WILSON 1892, Abb. 46 Zelle x3 = $2d^{111}$; nach dem posterioren Abwandern der $2d^{111}$ -Nachkommen bleibt die dorsale Lücke im Prototroch allerdings erhalten, dieser Bereich wird dann von Zellen anderer Abstammung eingenommen.

dritten Quartetts aber häufig weiteres, „sekundäres“ Mesoderm¹⁴ (BOYER et al. 1996, BOYER und HENRY 1998).

Farbstoffinjektionen in die Zelle 4d von *Platynereis* ergaben nun gegenüber allen in der Entwicklung vorangegangenen Blastomeren des D-Quadranten erstmals eine deutliche Einschränkung der Markierungsdomäne, indem keine oberflächlich gelegenen Teile des Tieres mehr, sondern nur noch tiefgelegene Schichten hervortreten. Dies konnte in großer Klarheit sowohl auf der Entwicklungsstufe der Trochophora, als auch derjenigen des dreisegmentigen Wurmes gezeigt werden. Diese Markierungen betreffen überwiegend das Mesoderm, da sie im dreisegmentigen Wurm deutlich die Gestalt der Rumpfmuskulatur wiedergeben.

In der Trochophora stellt sich die Topographie der Markierung noch sehr einfach dar. Zwei vom posterioren Pol aus nach links und rechts entspringende Äste bilden hier das vom Ektoderm des Somatoblasten 2d überwachsene Mesoderm. Lage und Gestalt entsprechen exakt den Verhältnissen, wie sie von WILSON bei *N. succinea* bzw. von DORRESTEIJN bei *Platynereis* beschrieben wurden.

WILSON fand bei einer Nachuntersuchung der Keimesentwicklung von *N. succinea* (1898), daß 4d¹ und 4d² nicht nur nach anterior die Mesodermbänder bilden, sondern noch einige sehr kleine Zellen nach der Urmundlippe hin abgeben. Zudem bemerkte er, daß sich dazu noch weitere kleinvolumige Zellen gesellen, die von den terminalen Makromeren abgeschnürt werden. All diese kleinen Zellen heben sich durch eine starke Pigmentierung ab und kennzeichnen nach WILSON den posterioren¹⁵ Pol des Keims. Später, so seine Beobachtungen, wandern diese Zellen in das Innere des Keimes ein und bilden den posterioren Abschnitt der Wandung des Urdarms. Wegen ihrer Beteiligung am Aufbau des Urdarms bezeichnete WILSON 4d daher als „Mesentoblast“¹⁶. Bei Markierungsversuchen an anderen Spiraliern wurde ebenfalls ein Beitrag von 4d zur Bildung

¹⁴ Weitere Bezeichnung in der Literatur sind „Ektomesoderm“ und „Kopfmesoderm“. Oft wird allerdings auch von „larvalem“ Mesoderm gesprochen, DOHMEN (1992) weist aber darauf hin, daß dieser Begriff irreführend ist, da daraus auch adulte Strukturen entstehen können.

¹⁵ Übersetzt in das hier verwendete Orientierungssystem VON WISTINGHAUSENS. IN WILSONSCHER Anschauung entspricht diese Stelle dem ventralen Pol.

des Entoderms gezeigt (*Cerebratulus lacteus*, HENRY und MARTINDALE 1998, *Ilyanassa obsoleta*, RENDER 1997; *Haploplana inquilina*, BOYER et al. 1996). bei *Platynereis* fand DORRESTEIJN (1990a), daß $4d^1$ und $4d^2$ in der neunten Teilungsrunde jeweils eine kleine Zelle nach dem Rand des Urmunds hin abschnüren. Weitere Beobachtungen über deren Schicksal lagen bislang aber nicht vor. Die durchgeführten Injektionsexperimente können nun zwar keine Auskunft über die Anzahl der nach dem Urmundrand hin abgeschnürten Zellen geben, sie zeigen aber klar, daß dieses zunächst oberflächlich gelegene Zellmaterial vollständig ins Innere des Keimes wandern muß, da keine außen liegenden Markierungen gefunden werden konnten. Und sie ergeben auch Hinweise auf das mögliche Schicksal der eingewanderten Zellen: denn es fiel auf, daß den Mesodermbändern einer Trochophora an ihrem gemeinsamen medianen Ursprungsort ventral ein kompakter Zellklumpen bilateralsymmetrisch auflag, der durch eine besonders hohe Farbstoffkonzentration hervorstach (Abb. 16f). Eine analoge Zellaggregation mit ebenfalls überproportional hoher Fluoreszenz wurde auch auf der Ventralseite des posterioren Darmabschnittes eines dreisegmentigen Wurmes gefunden (Abb. 16c und d). In nämlicher Position beschreibt MALAQUIN (1925) zwei primordiale Keimzellen im Serpuliden *Salmacina dysteri*, und 1934 konnte derselbe Autor zeigen, daß diese aus der M-Zelle (= $4d$) durch eine inäquale Teilung hervorgehen. REBSCHER (persönliche Mitteilung) gelang es inzwischen bei *Platynereis* in eben jener Struktur im dreitägigen Wurm durch *in situ*-Hybridisierung die RNA eines Homologs des Drosophilagens *Vasa* nachweisen, das bei *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans*, dem Zebrafisch, dem Krallenfrosch, der Maus und der Ratte als Keimzellmarker exprimiert wird (TAKAMURA et al. 2002).

Zieht man diese Fakten in Betracht, so kann man zu der Vermutung gelangen, daß die von WILSON und DORRESTEIJN beschriebenen kleinen Zellen die $4d^1$ und $4d^2$ nach posterior abgeben und welche die kompakte Zellaggregation auf der Ventralseite des Mesoderms bilden damit vermutlich die Lieferanten der primordialen Keimzellen darstellen. Daher kann man auch die Möglichkeit nicht

¹⁶ Der Begriff wurde 1897 von Conklin bei der Untersuchung von *Crepidula fornicata* geprägt; 1892, vor seiner Entdeckung des entodermalen Beitrags von $4d$, bezeichnete WILSON sie als „second somatoblast“ bzw. „mesoblast“.

ausschließen, daß 4d überhaupt keinen Anteil zum Aufbau des Darmes beiträgt, sondern dieser Anteil ausschließlich von den kleinen Zellen abstammt, die von den terminalen Makromeren 4A bis 4D abgeschnürt werden. Zumindest bei *N. succinea* lassen sich diese eben nicht von den kleinen Zellen der 4d¹ und 4d² unterscheiden. Die Literatur zeigt, daß bei manchen Polychaeten 4d ausschließlich zum Mesoderm beiträgt. Dies berichtet ANDERSON (1966), von *Amphitrite* und *Arenicola*. DICTUS und DAHMEN (1997) fanden nach Injektionsversuchen an *Patella vulgata* markiertes Entoderm in den Nachkommen von 3A bis 3C, nicht jedoch in denen von 3D. Ebenso konnten GOTO et al. (1999) nach Injektionen in 4d von *Tubifex* keine Spur eines Beitrages dieser Zelle zu Endo- oder Ektoderm finden, alle markierten Strukturen waren mesodermal.

Folgt man der Argumentation von FREEMAN und LUNDELIUS (1992), die inäqual furchender Spiralerkeime als abgeleitet postulierten, da dieser Furchungsmodus zu einer Vereinfachung und Beschleunigung der Frühentwicklung führt, dann würde ein rein mesodermales Schicksal von 4d diese Argumentation weiter unterstützen.

Anzumerken ist noch, daß 4d auch Beiträge zum Mesoderm des Kopfes leisten könnte, da nach Injektion dieser Zelle im dreitägigen Wurm vier, allerdings nur sehr schwach erkennbare, bilateralsymmetrisch angeordnete Projektionen im Kopf zu finden waren (Abb. 16d). Auf der Entwicklungsstufe der Trochophora beschränkte sich das Markierungsmuster dagegen ausschließlich auf die Hyposphäre. Das stünde im Einklang mit der Beobachtung VON WISTINGHAUSENS (1891), der für *P. massiliensis* das spätere Auswachsen des Rumpfmesoderms in den Kopf beschreibt.

Bei der Untersuchung an *N. succinea* fand WILSON keinen Hinweis auf andere mesodermale Stammzellen als 4d, er schränkte aber ein, daß die Mikromeren 3a und 3b als Quelle weiteren Mesoderms in Frage kommen könnten. Auch DORRESTEIJN (1990a) berichtet nicht von anderen mesodermalen Strukturen bei *Platynereis* als denen, die aus 4d hervorgehen.

Nun zeigen meine Injektionsexperimente an *Platynereis* nach Markierung der Makromeren 1A und 1B lange Projektionen im Inneren des Kopfes dreisegmentiger Jungwürmer (Abb. 5a bis c, Abb. 8a bis e) von drei und vier Tagen Alter.

Entsprechende Projektionen erkennt man auch nach Actinmarkierungen durch Phalloidin-Texas Red (Abb. 4e) und diese sind im Vergleich zu Strukturen, die eindeutig neuronal sind, wie etwa das Neuropilem oder das Bauchmark, intensiver gefärbt. Stränge, die in Richtung der sich bildenden Antennen verlaufen, enden nicht an den Antennen selbst, sondern ventral von diesen. Und schließlich zeigt sich, daß diese actingefärbten Züge zum Teil kontinuierlich in die deutlich als solche erkennbare Rumpfmuskulatur übergehen. Daher muß der Schluß gezogen werden, daß die Projektionen nach 1A- und 1B-Injektion muskulärer und mithin mesodermaler Natur sind. Vermutlich liefern die Mikromeren 3a und 3b, eventuell auch 2b² diesen Teil des Mesoderms, wie im Abschnitt 4.10 dargelegt wird.

Noch eine weitere mesodermale Struktur läßt sich im dreisegmentigen Wurm finden, die nicht auf 4d zurückzuführen ist, nämlich die Umhüllung des Stomodaeums (Abb. 11b und Abb. 14d). Färbt man das F-Actingerüst viertägiger Tiere mit Phalloidin-Texas Red, dann zeigt sich ein Muster feiner, transversal und sagittal ausgerichteter Markierungen die das Stomodaeum umgeben (Abb. 18f) und im dreitägigen Tier noch nicht zu finden sind. Aufgrund ihrer Lage müssen sich diese Fasern aus der Umhüllung des Stomodaeums herausbilden. Sie bilden damit die Schlundmuskulatur und ihre späte Differenzierung zur solchen ist plausibel, da *Platynereis* erst in einem Alter von sieben Tagen mit der Nahrungsaufnahme beginnt. Die Markierungsexperimente belegen eindeutig, daß die stomodaeale Umhüllung von der Quadranten C und D abstammen muß, vermutlich tragen daher die Blastomeren 3c und 3d zu ihrer Bildung bei, wie ebenfalls im Abschnitt 4.10 dargelegt wird.

Ein auffälliger Befund ergab sich bei der Untersuchung der Mesodermbänder in der Trochophora. Es fiel nämlich auf, daß in allen fünf untersuchten Keimen dieser Entwicklungsstufe ektodermale Zellen die den Mesodermbändern anliegen, ebenfalls schwach fluoreszierten (Abb. 16f). Durch die Anwendung der Rasterlichtmikroskopie kann ausgeschlossen werden, daß die beobachteten Muster durch Streuung beziehungsweise Reflexion der Fluoreszenz des benachbarten Zellmaterials zustande gekommen ist. LANDESMAN et al. (2000) berichten im Zusammenhang mit der Untersuchung von *Xenopus*-Furchungsstadien mit herkömmlicher Epifluoreszenz von Pseudomarkierungen, die auf diese Ursachen

zurückzuführen sind. Vielmehr liegt hier ein Hinweis auf Zell-Zell-Kontakte zwischen Ekto- und Mesoderm vor. Das verwendete TRITC-Dextran besitzt ein Molekulargewicht von 70.000 Dalton, so daß ein Übertritt durch Gap Junctions ausgeschlossen werden kann, denn diese ermöglichen nur Molekülen bis zu einer Größe von 1.500 Dalton die Passage. Ein direkter Übertritt einer so hochmolekularen Substanz wäre nur über cytoplasmatische Brücken denkbar, wobei dann aber zu erwarten wäre, daß die ektodermalen Zellen etwa gleich intensiv gefärbt wären wie die des Mesoderms. Viel wahrscheinlicher ist es, daß ein Teil des Dextran-TRITC-Konjugats durch endogene Glycosidasen in Bruchstücke gespalten worden ist. Kleinere Fragmente wären also in der Lage Gap Junctions zu durchqueren. Denkbar ist natürlich auch, daß ein Teil der TRITC-Moleküle (ca. 450 Dalton) selbst freigesetzt wurde. Gesicherte Erkenntnisse hierzu ließen sich entweder durch Koinjektion von TRITC-Dextran und Lucifer Yellow (ca. 450 Dalton) in 4d gewinnen oder indem man die Gap Junctions mit 1-Octanol ausschaltet, wie es YAZAKI et al. (1999) beim frühen Seeigelkeim gelang. Im ersten Fall wäre dann zwischen Ekto- und Mesoderm eine ausgeglichene Markierung durch Lucifer Yellow zu erwarten, während sich die TRITC-Dextran-Fluoreszenz auf das Mesoderm beschränken würde. Im zweiten Fall sollte das Signal beider Farbstoffe auf den mesodermalen Bereich beschränkt bleiben.

4.5. Allgemeiner Aufbau des Kopfes

Sämtliche Markierungen der Mikromeren des ersten Quartetts bilden ausschließlich Kopfstrukturen inklusive des Prototrochs. Die Kopfstrukturen umfassen den größten Teil der flachen, einschichtigen Epidermis sowie die Cerebralganglien. Ganz im Einklang mit den jeweiligen Volumina der Mikromeren 1a bis 1d, wie sie DORRESTEIJN (1990a) bestimmt hat, wird von den ventral gelegenen Zellen 1a und 1b ein deutlich geringerer Anteil am Kopf gebildet, als von den dorsal gelegenen Zellen 1c und 1d. Die Abgrenzung der Markierungsdomänen ist im Wurm aber nicht strikt sektorenhafte ausgebildet, denn 1a und 1b bilden stets auch einen median gelegenen Bereich, der sich bis weit nach dorsal erstreckt; umgekehrt reichen die Markierungsdomänen von 1c und 1d anterior-dorsal nicht bis an die Medianebene heran (vergl. Abb. 2d mit Abb. 3c und Abb. 18a).

Die klonale Herkunft der beiden Paare definitiver Augen konnte nicht direkt geklärt werden. Es kann aber vermutet werden, daß sie sich aus den dorsalen Mikromeren 1c und 1d ableiten, da nach Farbstoffinjektionen in diese Zellen (oder aber in Vorläuferzellen) niemals eine Markierungslücke im Bereich der Augen gefunden werden konnte¹⁷. Natürlich ist denkbar, daß eine „Lücke“ durch die Autofluoreszenz der Augen maskiert wurde, dies hätte aber nur solche Exemplare betroffen, bei denen die injizierte Farbmenge sehr gering war und die Farbstofffluoreszenz daher ein ähnliches Niveau wie die Autofluoreszenz hatte.

4.6. Prototroch

Ein herausragendes Kennzeichen der Trochophora stellt ein äquatorialer Gürtel cilientragender Zeller mit assoziierten Stützzellen dar, der sogenannte Prototroch. Er besteht auch noch im jungen Wurm, verliert sich aber vor der Bildung weiterer Körpersegmente. Dem Prototroch wird vergleichend morphologische eine große Bedeutung zugemessen, da er allgemein bei freischwimmenden Larven von Spiraliern ausgebildet wird und seine Zellen sich bereits sehr früh differenzieren (COSTELLO 1945).

Die cilientragenden Zellen des Prototrochs der Trochophora sollen bei *N. succinea* aus Abkömmlingen der Mikromeren des 1. Quartetts, nämlich $1a^{212} - 1d^{212}$, $1a^{221} - 1d^{221}$ und $1a^{222} - 1d^{222}$ (WILSON 1892) entstehen, DORRESTEIJN (1990a) gibt abweichend davon bei seinen Untersuchungen an *Platynereis* die Blastomeren $1a^{12} - 1d^{12}$, $1a^{21} - 1d^{21}$ und $1a^{22} - 1d^{22}$ als Vorläuferzellen an. Hier zeigt sich eine Diskrepanz, da WILSON nur Abkömmlinge von $1a^2 - 1d^2$ für die Entstehung dieser Zellen verantwortlich macht, DORRESTEIJN hingegen zusätzlich eine Beteiligung der Zelllinie $1a^1 - 1d^1$ beobachtet hat. Diese Diskrepanz mag nach einer erneuten Untersuchung von *N. succinea* verschwinden: denn während WILSON seine Beobachtungen mit vergleichsweise einfacher mikroskopischer Ausstattung an fixiertem Material vollzog, verwendete DORRESTEIJN lebende Embryonen von *Platynereis* und untersuchte sie mit Hilfe moderner Differentialinterferenzkontrastmikroskopie mit Videoaufzeichnung. Man kann also davon ausgehen, daß DORRESTEIJN den Verlauf der Zellteilungen sehr

¹⁷ Diese Aussage beruht auf der Untersuchung folgender Injektionen: 1 mal CD, 1 mal C, 2 mal 1c, 2 mal D und 3 mal 1d.

sicher verfolgen konnte. Im Prinzip sind sich beide Autoren über die Identität der Zellen, die den Prototroch aufbauen, einig; der einzige Unterschied besteht darin, welche dieser Zellen schließlich Cilien ausbilden und welche zu Stützzellen werden. Es wäre also zu klären, ob *N. succinea* tatsächlich abweichende Verhältnisse zeigt, oder aber in diesem Punkt ein Beobachtungsfehler WILSONS vorliegt. Denn zwischen der Entstehung der Trochoblasten und der Ausbildung von Cilien in diesen Zellen vergehen immerhin einige Stunden, so daß es leicht möglich ist.

In der Trochophora teilt der Prototroch die anteriore Episphäre von der posterioren Hyposphäre. WILSON stellte fest, daß alle Bereiche anterior dieses (bis auf eine dorsale Lücke) geschlossenen Zellkranzes ausschließlich von Mikromeren des ersten Quartetts ausgebildet werden.

In der vorliegenden Arbeit stammen verwertbaren Daten über den Prototroch ausschließlich aus der Untersuchung an dreitägigen, dreisegmentigen Würmern. Unter den Nachkommen der ventral gelegenen Mikromeren 1a und 1b lassen sich an entsprechender Stelle markierte großvolumige Zellen feststellen (Abb. 6b, Abb. 9b), ihre Anzahl ließ sich aber nicht genau bestimmen, da sie zu undeutlich gegeneinander abgegrenzt sind. Das Markierungsmuster eines dreitägigen Wurmes nach 1d-Markierung zeigt im posterioren Abschnitt drei großvolumige Markierungsbereiche (Abb. 15a), die ihrer Lage nach Prototrochzellen sein müßten; für 1c konnte ich ähnliche Verhältnisse nicht finden, was aber an der geringen Markierungsstärke liegen könnte.

Immunhistochemische Markierungen mit Tubulinantikörpern ergaben, daß die Prototrochzellen dreitägiger Tiere sehr dicht aneinanderliegen, was es unmöglich macht, ihre genaue Anzahl zu bestimmen. Zu den Zellen, die wahrscheinlich den bewimperten Zellen des Prototrochs der Trochophora entsprechen, gesellen sich weiter posterior auch noch zusätzliche cillierte Zellen unklarer Herkunft. Es könnte sich hier um Abkömmlinge der Mikromeren 2a¹ bis 2c¹ handeln, die bei Molluskenkeimen sekundäre Trochoblasten bilden können (DAMEN und DICTUS 1994). Auf Abb. 18a wurden sie willkürlich den Nachkommen von 2b zugerechnet, denn sie befinden sich nach den Ergebnissen meiner Untersuchung gerade im Übergangsbereich der Nachkommen von 2b¹ zu 2c¹ bzw. von 2b¹ zu 2c¹.

Viertägige Würmer zeigen nach Anfärbung des Tubulins eine deutlich geringere Größe der Cilienfelder, deren Anzahl gleichzeitig zugenommen hat. Dabei

ist aber unklar, ob dies auf einer Zunahme bewimperter Zellen beruht, oder aber die Bewimperung der ursprünglichen Zellen in mehrere isolierte Areale zerfällt. Wie schon bei dreitägigen Tieren gibt es im posterioren Kopfbereich einzelne Cilienbüschel, die abseits des Prototrochgürtels liegen.

Die starken Veränderungen im Erscheinungsbild der Bewimperung des Kopfes überrascht nicht, da bewimperte Zellen ihre Cilien ohne weiteres in kurzer Zeit wieder verlieren können, wie das Beispiel der Stützzellen oder der sekundären Trochoblasten im Prototroch von *Patella* zeigt (DAMEN und DICTUS 1994). Auch können Cilien sehr rasch ausgebildet werden (siehe z.B. die schnelle Entwicklung der Cilien im Prototroch bzw. dem apikalen Wimperschopf von *N. succinea* und *Platynereis*; (WILSON 1892, DORRESTEIJN 1990a). Aufbau und Abbau der Bewimperung sowie die primäre Anzahl der Trochoblasten im Keim von *Platynereis* erfordern daher noch eine gesonderte Untersuchung.

4.7. Kopfniere

WILSON beschreibt im Keim von *N. succinea* zwei längliche Zellen, die dem Prototroch anterior eng anliegen und mit ihm die Trochophora umlaufen und bezeichnet sie als „Kopfniere“, da er mit Vorsicht vermutet, daß sie exkretorische Funktion haben könnten. Als Ursprung gibt er die Blastomeren 1d¹¹²¹¹ und 1c¹¹²¹¹ an. Eine Struktur, die ähnlich gestaltet ist, konnte in einer Trochophora nach Markierung der Blastomere 1d gefunden werden (Abb. 17d). Allerdings gehört dieser Keim in die Gruppe derer, die den mechanischen Belastungen der Untersuchungen nicht standhielten und zerquetscht wurden, weswegen sich keine Aussage über die ursprüngliche Lage dieser Struktur treffen läßt. Das einzige Indiz das für die Identität mit der Kopfniere spricht ist die Ähnlichkeit der Form zur Kopfniere WILSONS. Die gefundene Struktur erscheint multizellulär; WILSON beschreibt die beiden Hälften der Kopfniere bis zu einem Entwicklungszeitraum von knapp 12 Stunden als jeweils unizellulär, und konnte keine Angaben darüber machen, ob sich diese Zellen im weiteren Verlauf der Entwicklung noch teilen.

4.8. Larvale Drüsenzellen

Sowohl *N. succinea* als auch *Platynereis* entwickeln fünf sehr große sogenannte „larvale Drüsenzellen“. Sie liegen in der Trochophora dem Prototroch anterior an und verteilen sich symmetrisch um eine Drüsenzelle, die genau in der ventralen Mittellinie liegt. Im dreisegmentigen Wurm finden sich diese Zellen schließlich anterior-ventral und verschwinden etwa im Alter von vier Tagen. WILSON (1892) konnte keine Angaben zu ihrer Entstehung machen. Er bezeichnete diese Zellen als „frontal bodies“ und interpretierte sie als Drüsen, eine Vermutung, die DORRESTEIJN et al. (1993a) nach elektronenmikroskopischen Untersuchungen bestätigten. DORRESTEIJN und GRAFFY (1993b) konnten auch zeigen, daß die Drüsenzellen von Nachkommen der Mikromeren 1a und 1b abstammen, wobei offen blieb, welche Drüsenzellen den einzelnen Quadranten zuzuordnen waren. Die Injektionsexperimente ergaben jetzt, daß sich drei Drüsenzellen aus den Nachkommen von 1b, nur zwei dagegen von 1a ableiten. Die Zelle in der ventralen Mittellinie wird von 1b-Nachkommen gebildet (Abb. 6c und Abb. 9d).

4.9. Nervensystem

Markierungen im Nervensystem dreisegmentiger Würmer ließen sich nach Injektion aller Mikromeren des ersten Quartetts feststellen, wobei es sich hier neben dem Gehirn um axonale Projektionen handelt (Abb. 6d, Abb. 9c, Abb. 12c, Abb. 15d, e). Die dazugehörigen Zellkörper konnten nicht dargestellt werden, sie können sich aber nur im Gehirn befinden. Besonders viele markierte Axone fanden sich in 1d-injizierten Exemplaren, wenige in solchen nach 1a- und 1b-Markierung. Was 1c betrifft, so steht zu vermuten, daß auch hier eine größere Anzahl markierter Axone zu finden wäre, da 1c einen zu 1d vergleichbaren Anteil des Gehirns bildet. Daß die beiden daraufhin untersuchten Exemplare nur wenige Projektionen aufweisen, mag daran liegen, daß diese Tiere im Vergleich zu anderen nicht so gut entwickelt schienen. Andererseits darf man nicht vergessen, daß die Darstellung filigraner Axone nicht einfach ist. Sehr schwach gefärbte Strukturen lassen sich nur um den Preis der Überbelichtung stark fluoreszierender Bereiche darstellen.

Wie erwartet stammen weitere markierte Tiere auf denen neuronale Strukturen erkannt werden können aus Injektionen in die Blastomeren CD und D, also Vorläuferzellen der oben besprochenen Mikromeren 1c und 1d, aber auch aus Injektionen in 1D. Im Gegensatz zu den Markierungsexperimenten der Mikrome-

ren, lassen die neuronalen Strukturen, die diesen drei Zellen entstammen aber keine einzelnen Fasern erkennen, sondern sie stellen sich als homogen gefärbte breite Bänder dar (am besten zu erkennen auf Abb. 3c). Dies könnte darauf zurückzuführen sein, daß filigrane axonale Projektionen durch das stark markierte Ektoderm maskiert werden. Was die neuronalen Strukturen nach Markierung der Makromere 1D angeht, so dürften sich diese auf 2d zurückführen lassen, denn DORRESTEIJN et al. (1993a) konnte durch Antikörpermarkierungen afferente neuronale Projektionen in Form zweier Pionierfasern nachweisen, die vom Pygidium ins Gehirn verlaufen und DORRESTEIJN und GRAFFY (1993b) gelang es, diese auf die Blastomeren $2d^2$ und $2d^{12}$ zurückzuführen.

4.10. Zellen des Urmundrandes

WILSON geht in seiner Arbeit detailliert auf die Schicksale der Mikromeren des zweiten und dritten Quartetts des A-, B- und C-Quadranten ein, die allesamt den Rand des Blastoporus bilden oder aber ihm sehr nahe liegen (Fig. 5).

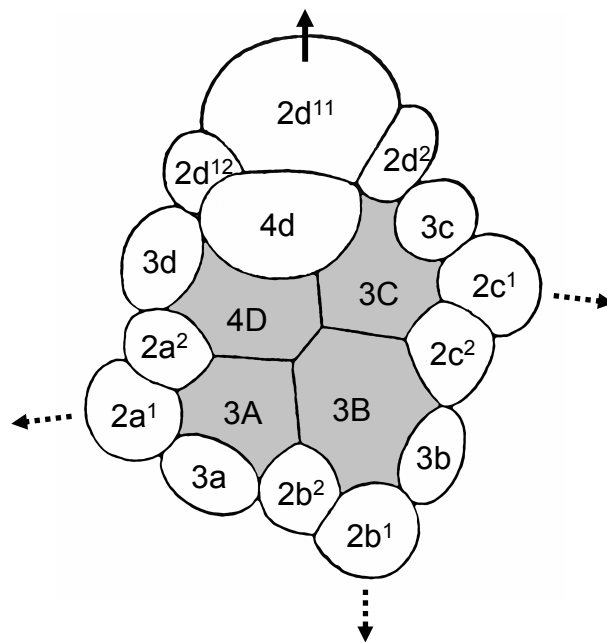


Fig. 5: Mercatorprojektion des Urmundrandes von *N. succinea*, noch vor dem Verschluss des Urmundes, etwa im 36- bis 41-Zellstadium. Verändert nach WILSON (1892). Blick auf den vegetalen (posterioren) Pol mit den noch nicht überwachsenen, grau unterlegten terminalen Makromeren. Der Urmundrand wird von allen Zellen gebildet, die die äußere Umrandung dieses Makromeren-„Fensters“ bilden. Die Medianebene durchschneidet die Blastomeren $2b^2$ und $2d^{11}$. Dorsal ist oben, ventral unten. Der durchgängige Pfeil bezeichnet die Richtung, in die bald die Blastomere $2d^{11}$ abgegeben wird (nach anterior-dorsal). Die gestrichelten Pfeile sollen andeuten, daß die Blastomeren $2a^1$, $2b^1$ und $2c^1$ etwas später vom Rand des Blastoporus abwandern (WILSON, 1892). Beachte, daß durch die vegetale Ansicht die Quadranten im Gegenuhrzeigersinn angeordnet sind.

In der Folge möchte ich meine Ergebnisse mit WILSONS Beobachtungen und Interpretation über das Schicksal dieser Zellen vergleichen. Dazu sind etwas ausführlichere Erörterungen notwendig, da ich die Entwicklung des zweiten und dritten Mikromerenquartetts der A-, B- und C-Zelllinien ja nicht gesondert verfolgen, sondern nur summarisch über die Markierungen ihrer Vorläuferzellen 1A, 1B und 1C erfassen konnte.

Zunächst sei nochmals daran erinnert, daß bei *Platynereis* alle vier Makromeren ein viertes Quartett Mikromeren abgeben (4a bis 4d), während bei *N. succinea* nur in der D-Zelllinie eine Mikromere der vierten Generation entsteht (4d). DORRESTEIJN (1990a) merkt an, daß bei *Platynereis* 4a und 4b extrem klein sind. 4c ist offensichtlich etwas größer, was sich auch aus der Menge klaren Cytoplasmas ergibt die 3C noch enthält, nämlich 0,83 % des gesamten Keimvolumens (3A: 0,39 %, 3B: 0,37 %) ¹⁸. Über die Blastomeren 4a bis 4c bei *Platynereis* konnte ich in dieser Betrachtung keine Angaben machen, ihre Beiträge zum Aufbau des Tieres können aber nur minimal sein.

2a² und 2c²

Ausgangspunkt dieser Betrachtung ist das Stomodaeum. Es soll nach WILSON aus den Blastomeren 2a², 2b² und 2c² entstehen, den Stomatoblasten ¹⁹, wobei WILSON selbst einschränkt, sich über die Beteiligung des „mittleren Stomatoblasten“, der Zelle 2b², nicht vollkommen sicher zu sein. Die Farbmarkierungen belegen nun eindeutig, daß in der Tat nur Zellen des A- und C-, nicht aber des B-Quadranten an der Bildung des Stomodaeums beteiligt sind und zwar frühestens solche des zweiten Quartetts, wie die Injektionen in 1A und 1C belegen, aus denen jeweils eine Hälfte des Stomodaeums markiert hervorgeht. Ob nun spezifisch 2a² und 2c² das Stomodaeum bilden, läßt sich aus den vorliegenden Daten natürlich nicht unmittelbar erkennen. Ihre Urheberschaft ergibt sich aber aus ihre Lage im frühen Keim, nämlich bilateralsymmetrisch zu beiden Seiten des Blastoporus, und nicht zuletzt aus WILSONS Beobachtungen.

¹⁸ Dabei darf nicht vergessen werden, daß die terminalen Makromeren 4A – 4D immer noch einen kleinen Teil des klaren Cytoplasmas behalten, der von DORRESTEIJN jedoch nicht bestimmt werden konnte.

¹⁹ nicht zu verwechseln mit dem Somatoblasten 2d.

WILSON beschreibt, daß im Zuge der Ausbildung des Stomodaeums beiderseits von diesem je eine Gruppe von Zellen auftaucht, die ihm zufolge unzweifelhaft Nachkommen der Stomatoblasten sein sollen, und sich zu einem Paar von (wie er vermutet) Drüsen entwickeln, die später am Übergang des Pharynx zum Mitteldarm angesiedelt sind. *Platynereis* besitzt in diesem Bereich zwei „Divertikel“, die u. U. ebenfalls Drüsenfunktion besitzen, da auch SCHNEIDER (1913) sie bei *P. massiliensis* gefunden und als Drüsen angesprochen hat. Meine Untersuchungen ergaben nach Markierung der Vorläuferzellen der Stomatoblasten (1A und 1C) sowie von 1B indes keine derart interpretierbaren Strukturen. Daher kommt einzig 1D als Quelle in Betracht, wobei auch hier wieder gilt, daß im ausgedehnten Markierungsmuster der Nachkommen dieser Blastomere eingebettete Strukturen von den umgebenden Markierungen maskiert und daher nicht diskret erkannt werden könnten.

Vom Fixpunkt des Stomodaeums aus, lassen sich nun Aussagen über die Schicksale der anderen Blastomeren ableiten:

3c und 3d

Für die Mikromeren 3c und 3d des dritten Quartetts nimmt WILSON an, daß sie zumindest „Teile des Ektoblasten der zirkumoralen und zirkumanalen Regionen“ einnehmen. Meine Ergebnisse zeigen für 3c (geschlossen aus der Injektion in 1C) weder in der Oral- noch in der Analgegend oberflächlich gelegene Muster. Für 3d läßt sich (geschlossen aus Injektion in 1D) zu diesem Aspekt keine Aussage machen, da eine Region die von 3d abstammt sowohl in der Oral- als auch in der Analgegend vom umgebenden mitmarkierten Material der Zelle 2d maskiert wäre. Akzeptiert man dies, dann ist offenbar, daß aus 3c und 3d andere Strukturen entstehen müssen und eine plausible Möglichkeit ist im Folgenden aufgezeigt: Es sei zunächst rekapituliert, daß die Ergebnisse das Stomodaeum als eine zweigeteilte Struktur zeigen, deren linke Hälfte dem A-Quadranten und deren rechte dem C-Quadranten entstammt. Außerdem konnte gezeigt werden, daß das Stomodaeum von einer ebenfalls bilateralsymmetrisch zweigeteilten, einschichtigen Zellhülle eingefaßt wird, wobei die linke Hälfte aber vom D-Quadranten, die rechte vom C-Quadranten gebildet wird. Die linke Hälfte des

Stomodaeums entsteht also aus zwei verschiedenen Quadranten, mithin aus zwei verschiedenen Blastomeren, und damit sicher nicht, wie von WILSON nahegelegt, einzig aus dem linken Stomatoblasten, $2a^2$. Es erscheint daher vernünftig, die Herkunft beider Teile der rechten Hälfte des Stomodaeums ebensowenig von einer einzelnen Zelle zu vermuten. In diesem Licht betrachtet stellen nun die Blastomeren 3c und 3d geeignete Kandidaten für die Herkunft jener Umhüllung dar, da sie nach der von WILSON beschriebenen Auswanderung von $2c^1$ und $2a^1$ nach dem Prototrochgürtel in enger räumlicher Beziehung zum rechten bzw. linken Stomatoblasten stehen. Demnach wären die Zellklone aus 3c und 3d dem sekundären Mesoderm, also dem Mesoderm ektodermaler Abstammung zuzurechnen, was sich aus dem Umstand ergibt, daß sie zur Bildung von Muskulatur führen, wie im Abschnitt 4.4 dargestellt wurde.

3a und 3b

Das Schicksal der Zellen 3a und 3b konnte WILSON nach seinen Maßstäben nicht eindeutig ergründen. Er beschreibt, daß sich ihre Nachkommen zwischen Stomodaeum und Prototroch nach anterior und lateral ausdehnen und rechnet sie schließlich, wie auch 3c und 3d, dem Ektoblasten zu. Jedoch zieht er auch die Möglichkeit in Betracht, daß 3a und 3b durch Einwanderung zur Bildung von sekundärem Mesoderm ektodermaler Abstammung beitragen könnten, wie es für viele Spiraler nachgewiesen wurde. WILSON sieht hier überhaupt die einzige Möglichkeit zur Bildung von Ektomesoderm im Keim von *N. succinea*. In der Tat resultieren aus der Markierung der Blastomeren 1A und 1B Strukturen im Inneren des Kopfes, die jedoch bilateralsymmetrisch ausgebildet sind, was nicht ihrer anfänglichen Lage entspricht. Allerdings konvergieren diese Zellen nach WILSON beim Verschuß des Urmundes, rücken also schon daher aufeinander zu, und, wenn man schon ein zusätzliches Einwandern dieser Zellen annimmt, dann kann damit gleichzeitig eine weitere Bewegung nach einer medianen Position vermutet werden. Actinmarkierungen mit farbstoffgekoppeltem Phalloidin präsentieren nun im Kopf junger Würmer ein Gewirr von Strukturen, vor allem Muskelsträngen, die sich im Bereich des Stomodaeums häufen. Daß aber aus Mikromeren des zweiten und/oder dritten Quartetts sekundäre mesodermale Strukturen hervorgehen,

wird für viele Spiralier, darunter auch Polychaeten geschildert und ist, z. T. auch mit Hilfe entsprechender Zellmarkierungen (BOYER et al. 1996 bei *Haploplana inquilina*; HENRY und MARTINDALE 1998 bei *Cerebratulus lacteus*, bilateralsymmetrischer Aufbau aus 3a und 3b) belegt worden.

2a¹, 2b¹ und 2c¹

Drei der Blastomeren des Urmundrandes weisen nach WILSON ein vergleichbares Verhalten auf, nämlich 2a¹, 2b¹ und 2c¹, indem sie im Zuge des Blastoporuschlusses aus dem Verband der Zellen am Urmundrand ausscheren. 2a¹ und 2c¹ sollen demnach lateral, unterhalb des Prototrochs zu liegen kommen, und 2b¹ soll eine Position zwischen dem Stomodaeum und dem Prototroch einnehmen. Mit dieser Beschreibung WILSONS harmonisieren Teile der Muster, die nach Markierungen von 1A, 1B und 1C zu finden sind: Aus 1A und 1C geht neben anderem jeweils eine schmale Markierung an der posterioren linken bzw. rechten Flanke des Kopfes hervor, die von dort aus jeweils nach dorsal übergreift (Abb. 5b und Abb. 11a). Und auch unter den Strukturen, die 1B bildet, findet sich eine schmale Markierung im posterioren Abschnitt des Kopfes, die von ventral aus beiderseits der Flanken des Kopfes nach dorsal aufsteigt (Abb. 8a bis c). Es ist kaum vorstellbar, daß diese Anordnung von Markierungstreifen von anderen Zellen denn den besagten Blastomeren 2a¹ (links dorsolateral), 2b¹ (ventrobilateral) und 2c¹ (rechts dorsolateral) herrühren, denn diese sind von äquivalenter Abstammung innerhalb ihres jeweiligen Quadranten und nehmen im Frühkeim eine für diese Erklärung plausible Lage ein.

Sollte man die Mikromeren des dritten Quartetts als mögliche Alternativen in Erwägung ziehen, so müßte man erst erklären wie dann die stomodaeale Umhüllung zustande kommen sollte, denn sie leitet sich nun einmal bewiesenermaßen vom C- und D-Quadranten ab und 3c und 3d sind die einzigen Zellen die hierfür aufgrund ihrer Lage plausiblerweise in Frage kommen. 3a und 3b scheiden vernünftigerweise ebenfalls für die Bildung ektodermaler Strukturen aus, da ich zeigen konnte, daß der A- und der B-Quadrant sekundäres Mesoderm aufbauen und schon WILSON ja nicht ausschließen wollte, daß 3a und 3b solches Mesoderm bilden könnten. Sollten 3a und 3b aber dennoch das posteriore linke dorsolaterale bzw. posteriore ventrobilaterale Kopfektoderm aufbauen, dann ergäbe sich die Situation, daß das posteriore rechte dorsolaterale Kopfektoderm

von $2c^1$ gebildet werden müßte, also einer Zelle, die ihrer Abstammung nach nicht äquivalent zu den beiden anderen ist, da sie einem anderen Quartett entstammt. Das wäre zwar nicht unmöglich, ist vom Standpunkt der Einfachheit aus aber eher abzulehnen. Alternativ zu $2c^1$ könnte auch noch $2c^2$ diese Rolle einnehmen, aber es ist gut begründet, daß $2c^2$ zusammen mit $2a^2$ das Stomodaeum bildet und WILSON fand zudem, daß diese beiden Zellen eben nicht in Richtung des Prototrochs auswandern und war sich ihrer Rolle auch unabhängig davon absolut sicher.

$2b^2$

So bleibt noch das Schicksal einer Zelle zu ergründen, die hier bislang nicht besprochen wurde, nämlich $2b^2$. Das ist jene Zelle, in der WILSON mit leichten Vorbehalten den „mittleren Stomatoblasten“ sah, den es nach meinen Befunden definitiv nicht gibt. Was ihren Werdegang betrifft, so könnte man nach dem Ausschlußverfahren so argumentieren: das Markierungsmuster im Wurm nach 1B-Injektion zeigt neben dem ventrobilateralen ektodermalen Band im posterioren Kopfabschnitt (das $2b^1$ zugeordnet wurde, s. o.) noch eine weitere Struktur, die anterior des Stomodaeums transversal im Inneren des Kopfes verläuft (Abb. 8d und e) und dem sekundären Mesoderm zugerechnet werden muß (siehe Abschnitt 4.4), denn ein Vergleich mit der F-Actinmarkierung auf Abb. 4e legt nahe, daß es sich um Muskelzüge im Kopf handelt. Dieser Teil des sekundären Mesoderms sollte nun $2b^2$ zugeordnet werden können, da alle anderen markierten Strukturen passender Größe schon den anderen Mikromeren des zweiten und dritten Quartetts zugeordnet wurden.

Eine positive Argumentation ist etwas komplizierter, aber möglich: Ausgangspunkt dafür ist, daß Zellen unterschiedlicher Quadranten aber äquivalenter Abstammung mit größerer Wahrscheinlichkeit zu gleichwertigen Strukturen führen sollten also solche nicht äquivalenter Abstammung.

Für diese Betrachtung sind zwei äquivalente Zellgruppen entscheidend, nämlich erstens $2a^1$, $2b^1$ und $2c^1$ und zweitens $2a^2$, $2b^2$ und $2c^2$. Nun muß zwischen den alternativen Fällen unterschieden werden, daß entweder $2b^1$ oder $2b^2$ sekundäres Mesoderm bildet.

Im ersten Fall ($2b^1$ bildet Mesoderm) würde die erste äquivalente Gruppe nicht gleichwertige Strukturen bilden, nämlich 1 mal Mesoderm und 2 mal Epidermis

und die zweite äquivalente Gruppe würde ebenfalls zu nicht gleichwertigen Strukturen führen, nämlich 1 mal Mesoderm und 2 mal Stomatoblast.

Im zweiten Fall ($2b^2$ bildet Mesoderm) würde die erste äquivalente Gruppe gleichwertige Strukturen bilden (3 mal Epidermis) und nur die zweite äquivalente Gruppe bildete nicht gleichwertige Strukturen (1 mal Mesoderm und 2 mal Stomatoblast)

Bildet also $2b^2$ das Mesoderm, so ist der Aufbau des Tieres ein wenig vereinfacht und die Wahrscheinlichkeit für diesen Entwicklungsweg sollte etwas größer sein.

So ergibt sich für die Blastomeren am Rand des Urmundes folgendes Bild, wobei nicht außer Acht gelassen werden darf, daß die Tabelle nicht das Resultat von diskreten Markierungen der aufgelisteten Blastomeren darstellt. Fett unterlegt sind alle Zellen, deren Schicksal gegenüber der bisherigen Auffassung anders verläuft.

$2a^2$	linker Stomatoblast	Ektoderm
$2c^2$	rechter Stomatoblast	Ektoderm
$2a^1$	linke dorsolaterale Kopfepidermis	Ektoderm
$2b^1$	ventrobilaterale posteriore Kopfepidermis	Ektoderm
$2c^1$	rechte dorsolaterale Kopfepidermis	Ektoderm
$2b^2$	Kopfmuskulatur	sekundäres Mesoderm
3a	Kopfmuskulatur	sekundäres Mesoderm
3b	Kopfmuskulatur	sekundäres Mesoderm
3c	rechte stomodaeale Umhüllung	sekundäres Mesoderm
3d	linke stomodaeale Umhüllung	sekundäres Mesoderm

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß sowohl die Mikromeren des zweiten, (mit Ausnahme von 2d) als auch des dritten Quartetts ausschließlich zu Strukturen des Kopfes bzw. des Stomodaeums beitragen, nicht aber wie WILSON behauptet zu „Teilen des zirkumoralen allgemeinen Ektoblasten“ bzw. zu „Teilen des allgemeinen Ektoblasten der zirkumoralen und zirkumanalen Regionen“. Daß die zirkumanale Region hier ausgeschlossen ist, wurde oben bereits gezeigt, für die zirkumorale Region ergibt sich dieser Ausschluß jetzt, nachdem das Schicksal aller Mikromeren des zweiten und dritten Quartetts beleuchtet wurde. Daraus folgt wiederum, daß der D-Quadrant das gesamte Ekto- und Mesoderm des Rumpfes bildet.

5. Zusammenfassung

In dieser Arbeit wird die Zellgenealogie im Keim des Polychaeten *Platynereis dumerilii* untersucht. Dazu wurde Blastomeren in jungen Keimen ein hochmolekularer fluoreszenter Vitalfarbstoff injiziert und das Entwicklungsschicksal der jeweiligen Zellnachkommen untersucht. Diese Methode konnte zum ersten Mal bei einem Polychaeten angewendet werden, nachdem es mir gelungen war, die zähe Vitellinhülle mit Dithioerythritol und Trypsin kontrolliert aufzuweichen ohne sie dabei ganz aufzulösen und damit den Zusammenhalt der Zellen im Keim zu gefährden.

Injiziert wurden alle Zellen des Zweizellstadiums (die Blastomeren AB und CD), des Vierzellstadiums (A, B, C und D), des Achtzellstadiums (die Makromeren 1A bis 1D und die Mikromeren 1a bis 1d) sowie die Blastomeren 2d, 2d¹², 4d und 4d¹. Die injizierten Keime wurden teilweise bis zur Trochophora, meistens aber bis zum dreisegmentigen Jungwurm großgezogen, dann fixiert und mit Hilfe eines konfokalen Rasterlichtmikroskops aufgenommen, was eine Analyse der Daten in allen drei Dimensionen erlaubte. Die Ergebnisse bestätigen, ergänzen und korrigieren Beobachtungen am lebenden Keim von *Platynereis dumerilii* (DORRESTEIJN 1990) und an fixierten Keimen der verwandten Art *Neanthes succinea* (= *Nereis limbata*; E. B. WILSON 1892, 1898).

Im Ergebnis zeigte sich, daß die animal-vegetale Achse des Frühkeims der antero-posterioren Achse des Jungwurms entspricht.

Die Zellklone der Mikromeren des ersten Quartetts sind radiär um die antero-posteriore Achse angeordnet und bilden bilateralsymmetrisch den größten Teil des Zellmaterials des Kopfes. 1a und 1b liefern den ventralen linken und rechten Abschnitt, jedoch reicht die Nachkommenschaft beider Zellen median in einem schmalen Bereich auch bis weit nach dorsal. Die Nachkommen von 1c und 1d legen sich dorsal als Kappe darüber und umgreifen den Kopf rechts bzw. links an den Seiten bis nach ventral.

Das Schicksal der nicht individuell markierten Mikromeren des zweiten und dritten Quartetts wurde aus den Markierungsergebnissen an ihren Vorgängerzellen erschlossen.

Die Mikromeren des zweiten Quartetts lassen sehr unterschiedliche Gewebe entstehen: die Nachkommen des voluminösen Somatoblasten 2d proliferieren bilateralsymmetrisch von der dorsalen Mittellinie aus und liefern das gesamte Rumpfektoderm. Die ungleich kleineren Mikromeren 2a¹ bis 2c¹ bilden hingegen schmale Streifen von Ektoderm am posterioren Ende des Kopfes und vermitteln damit zum Rumpfektoderm; 2a² und 2c² formen außerdem das ektodermale Stomodaeum, nicht jedoch die Zelle 2b², deren Nachkommenschaft sehr wahrscheinlich zu Kopfmesoderm (Muskulatur) wird.

Alle Mikromeren des dritten Quartetts sind sehr klein und bilden ausschließlich „Ektomesoderm“, nämlich 3a und 3b in Form von Muskelsträngen im Kopf und 3c und 3d in Form von Muskulatur, die das Stomodaeum umhüllt.

Die Schicksale der sehr kleinen Mikromeren 4a bis 4c konnten nicht erschlossen werden, jedoch die Entwicklung des recht voluminösen Mesentoblasten, der Zelle 4d. Er proliferiert wie 2d bilateralsymmetrisch von der dorsalen Mittellinie aus und liefert Rumpfmesoderm, zudem vielleicht noch kleine Beiträge zum Aufbau des Enddarms sowie eventuell die primordialen Keimzellen der Tiere.

Das Ektoderm der Nachkommen von 2d und das Mesoderm, das von 4d abstammt, umwachsen die Anlage des Mitteldarms, die dotterreichen Makromeren 4A bis 4D.

6. Literatur

- ABRELL S.** (1995) Vergleich der Differenzierungsleistungen von Blastomeren von *Platynereis dumerilii* (Annelida, Polychaeta) in situ und im Isolat. Diplomarbeit, Universität Mainz
- ACKERMANN CH.** (1996) Zur Dynamik des Cytoskeletts bei der ooplasmatischen Segregation des Polychaeten *Platynereis dumerilii* (Annelida, Polychaeta). Diplomarbeit, Universität Mainz
- ARENDE D., TECHNAU U., WITTBRODT J.** (2001) Evolution of the bilaterian larval foregut. *Nature* 409 (4 January 2001): 81-85
- ARENDE D., TESSMAR K., DE CAMPOS-BAPTISTA M. I., DORRESTEIJN A., WITTBRODT J.** (2002) Development of pigment-cup eyes in the polychaete *Platynereis dumerilii* and evolutionary conservation of larval eyes in Bilateria. *Development* 129 (5): 1143-54.
- ANDERSON D. T.** (1966) The comparative Embryology of the Polychaeta. *Acta Zool.* 1966, Bd XLVII, 1-42
- ASTROW S., HOLTON B., WEISBLAT D.** (1987) Centrifugation redistributes factors determining cleavage patterns in leech embryos *Dev Biol* 120 (1): 270-83
- BOYER B. C., HENRY J. Q., MARTINDALE M. Q.** (1996) Dual Origins of Mesoderm in a Basal Spiralian: Cell Lineage Analyses in the Polyclad Turbellarian *Haploplana inquilina*. *Dev. Biol* 179: 329-338
- BOYER B. C., HENRY J. Q.** (1998) Evolutionary Modifiactions of the Spiralian Developmental Program. *Am. Zool.* 38: 612-633
- BOYER B. C., HENRY J. J., MARTINDALE M. Q.** (1998) The Cell Lineage of a Polyclad Turbellarian Embryo Reveals Close Similarity to Coelomate Spiralian. *Dev. Biol.* 204: 111-123

- CLEMENT A. C.** (1952) Experimental studies on germinal localization in *Ilyanassa*. I. The role of the polar lobe in determination of the cleavage pattern and its influence in later development. J. Exp. Zool. 121: 593-626
- CLEMENT, A. C.** (1976) Cell determination and organogenesis in molluscan development: a reappraisal based on deletion experiments in *Ilyanassa*. Amer. Zool. 16: 447-453
- CONKLIN, E. G.** (1897) The embryology of *Crepidula*. J. Morphol. 13: 1 – 226
- COSTELLO D. P.** (1945) Experimental studies of germinal localization in *Nereis*. I. The development of isolated blastomeres. J. Exp. Zool. 100: 19-66
- DAMEN P., DICTUS W. J. A. G.** (1994) Cell Lineage of the Prototroch of *Patella vulgata* (Gastropoda, Mollusca). Dev. Biol. 162: 364-383
- DAN K., INOUÉ S.** (1987) Studies of unequal cleavage in mollusks. II. Asymmetric nature of the two asters. Int. J. Inv. Rep. Dev. 11: 335-354
- DAVIDSON E. H.** (1990) How embryos work: a comparative view of diverse models of cell fate specification. Development 108: 365-389
- DICTUS W. J. A. G., DAMEN P.** (1997) Cell-lineage and clonal-contribution map of the trochophore larva of *Patella vulgata* (Mollusca). Mech. Dev. 62: 213-226
- DORRESTEIJN A. W. C., 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 A. W. C., KLUGE B.** (1990) On the establishment of polarity in polychaete eggs. In: H.-J. Marthy (ed.) Experimental Embryology in Aquatic Plants and Animals. Plenum Press, New York :197-209

- DORRESTEIJN A. W. C.** (1990a) Quantitative analysis of cellular differentiation during early embryogenesis of *Platynereis dumerilii*. Roux's Arch. Dev. Biol. 199: 14-30
- DORRESTEIJN A. W. C.** (1990b) On the establishment of polarity in Polychaete eggs. Experimental Embryology in Aquatic Plants and Animals Edited by H.-J. Marthy, Plenum Press, New York
- DORRESTEIJN A. W. C., 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 A. W. C., O'GRADY B., FISCHER A., PORCHET-HENNERÉ E., BOILLY-MARER Y.** (1993a) Molecular specification of cell lines in the embryo of *Platynereis* (Annelida). Roux's Arch. Dev. Biol. 202: 260-269
- DORRESTEIJN A. W. C., GRAFFY CH.** (1993b) 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 A. W. C., LUETJENS C. M.** (1994) Morphometric analysis of cellular specification in *Platynereis* and *Pomatoceros* embryogenesis (Annelida, Polychaeta). Mem. Mus. Nat. Hist. Nat. 162: 45-50
- ECKBERG W. R., HILL S. D.** (Aug. 9, 1996) *Chaetopterus* - oocyte maturation, early development, and regeneration. Mar. Mod. Elec. Rec. Available from <http://www.mbl.edu/Biological.Bulletin/mmer.html>
- FIRE A., SIQUN X., MONTGOMERY M. K., KOSTAS S. A., DRIVER S. E., MELLO C. C.** (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. Nature 391 (19. Feb 1998): 806-811

- FISCHER A.** (1999) Reproductive and developmental phenomena in annelids: a source of exemplary research problems. *Hydrobiologica* 402: 1-20
- FREEMAN G., LUNDELIUS J. W.** (1992) Evolutionary implications of the mode of D quadrant specification in coelomates with spiral cleavage. *J. Evol. Biol.* 5 (2): 205-247
- GOTO A., KITAMURA K., ARAI A., SHIMIZU T.** (1999) Cell fate analysis of teloblasts in the Tubifex embryo by intracellular injection of HRP. *Dev. Growth. Differ.* 41: 703-713
- GRAMMATOPOULOS G. A., BELL E., TOOLE L., LUMSDEN A., TUCKER A. S.** (2000) Homeotic transformation of branchial arch identity after *Hoxa2* overexpression. *Development* 127: 5355-5365
- GUERRIER P., VAN DEN BIGGELAAR J. A. M., VAN DONGEN C. A. M., VERDONK N. H.** (1978) Significance of the Polar Lobe for the Determination of Dorsoventral Polarity in *Dentalium vulgare* (da Costa). *Dev. Biol.* 63: 233-242
- GURALNICK R. P., LINDBERG D. R.** (2001) Reconnecting cell and animal lineages: What do cell lineages tell us about the evolution and development of Spiralia? *Evolution* 55 (8): 1501-1519
- HALDER G., CALLAERTS P., GEHRING W. J.** (1995) Induction of Ectopic Eyes by Targeted Expression of the eyeless Gene in Drosophila. *Science* 267 (24. Mar 1995): 1788-1791
- HAUENSCHILD C., FISCHER A.** (1969) *Platynereis dumerilii*. Mikroskopische Anatomie, Fortpflanzung, Entwicklung. Großes zoologisches Praktikum 10b. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.
- HENRY J. J.** (1986) The role of unequal cleavage and the polar lobe in the segregation of developmental potential during first cleavage in the

embryo of *Chaetopterus variopedatus*. Roux's Arch. Dev. Biol. 195: 103-116

HENRY, J. J., MARTINDALE; M. Q. (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

HENRY J. J., MARTINDALE M. Q. (1996) The origins of mesoderm in the equal-cleaving nemertean worm *Cerebratulus lactaeus*. Biol. Bull. 191: 286-288

HENRY J. J., MARTINDALE M. Q. (1998) Conservation of the Spiralian Developmental Program: Cell Lineage of the Nemertean, *Cerebratulus lactaeus*. Dev. Biol. 201: 253-269

HENRY J. J., MARTINDALE M. Q. (1999) Conservation and innovation in spiralian development. Hydrobiologica 402: 255-265

HENRY J. J. (2002) Conserved Mechanism of Dorsoventral Axis Determination in Equal-Cleaving Spiralian. Dev. Biol. 248: 343-355

KLUGE B. (1991) Cytologische Analyse der frühesten Entwicklungsvorgänge bei *Platynereis dumerilii* (Annelida, Polychaeta). Dissertation, Universität Mainz: 1-245

KLUGE B., LEHMANN-GREIF M., FISCHER A. (1995) Long-lasting exocytosis and massive structural reorganization in the egg periphery during cortical reaction in *Platynereis dumerilii* (Annelida, Polychaeta). Zygote 3: 141-156

LANDESMAN Y., GOODENOUGH D. A., PAUL D. L. (2000) Gap Junctional Communication in the early *Xenopus* Embryo. J. Cell Biol. 150 (4): 929-936

- LARTILLOT N., LESPINET O., VERVOORT M., ADOUTTE A.** (2002) Expression pattern of Brachyury in the Mollusc *Patella vulgata* suggests a conserved role in the establishment of the AP axis in Bilateria. *Development* 129: 411-421
- LILLIE F. R.** (1895) The embryologie of the Unionidae. *J. Morphol.* 10 : 1-100.
- MALAQUIN A.** (1925) La ségrégation, au cours de l'ontogénèse, de deux cellules sexuelles primordiales, souches de la lignée germinale, chez *Salmacina Dysteri* (Huxley). *C. R. Hebd. Seances Acad. Sci.* 1925: 324-327
- MALAQUIN A.** (1934) Nouvelles observations sur la lignée germinale de l'Annélide *Salmacina Dysteri*, Huxley. *C. R. Hebd. Seances Acad. Sci* 1934 : 1804-1806
- PRUD'HOMME B., LARTILLOT N., BALAVOINE G., ADOUTTE A., VERVOORT M.** (2002) Phylogenetic analysis of the wnt gene family. Insights from lophotrochozoan members. *Curr. Biol.* 12: 1395-1400
- RENDER J.** (1997) Cell fate maps in the *Ilyanassa obsoleta* embryo beyond the third division. *Dev. Biol.* 189: 301-310
- SCHNEIDER J.** (1913) Zur postembryonalen Entwicklung der nereidogenen Form von *Nereis Dumerilii* unter besonderer Berücksichtigung des Darmtractus. *Mittheilungen a. d. Zool. Station zu Neapel*, Bd 20, 4: 529-646
- SLACK J.** (1979) Cell lineage in early development. *Nature* 278 (12 April 1979): 600-601
- SONG M. H., HUANG F. Z., CHANG G, WEISBLAT D. A.** (2002) Expression and function of an *even-skipped* homolog in the leech *Helobdella robusta*. *Development* 129: 3681-3692.

- SURFACE F. M.** (1907) The early development of a polyclad Planocera inquilina. Proc. Acad. Nat. Sci. Phila. 59: 514-559
- TABARA H., GRISHOK A., MOLLO C. C.** (1998) RNAi in *C. elegans*: soaking in the genome sequence. Science 282 (5388): 430-431
- TAKAMURA K., FUJIMURA M., YAMAGUCHI Y.** (2002) Primordial germ cells originate from the endodermal strand cells in the ascidian *Ciona intestinalis*. Dev. Genes. Evol. 212 (1): 11-18.
- VAN DEN BIGGELAAR J. A. M.** (1977) Development of dorsoventral polarity and mesentoblast determination in *Patella vulgata*. J. Morphol. 154: 157-186
- VAN DEN BIGGELAAR J. A. M., GUERRIER, P.** (1979) Dorsoventral polarity and mesentoblast determination as concomitant results of cellular interactions in the mollusc *Patella vulgata*. Dev. Biol. 68: 462-471
- VAN DEN BIGGELAAR J. A. M., DICTUS W. J. A. G., VAN LOON A. E.** (1997) Cleavage patterns, cell-lineages and cell specification are clues to phyletic lineages in Spiralia. Sem. Cell Dev. Biol. 8: 367-378
- VAN DONGEN C. A. M., GEILENKIRCHEN W. L. M.** (1974) The development of Dentalium with special reference to the significance of the polar lobe. I-III. Division chronology and development of the cell pattern in *Dentalium dentale* (Scaphopoda). Proc. K. Ned. Akad. Wet., Ser. C77: 57-100
- VON WISTINGHAUSEN C.** (1891) Untersuchungen über die Entwicklung von *Nereis Dumerilii*. I. Theil. Mitth. A. d. Zool. Stat. zu Neapel. X: 1 41-74
- WHITMAN C. O.** (1887) A contribution to the history of germ layers in Clepsine. J. Morphol. 1: 105-182
- WILSON E. B.** (1892) The Cell-Lineage of *Nereis*. J. Morphol. 6 (3): 361-466

WILSON E. B. (1898) Considerations on cell-lineage and ancestral reminiscence, based on a re-examination of some points in the early development of *Anneldis* and *Polyclades*. *Annals N. Y. Acad. Sci*, XI., No. I, March 30, 1898: 1-27

YAZAKI I., DALE B., TOSTI E. (1999) Functional Gap Junctions in the early Sea Urchin Embryo are Localized to the Vegetal Pole. *Dev. Biol.* 212: 503-510

7. Berichtigungen

Diese Berichtigungen sind nur in der elektronischen Version enthalten und nicht in der eingereichten, gedruckten Version.

Seite 112, Ende 1. Absatz

statt: Es wäre also zu klären, ob *N. succinea* tatsächlich abweichende Verhältnisse zeigt, oder aber in diesem Punkt ein Beobachtungsfehler WILSONS vorliegt. Denn zwischen der Entstehung der Trochoblasten und der Ausbildung von Cilien in diesen Zellen vergehen immerhin einige Stunden, so daß es leicht möglich ist.

lies: Es wäre also zu klären, ob *N. succinea* tatsächlich abweichende Verhältnisse zeigt, oder aber in diesem Punkt ein Beobachtungsfehler WILSONS vorliegt, da zwischen der Entstehung der Trochoblasten und der Ausbildung von Cilien in diesen Zellen immerhin einige Stunden vergehen.

Seite 112, vorletzter Absatz

statt: Auf Abb. 18a wurden sie willkürlich den Nachkommen von 2b zugerechnet, denn sie befinden sich nach den Ergebnissen meiner Untersuchung gerade im Übergangsbereich der Nachkommen von 2b¹ zu 2c¹ bzw. von 2b¹ zu 2c¹.

lies: Auf Abb. 18a wurden sie willkürlich den Nachkommen von 2b zugerechnet, denn sie befinden sich nach den Ergebnissen meiner Untersuchung gerade im Übergangsbereich der Nachkommen von 2b¹ zu 2c¹ bzw. von 2b¹ zu 2a¹.

Seite 120, Betrachtung des Schicksals der Zelle 2b²

Die Argumentation zum Schicksal der Blastomere 2b² in diesem Abschnitt ist falsch, dieser Zelle läßt sich nicht eindeutig ein mesodermales Schicksal zuordnen. Der B-Quadrant liefert mesodermale Strukturen, die sich auf die Zelle 3b zurückführen lassen und ektodermale Strukturen, die sich auf die Zelle 2b¹ zurückführen lassen. Der Anteil von 2b² läßt sich aber tatsächlich nicht ableiten, diese Blastomere bildet Ektoderm und/oder Mesoderm.

Damit ändert sich auch die Tabelle auf Seite 121 wie folgt:

2a ²	linker Stomatoblast	Ektoderm
2c ²	rechter Stomatoblast	Ektoderm
2a ¹	linke dorsolaterale Kopfepidermis	Ektoderm
2b¹	ventrobilaterale posteriore Kopfepidermis	Ektoderm
2c ¹	rechte dorsolaterale Kopfepidermis	Ektoderm
2b²	<i>nicht</i> der mittlere Stomatoblast	Ektoderm oder sekundäres Mesoderm
3a	Kopfmuskulatur	sekundäres Mesoderm
3b	Kopfmuskulatur	sekundäres Mesoderm
3c	rechte stomodaeale Umhüllung	sekundäres Mesoderm
3d	linke stomodaeale Umhüllung	sekundäres Mesoderm