

# **Molekularbiologische und histologische Analyse der Muskelentwicklung von *Nematostella vectensis***

Von dem Fachbereich Biologie der Technischen Universität Darmstadt (D17) zur  
Erlangung des akademischen Grades eines Doctor rerum naturalium genehmigte  
Dissertation von Dipl. Biol. Annette Amon-Hassenzahl aus Langen

Referent: Privatdozent Dr. Ulrich Technau, SARS International Centre for Marine  
Molecular Biology, University of Bergen, Norwegen

Koreferent: Prof. Dr. Paul Layer, Institut für Zoologie, TU Darmstadt

Tag der Einreichung: 15.08.2006

Tag der mündlichen Prüfung: 29.09.2006

Darmstadt 2007

Ich widme diese Arbeit dem Internet und drei Köchen, die mir nie den Brei verdorben haben.

Danke...

**... der Familie!**

Marc Hassenzahl, Alma und Greta.

**... den Wissenschaftlern!**

Ulrich Technau, Thomas Holstein, Anne Lehmkuhl, Michael Saina, Eduard Renfer, Detlef Kramer, Regina Brandner, Elaine Robson, Yulia Kraus, AG Pfeiffer, AG Brose, AG Becker, Graduiertenkolleg 340 der DFG.

**... den Freunden!**

Annekatriin Hille, Katrin Strassburger, Heike Lindmüller und Dennis Hofmann mit Karl, Oli Braun.

# Inhalt

<b>Inhalt</b>	<b>4</b>
<b>Zusammenfassung</b>	<b>8</b>
<b>Summary</b>	<b>9</b>
<b>1. Einleitung</b>	<b>10</b>
Die Evolution des Mesoderms	10
Die Bedeutung des Mesoderms	11
Ein Hauptderivat des Mesoderms ist Muskelgewebe	11
Die genetische Regulation der Muskeldifferenzierung	12
Muskeldifferenzierung in Vertebraten und Invertebraten	12
Die Transkriptionsfaktoren der GATA-Familie	13
Der Muskelmarker Myosin heavy chain (MyHC)	14
GATA reguliert <i>Myosin heavy chain</i>	16
Anthozoen sind basale Cnidarier	16
<i>Nematostella vectensis</i>	21
<i>Nematostella</i> als molekularbiologischer Modellorganismus	24
Ziele der vorliegenden Arbeit	25
<b>2. Material und Methoden // Allgemein</b>	<b>26</b>
Versuchstiere – <i>Nematostella vectensis</i>	26
Kultivierung von <i>Nematostella vectensis</i> und Induktion der Gametogenese	26
Relaxierung und Fixierung zur Präparation von Flat mounts zur Untersuchung der Muskulatur	26
Mikroskopie und Fotografie der Präparate	27
Lichtmikroskopie	27
Elektronenmikroskopie	27
<b>3. Material und Methoden // Histologie</b>	<b>28</b>
Schnitttechniken und Einbettverfahren	28
Einbettung von <i>Nematostella vectensis</i> zur Herstellung von Kryotomschnitten	28

Einbettung von <i>Nematostella vectensis</i> zur Herstellung von Vibratomschnitten	29
Einbettung von <i>Nematostella vectensis</i> zur Herstellung von Semi- und Ultradünnschnitten	29
Färbung von filamentösem Aktin (F-Aktin) mit Phalloidin	31
Quantitative Analyse	32
<b>4. Material und Methoden // Molekularbiologie</b>	<b>33</b>
Isolierung von cDNA-Klonen aus <i>Nematostella vectensis</i>	33
Auswertung der PCR-Ergebnisse	33
Isolierung von Gesamt-RNA aus Gewebe	33
Synthese von cDNA als Matrize zur Isolierung von <i>gata</i> , <i>Myosin Heavy chain (MyHC)</i> und RT-PCR	33
Synthese von cDNA als Matrize zum Komplettieren eines Genfragments in 5'Richtung	33
Synthese von cDNA als Matrize zum Komplettieren eines Genfragments in 3'Richtung	34
Polymerasekettenreaktion	34
Isolierung von <i>gata</i> aus <i>Nematostella vectensis</i>	34
PCR mit degenerierten Oligonukleotiden	34
Komplettieren des <i>gata</i> -Fragments durch Rapid Amplification of cDNA Fragments (RACE)	35
3'RACE	35
5'RACE	36
Die genomische Sequenz von <i>gata</i>	36
Isolierung von <i>Myosin heavy chain</i>	37
Die genomische Sequenz von Myosin heavy chain und die Isolierung der Promoterregion von Myosin heavy chain	37
Klonierung der Fragmente	37
Aufreinigung der DNA aus einem Agarosegel	37
Ligation und Transformation des Ligationsansatzes in kompetente Zellen	38
Auswerten der Sequenzen	38
Zeitliche Expressionsanalyse: RT-PCR	39
Räumliche Expressionsanalyse: <i>in situ</i> -Hybridisierung	40
Herstellung der RNA-Sonden	40
Relaxieren und Fixieren	40

Vorbehandlung und Hybridisierung	41
Posthybridisierung, Blockieren und Antikörperinkubation	42
Auswaschen von ungebundenem Antikörper	42
Detektion der gebundenen Sonde	43
Herstellung eines Reporterkonstrukts mit <i>MHC</i> -Promoter	43
mRNA-Synthese	44
<b>5. Ergebnisse // Histologie</b>	<b>45</b>
Anatomie und Ultrastruktur der Seeanemone <i>Nematostella vectensis</i>	45
Anatomie adulter Polypen von <i>Nematostella vectensis</i>	45
Anatomie und Ultrastruktur der Mesenterien adulter Polypen	48
Schematischer Aufbau eines Mesenteriums von <i>Nematostella vectensis</i>	55
Entwicklung der Muskulatur in der Seeanemone <i>Nematostella vectensis</i>	56
Planularlarven	56
Primärpolypen	58
<b>6. Ergebnisse // Molekularbiologie</b>	<b>66</b>
Isolierung eines <i>gata</i> Homologs aus <i>Nematostella vectensis</i>	66
Isolierung eines <i>myosin heavy chain</i> Homologs aus <i>Nematostella vectensis</i>	70
Isolierung der Promoterregion von <i>MyHC</i>	73
Expressionsanalyse von <i>gata</i> und <i>Myosin Heavy Chain</i>	73
Zeitliche Expressionsanalyse	73
Räumliche Expressionsanalyse	74
Visualisierung von F-Actin durch Phalloidin	76
Vergleich der Expression mit der Lokalisation von F-Actin	77
<b>7. Diskussion</b>	<b>79</b>
Histologische Grundlagen der Muskelentstehung in <i>Nematostella vectensis</i>	79
Die Edwardsiidae – Exoten innerhalb der Anthozoen	79
Die Funktion der Mesenterienmuskulatur	81
Die Muskelzellen von <i>Nematostella</i> sind stark abgewandelt	82
Mesodermale Vorläuferzellen oder Interstitielle Zellen bilden das Muskelgewebe	85
Die genetische Steuerung der Entwicklung der Muskulatur in <i>Nematostella vectensis</i>	85
Der Zinkfinger Transkriptionsfaktor GATA	85

Die Evolution von <i>Nematostella</i> -GATA	87
Der Muskelmarker Myosin heavy chain	87
Expressionsanalyse von <i>gata</i> und <i>MyHC</i>	88
Das Muskelsystem von <i>Nematostella vectensis</i>	89
GATA und der evolutionäre Ursprung der Muskeldifferenzierung	90
Ein Netzwerk „mesodermaler“ Gene in Cnidariern	90
Die Evolution mesodermaler Gene	91
<b>8. Ausblick</b>	<b>93</b>
<b>9. Literatur</b>	<b>94</b>
<b>10. Anhang</b>	<b>101</b>
Verwendete Oligonukleotide	101
Sequenzspezifische Oligonukleotide	101
Degenerierte Oligonukleotide	102
Sequenzen	103
Genomische <i>gata</i> -Sequenz	103
<i>Gata</i> Splice-Varianten	104
<i>Gata</i> cDNA-Sequenz	105
<i>Gata</i> -Sondensequenz	106
<i>Gata</i> -Aminosäuresequenz	106
<i>Gata</i> -Volllängen-Alignment	108
<i>MyHC</i> -Promotersequenz	111
Genomische <i>MyHC</i> Sequenz	112
<i>MyHC</i> -cDNA	118
<i>MyHC</i> -Sondensequenz	120
<i>MyHC</i> -Aminosäuresequenz	120
<i>MyHC</i> -Volllängen-Alignment	124
Abkürzungen	129
Chemikalien und allgemeine Abkürzungen	129
Lebenslauf	130
Erklärung	132

## Zusammenfassung

Die im Brackwasser lebende Seeanemone *Nematostella vectensis* gehört zu den Anthozoen, die eine basale Gruppe innerhalb des Stammes der Cnidarier darstellen. Cnidarier sind Diploblasten. Ihr Körper ist aus nur zwei Keimblättern, dem innenliegenden Entoderm und dem außenliegenden Ektoderm aufgebaut. Das dritte Keimblatt der Bilaterier, das Mesoderm, fehlt den Cnidariern. Eines der Hauptderivate des Mesoderms in Bilateriern ist Muskelgewebe. Obwohl *Nematostella* kein Mesoderm besitzt, haben die Polypen eine stark entwickelte Muskulatur, die sich im wesentlichen innerhalb der Mesenterien entwickelt. Die Mesenterien sind entodermale Falten, die den Gastralraum der Tiere unterteilen. Sie haben verschiedene Bereiche mit unterschiedlichen Funktionen. Neben der Retraktormuskulatur besitzen die Mesenterien spezialisierte Zellen mit Aufgaben in der Verdauung, Gonaden und Nematocyten. In dieser Arbeit wurde die Entwicklung der Muskulatur licht- und elektronenmikroskopisch von frühembryonalen Stadien, Larvenstadien, Metamorphosestadien und adulten Tieren histologisch untersucht. Die Analysen zeigten, dass die Mesenterien paarweise in einer bestimmten räumlichen Abfolge nach innen auswachsen und dabei die unterschiedlichen Gewebetypen des Mesenteriums von proximal nach distal nacheinander differenzieren. Weiterhin hat *Nematostella*, obwohl sie kein Mesoderm hat, die für Triploblasten charakteristischen, mesodermalen und muskelspezifischen Gene (z.B. *brachyury*, *snail*, *twist*, *gata*). Um die Regulation der Muskeldifferenzierung bei einem Diploblasten durch „mesodermale“ Gene zu untersuchen, wurden Expressionsanalysen der muskelspezifischen Gene *gata* und *Myosin Heavy Chain (MyHC)* durchgeführt. Die Expression von *gata* beginnt vor der Expression von *MyHC*. In frühen Entwicklungsstadien von *Nematostella* werden beide Gene in den Anlagen der Mesenterien koexprimiert, während im Mesenterium der adulten Polypen *gata* und *MyHC* in komplementären Mustern exprimiert werden. Die Ergebnisse unterstützen die Hypothese, dass *gata* an der Musterbildung der Mesenterien beteiligt ist, in der späteren Entwicklung aber die Muskeldifferenzierung negativ reguliert, indem es die Entstehung von Muskeln in bestimmten Bereichen des Mesenteriums unterdrückt.

## Summary

The brackish water sea anemone *Nematostella vectensis* belongs to the Anthozoa, which are considered as the basal group within the Cnidaria. Cnidaria are diploblasts, i.e., they possess two germ layers, the endo- and the ectoderm. They lack the third germ layer of Bilateria, the mesoderm. One of the major differentiation products of the mesoderm in Bilateria is muscle tissue. Although lacking mesoderm, *Nematostella* polyps also have strong musculature, which develops in the mesenteries. These are endodermal folds, which subdivide the gastric cavity. The mesenteries have multiple domains with different important functions. Besides the retractor muscles developing on one side in the middle part of a mesentery, specialized digestive cells, nematocytes and reproduction organs develop in different areas of the mesenteries. To follow the muscle differentiation during polyp growth after embryonic and larval development, I carried out a series of histological sections, light and electron microscopy at different stages. The results suggest that the mesenteries develop by distal growth from the lateral body walls with successive differentiation of the different types of tissue. Further, although lacking mesoderm, *Nematostella vectensis* has mesoderm-specific and muscle-specific genes (e.g. *brachyury*, *snail*, *twist*, *gata* and *Myosin Heavy Chain (MyHC)*, *Myosin Light Chain (MyLC)*) characteristic for triploblasts. To reveal a possible regulation of muscle differentiation by “mesodermal” genes, I carried out a detailed expression analysis of *gata* and *MyHC*. Interestingly, *gata* factor expression precedes but then colocalizes with that of *MyHC* in the anlagen of the mesenteries. However, in adult polyps the two genes are expressed in virtually complementary patterns in the mesenteries. We propose that *gata* factor is involved in the patterning of the mesenteries but later regulates muscle differentiation negatively, thereby locally restricting muscle formation to specific areas of the mesentery.

## 1. Einleitung

### **Die Evolution des Mesoderms**

Die meisten Tierstämme sind Triploblasten, sie generieren ihren Körper aus drei Keimblättern: Dem äußeren Ektoderm und den beiden innen liegenden Keimblättern, dem Entoderm und dem Mesoderm. Einige wenige Stämme bilden ihren Körper aus nur zwei Keimblättern, dem Ektoderm und dem Entoderm, d.h. das Mesoderm fehlt. Tiere, deren Körper aus nur zwei Keimblättern aufgebaut ist, werden als Diploblasten bezeichnet. Alle diploblastischen Tiere sind früh während der Evolution entstanden und besitzen nur eine apparente oral-aborale Körperachse (Abbildung 1). Alle rezenten Tierarten evolvierten monophyletisch, haben also einen einzigen, gemeinsamen Vorfahren (Peterson und Earnisse, 2001; Abbildung 1).

Die Entstehung der für Bilaterier typischen, zweiten Körperachse, könnte während der Evolution im Tierreich mit der Entstehung des Mesoderms verknüpft sein (Technau, 2001), da beide in der gleichen Transitionsphase entstanden sind. Durch das Vorhandensein des Mesoderms konnten komplizierte Körperbaupläne mit komplexeren Organen entstehen. Somit könnte die Entstehung des Mesoderms die Voraussetzung für die Möglichkeit der Formenvielfalt im Tierreich geschaffen haben und damit einen wichtigen Schritt in der Evolution der Tiere darstellen (Technau, 2001).

Eine Möglichkeit, den Ursprung der Entstehung des Mesoderms in Bilateriern zu bestimmen, ist die Isolation konservierter Homologe, Mesoderms exprimierter Gene die während der Embryonalentwicklung sowohl in der Mesodermdifferenzierung als auch der Mesodermspezifizierung eines Organismus eine Rolle spielen. Forscher gehen davon aus, dass diese Gene bereits vor dem Mesoderm evolvierten, mit dem sie später funktional assoziiert sind (Technau 2001).

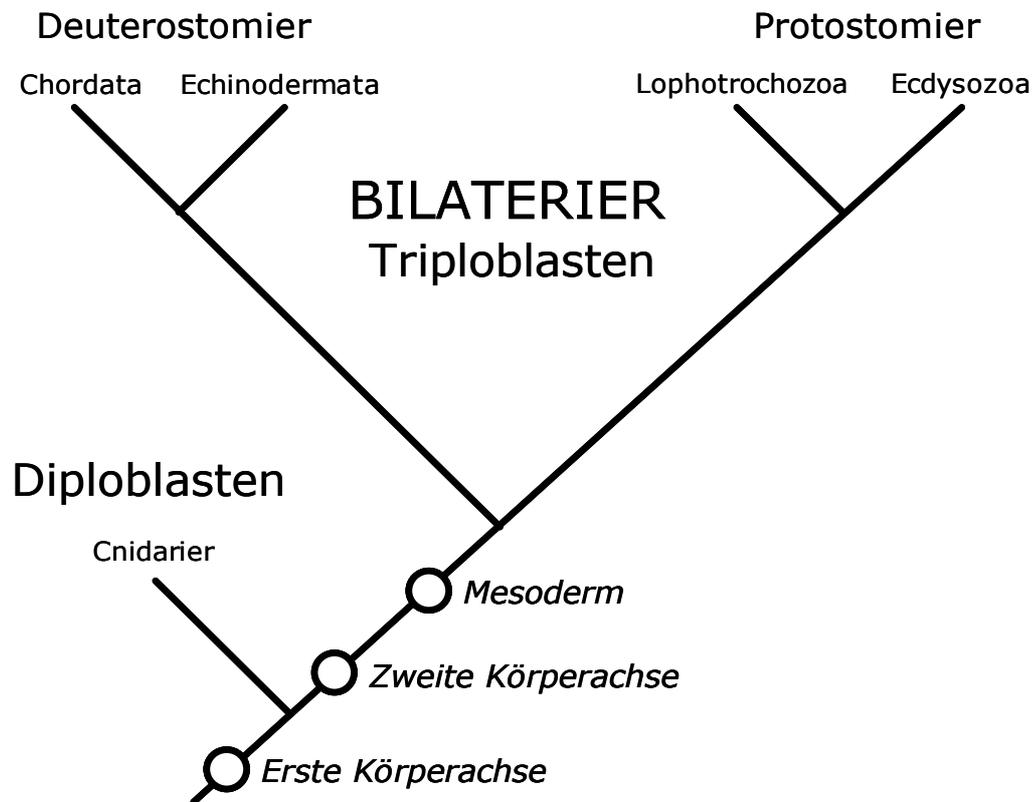


Abbildung 1: Evolution der Tierstämme (abgewandelt nach U. Technau). Die Cnidarier stellen die Vertreter mit nur einer Körperachse, der oral-aboralen, dar. Mit der Evolution des Mesoderms trat auch eine zweite Körperachse auf. Die Bilaterier teilen sich in zwei große Gruppen: Die Protostomier und die Deuterostomier.

## Die Bedeutung des Mesoderms

In Bilateriern werden während der Gastrulation die drei Keimblätter Ekto-, Ento- und Mesoderm gebildet, aus denen in der weiteren Embryonalentwicklung unterschiedliche Gewebe hervorgehen. Während aus dem Ektoderm das Nervensystem und die Epidermis entstehen und das Entoderm einige innere Organe generiert, sind die Hauptderivate des Mesoderms z.B. Komponenten des Blutsystems und Muskelgewebe.

### Ein Hauptderivat des Mesoderms ist Muskelgewebe

Während der Embryonalentwicklung höherer Tiere entwickelt sich aus dem Mesoderm überwiegend Muskelgewebe. Obwohl Cnidarier ein solches Mesoderm nicht besitzen, haben sie Muskelzellen, die sich aber aus entodermalen Epithelmuskelzellen differenzieren. Einige Cnidarier, wie z.B. die Hydrozoe *Podocoryne carnea* oder die

Anthozoe *Stomphia coccinea* haben gestreifte Muskulatur (Bölsterli, 1977; Amerongen und Peteya, 1976, 1980) während die Mehrheit der Nesseltiere Muskulatur entwickelt, die mit der glatten Muskulatur höherer Tiere vergleichbar ist.

In *Nematostella* differenzieren sich die Muskelzellen an der Basis und in einem definierten Bereich innerhalb der Mesenterien, die als entodermale Einstülpungen den Gastralraum der Polypen einteilen.

### **Die genetische Regulation der Muskeldifferenzierung**

Die Entwicklung gestreifter-, glatter- und Herz-Muskulatur in triploblastischen Tieren ist relativ gut untersucht. Die molekulare Regulation der Entstehung gestreifter Muskulatur in Vertebraten wird überwiegend von Transkriptionsfaktoren der MyoD-Familie kontrolliert (Rudnicki et al., 1993). Die Herzmuskelentstehung in *Drosophila melanogaster* und Vertebraten wird von zahlreichen Transkriptionsfaktoren beeinflusst. Zu ihnen gehören z.B. die Homeoboxgene *tinman* und *nkx*-Homologe, die Signalmoleküle *decapentaplegic* (*dpp*) und *BMPs*, Mitglieder der *wnt*-Familie, basic-Helix-loop-Helix Proteine ebenso wie GATA Faktoren (Bodmer und Venkatesh, 1998).

### **Muskeldifferenzierung in Vertebraten und Invertebraten**

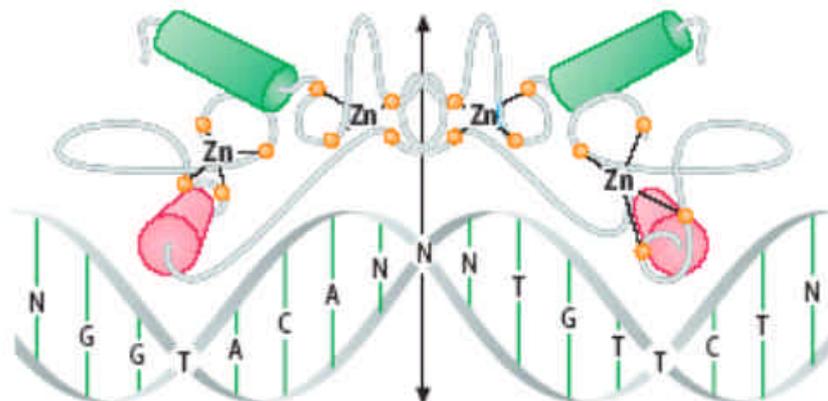
Die Bildung der Skelettmuskulatur während der Embryogenese der Vertebraten beginnt durch mesodermale Vorläuferzellen, die in den Somiten lokalisiert sind und während der Segmentierung des paraxialen Mesoderms auf beiden Seiten des Neuralrohrs und der Chorda entstanden sind (zusammengefasst in Buckingham, 2001). Eine große Rolle bei der Differenzierung und Determinierung der Skelettmuskelzellen spielen die muskelspezifischen basischen Helix-loop-Helix (bHLH) Faktoren MyoD, Myogenin, Myf5 und MRF4 (zusammengefasst in Molkenin und Olson, 1996).

Die Bildung der glatten Muskulatur und der Herzmuskulatur in Vertebraten hängt von Faktoren ab, die an der Bildung der gestreiften Muskulatur nicht beteiligt sind. Der Homöodomäne-Transkriptionsfaktor Nkx2-5, der zuerst aus der Maus isoliert wurde (Komuro und Izumu, 1993; Lints et al., 1993; Harvey, 1996; Tanaka et al., 1998; Newman und Krieg, 1998), wird während der Embryonalentwicklung in Herzmuskelvorläuferzellen

des anterioren Mesoderms und pharyngealen Entoderms exprimiert und gilt als ein früherer Marker für die Entstehung des Vertebratenherzens. Weitere Faktoren sind an der Herzmuskelentstehung beteiligt: *mef2*, z.B. wird in Vorläuferzellen aller Muskulaturtypen exprimiert, loss-of-function-Experimente zeigen sich in Defekten der Herz-Morphogenese (Lin et al., 1998). In *Drosophila* wurde *Dmef2* als direktes Zielgen für das Nkx2-5-Homolog *tinman* identifiziert (Gajewski et al., 1997) gezeigt. Dpp, BMPs, *wingless* und *heartless* sind sowohl in Vertebraten als auch in Invertebraten an der Herzmuskelentstehung beteiligt. Drei Zinkfinger Transkriptionsfaktoren der GATA-Familie, GATA-4,5,6 werden in differenzierenden Herzmuskelzellen und angrenzendem entodermalen Gewebe exprimiert (Durocher und Nemer, 1998; Jiang et al., 1998).

### Die Transkriptionsfaktoren der GATA-Familie

Transkriptionsfaktoren der GATA-Familie haben einen oder zwei hoch konservierte Zinkfingerdomänen mit jeweils angrenzenden basischen Domänen die auch die DNA-bindende Domäne enthalten. GATA typische Zinkfinger enthalten vier Cystein-Reste, die ein einzelnes Zink-Ion umschließen (Teakle und Gilmartin, 1998; Abbildung 2).



**Abbildung 2:** C2C2-Zinkfinger Transkriptionsfaktor. Das Zinkion des Fingers (meist mehrere) ist koordinativ mit zwei Cysteinen und Histidinresten verbunden. Die beiden Cysteine gehören zu einem zweisträngigen  $\beta$ -Faltblatt auf einer Seite des Fingers, die beiden Histidinreste sind Teil einer kurzen  $\alpha$ -Helix auf der anderen Seite (aus Karp, Molekulare Zellbiologie, Springer).

Der Name GATA resultiert aus der Erkennungssequenz der DNA: (A/T) GATA (A/G) (Evans und Hollenberg, 1988; Martin und Orkin, 1990). Frühere Studien haben gezeigt,

dass nur der C-terminale Zinkfinger mit der angrenzenden basischen Domäne für die DNA-Bindung *in vitro* essentiell ist (Yang und Evans, 1992; Omichinsky et al., 1993; Visvader et al., 1995). Der N-terminale Zinkfinger erkennt diese Consensus-Sequenz nicht, ist jedoch zum Rekrutieren co-regulatorischer Proteine, beispielsweise Friends of GATA (FOG) nötig (Tsang et al., 1997).

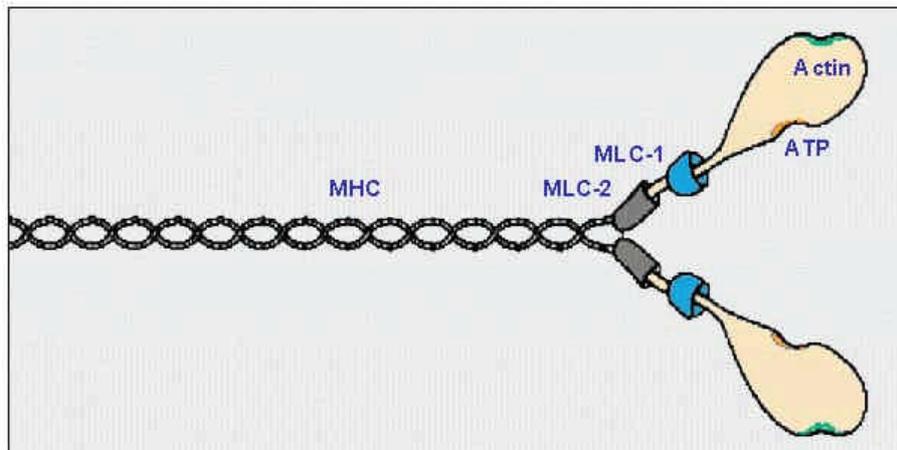
Innerhalb der Vertebraten wurden sechs GATA-Faktoren identifiziert (Evans und Felsenfeld, 1989; Tsai et al., 1989; Yamamoto et al., 1990; Kelley et al., 1993; Laverriere et al., 1994), die wiederum in zwei Gruppen eingeteilt werden: die GATA-1,2,3 und die GATA-4,5,6-Subfamilie (Pevny et al., 1991; Tsai et al., 1994; Pandolfi et al., 1995; Lowry und Atchley, 2000). Invertebraten besitzen meist nur GATA-Faktoren, die zu einer der beiden Gruppen gezählt werden. In Vertebraten haben Faktoren der GATA-1,2,3-Familie Funktionen in der Differenzierung der Zellen des Blutsystems und der Muskulatur. GATA-4,5,6-Faktoren werden bei Vertebraten in entodermalen Geweben sowie im Herz, der Leber und der Lunge exprimiert (Lowry und Atchley, 2000). Weiterhin wurden in Vertebraten Zielgene für GATA-Faktoren, wie z.B. *myosin heavy chain (MyHC)* und *Actin* identifiziert (Ip et al., 1994; Jiang und Evans, 1996).

In Bilateriern spielen Transkriptionsfaktoren der GATA-Zinkfinger-Familie eine wichtige Rolle bei der Differenzierung des Mesoderms, insbesondere der Muskelentstehung. So wird, beispielsweise, die glatte Herzmuskulatur höherer Tiere unter dem Einfluss der GATA-Faktoren 4,5 und 6 gebildet (Heikinheimo et al., 1994; Laverriere et al., 1994; Jiang und Evans, 1996; Durocher und Nemer, 1998; Jiang et al., 1998). Die molekulare Regulation der Muskelentstehung und Muskeldifferenzierung in *Nematostella vectensis* ist vollkommen unbekannt.

### Der Muskelmarker Myosin heavy chain (MyHC)

Myosin heavy chain ist eines der wichtigsten Proteinkomponenten der Herz- und Skelettmuskulatur und ist verantwortlich für die Energieübertragung und Festigkeit in diesen Geweben (Eisenberg und Greene, 1980; Harrington und Rodgers, 1984). Jedes Myosin-Molekül besitzt zwei schwere Ketten (Myosin heavy chain, MyHC) und vier leichte Ketten (Myosin light chain, MyLC; zusammengefasst in Morkin, 2000). Die beiden

schweren Ketten formen alpha-helicale Regionen, deren eine Seite sich zu einer globulären „Kopf-Region“ ausbildet. Die MyLCs sind in jedem dieser Köpfe lokalisiert (zusammengefasst in Morkin, 2000). Die ATPase Aktivität des Myosin ist mit den schweren Ketten im „Kopf“ assoziiert (Abbildung 3).



**Abbildung 3: Schematische Darstellung des Myosin-Moleküls. Die beiden schweren Ketten bilden den Schwanz des Moleküls. Die vier leichten Ketten sind in der Kopfregion assoziiert.**

In Vertebraten beginnt 7-8 Tage nach der Befruchtung die Bildung der Herzröhren. Zu diesem Zeitpunkt wird in diesem Gewebe die RNA der  $\alpha$ - und  $\beta$ -MyHCs exprimiert (Sassoon et al., 1988; Lyons et al., 1990). Nach der Bildung der Herzkammern wird  $\beta$ -MyHC ausschließlich in den ventrikularen Herzmuskelzellen gebildet,  $\alpha$ -MyHC wird in hohen Mengen in den atrialen Herzmuskelzellen exprimiert (Lompre et al., 1984).

Die Gene *nkx-2.5*, *mef-2* und *gata-4/5/6*, die während der Embryonalentwicklung in Regionen des späteren Herzens exprimiert werden, besitzen auch wichtige Funktionen in der Entwicklung des Herzens. Dass jedes dieser Gene für die Spezifizierung der Herzmuskulatur essentiell ist, haben *knock-out* Experimente gezeigt: Bei Mutanten wurden die Herzmuskelzellen zwar gebildet, das Herz war aber schwer geschädigt (Robbins; 1996).

### GATA reguliert *Myosin heavy chain*

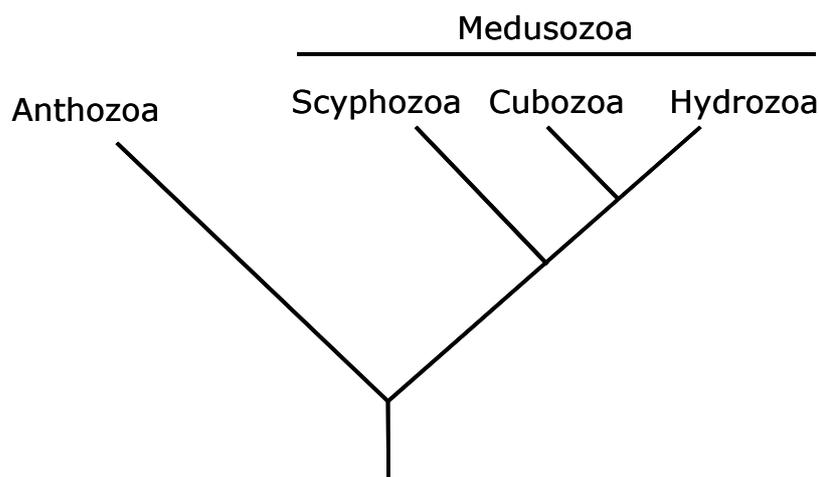
Myosin ist ein essentielles, kontraktiles Protein der Herzmuskulatur,  $\alpha$ - und  $\beta$ -MyHC sind in Herzmuskelzellen lokalisiert (Molkentin et al., 1994). *Gata-4*, in Vertebraten in Herzmuskelzellen und entodermalem Gewebe exprimiert, bindet an proximal-regulatorische DNA-Sequenzen von MyHC (Arceci et al., 1993; Buttrick et al., 1993). *Gata-4* wird im ventralen Mesoderm von *Xenopus* und Maus noch vor der Entwicklung der „cardiac tube“ exprimiert (Kelley et al., 1993). Dort interagiert es mit unterschiedlichen Bindestellen der  $\alpha$ -MyHC regulatorischen Region (Molkentin et al., 1994). Mäuse, die ein nicht-funktionierendes *gata-4*-Gen in sich tragen, sterben noch im Mutterleib. Sie haben zahlreiche Defekte in den Herzanlagen, die dazu führen, dass die Herzkammern an der Mittellinie nicht verbunden werden und so das Herz nicht lebensfähig ist (Molkentin et al., 1997). Trotz des Fehlens eines funktionierenden Herzens haben die Mutanten differenzierte Herzmuskelzellen. Die Ergebnisse implizieren, dass GATA-4 zwar für die Aufrechterhaltung der Morphologie des Herzens wichtig ist, aber keinen Einfluss auf die terminale Differenzierung der Herzmuskelzellen oder der Expression von *MyHC* hat. Scheinbar können zusätzliche GATA-Proteine, wie GATA-5 und -6, die ebenso im Herzgewebe lokalisiert sind, das Fehlen von GATA-4 kompensieren (Molkentin et al., 1997). Einige Zielgene, die von cis-regulatorischen GATA-Elementen abhängig sind, wurden bereits identifiziert. So zeigten Molkentin und Markham (1994), beispielsweise, dass GATA-4 in der Lage ist, den Herz-spezifischen Promoter des  $\alpha$ -*MyHCs* zu aktivieren.

Die Entstehung und Differenzierung der Muskulatur höherer Tiere ist hinreichend untersucht, Interaktionspartner wurden bereits identifiziert. Wann aber dieser komplizierte Prozess evolvierte und wie die Muskeldifferenzierung in einem phylogenetisch älteren Organismus funktioniert, ist noch weitgehend unbekannt. Um diesen und viele andere komplexe, biologische Prozesse zu erforschen und damit Rückschlüsse auf deren Entstehung zu ziehen, wurde die Anthozoe *Nematostella vectensis*, ein basaler Cnidarier, von Ulrich Technau als Modellorganismus etabliert.

### **Anthozoen sind basale Cnidarier**

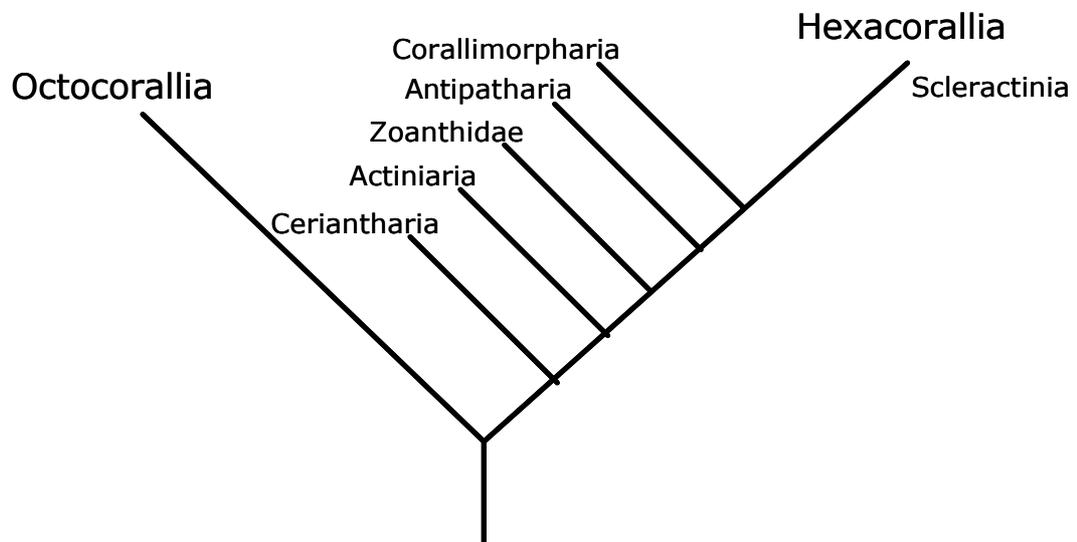
Cnidarier, oder Nesseltiere, besitzen als einzige Vertreter im Tierreich einen sehr komplexen Zelltyp, die Nesselzellen oder Cniden. Das sind Zellen, die der Verteidigung

und dem Beutefang dienen und für die Namensgebung des Stammes Pate standen. Cnidarier, und demnach auch *Nematostella*, nehmen eine basale Stellung im phylogenetischen Stammbaum ein. Nach Porifera und Placozoa sind die Cnidarier der letzte diploblastische Stamm vor der Evolution der triploblastischen Tiere und gelten als Schwestergruppe der Bilaterier (Collins, 1998). Während Poriferen phänotypisch keine Körperachse besitzen, sind Cnidarier die einfachsten Tiere im Stammbaum, die eine definierte Körperachse, die oral-aborale Körperachse bilden. Der Stamm der Cnidarier setzt sich aus den Klassen Cubozoa, Scyphozoa, Hydrozoa und Anthozoa, den Seeanemonen, zusammen. Anhand molekularbiologischer Analysen von 18S rRNA werden die Anthozoen als basale Gruppe innerhalb der Cnidarier eingeordnet (Bridge et al., 1995; Medina et al., 2001; Abbildung 4). Unterstützt wird diese Hypothese von morphologischen Analysen. Anthozoen, beispielsweise, existieren nur als Polypenform, sie generieren keine freischwimmende Meduse wie sie für die übrigen Klassen der Cnidarier charakteristisch ist. Diese Tatsache impliziert, dass die Polypenform ursprünglicher ist und die Meduse erst danach evolvierte. Auch die neueste Untersuchung von Collins et al., (2006) zeigt ein hypothetisches Modell, das auf molekularen Analysen der nukleären Ribosomen, der 28S Untereinheiten, beruht. Auch in diesem Modell sind die Anthozoen die Gruppe, die zuerst divergierte. Scyphozoen und Cubozoen stellen die Schwestergruppe zu den Hydrozoen, zusammengefasst werden sie als Medusozoen bezeichnet.



**Abbildung 4:** Stark vereinfachte, schematische Darstellung der phylogenetischen Stellung der Anthozoen innerhalb der Cnidarier. Anhand morphologischer und molekularer Daten werden die Anthozoen als basale Gruppe innerhalb der Cnidarier betrachtet (Bridge et al., 1995; Medina et al., 2001; Collins et al., 2006)

Die Anthozoen setzen sich aus zwei Unterklassen, den Octocoralliern und den Hexacoralliern, zusammen (Abbildung 5). Octocorallier haben meistens acht Septen und acht gefiederte Tentakel und sind stets koloniebildend. Hexacorallier haben meistens sechs Septen oder ein vielfaches davon. Die Seeanemonen, die Ordnung Actiniaria, gehören zu den Hexacorallier haben aber keinen für Hexacorallier typischen Körperaufbau. Während des Larvenstadiums wird der Körper von acht Mesenterien unterteilt und besitzt keine aborale Muskulatur. Dieses Larvenstadium ist transient, adulte Tiere generieren im Laufe der Entwicklung zwölf oder mehr Mesenterien (Daly et al., 2002).



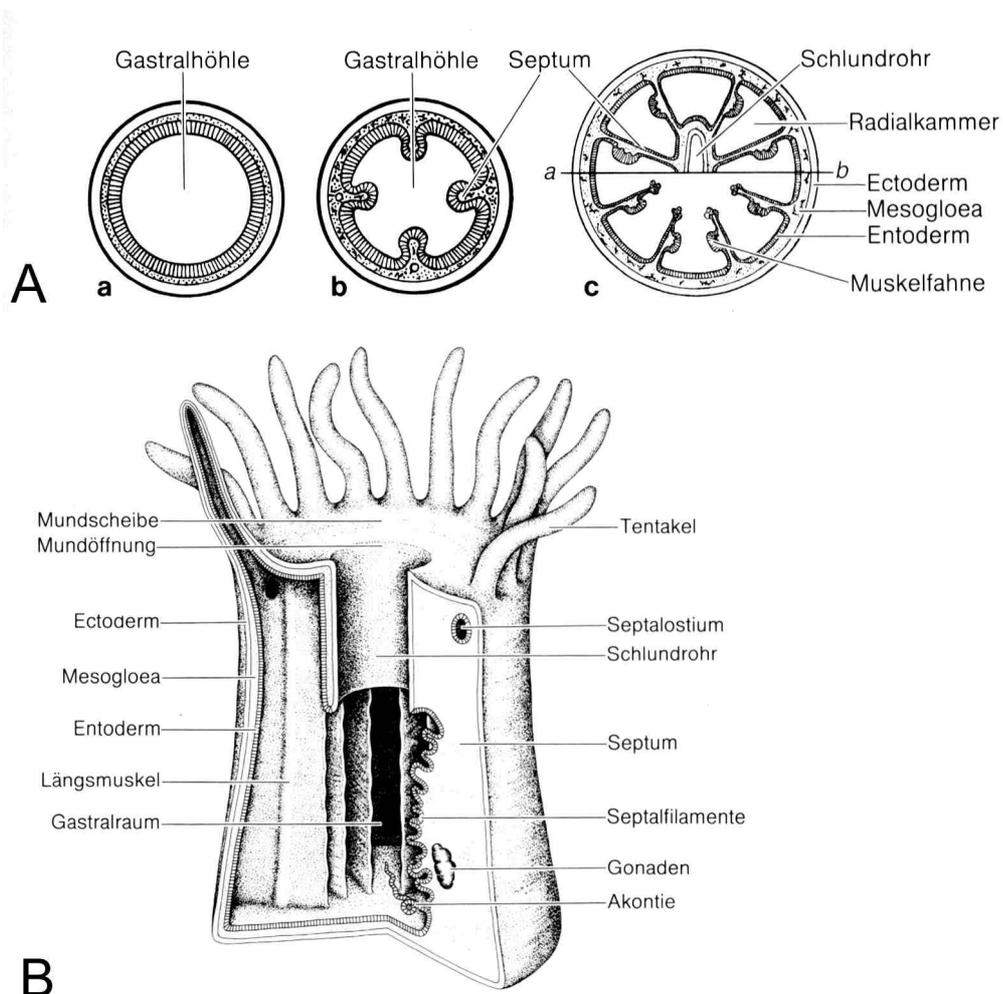
**Abbildung 5: Stark vereinfachter, schematischer Stammbaum der Anthozoen, basierend auf morphologischen und molekularen Daten (Daly et al., 2003).**

Der Körper der Seeanemonen ist einfach aufgebaut (Abbildung 6): Seeanemonen besitzen kein Skelett, der Körper wird von außen durch das Ektoderm und innen durch das Entoderm begrenzt. Zwischen beiden Epithelien liegt eine Art Bindegewebsschicht, die Mesogloea. Das Ektoderm besteht aus Epithelzellen, Nematocyten, Nervenzellen und Sinneszellen. Die apikalen Epithelzellen besitzen entweder Mikrovilli, die der Bewegung dienen oder Sinneshärchen, Cnidocile, die bei Reizung die Entladung einer Nesselkapsel induzieren. Die Mesogloea kann man in zwei Unterschichten einteilen. Die dem Ektoderm zugewandte Seite ist stark granulös. Dieser Bereich der Mesogloea setzt sich wahrscheinlich hauptsächlich aus Proteoglykanen zusammen. Die dem Entoderm zugewandte Seite der Mesogloea setzt sich, ähnlich wie bei *Hydra* zum großen Teil aus

Kollagenfibrillen zusammen (Sarras et al., 1991). Angrenzend an die Kollagenfibrillen liegen die Epithelmuskelzellen. Das Entoderm ist überwiegend aus entodermalen Epithelzellen aufgebaut, dazwischen sind Drüsenzellen eingebettet. Die kontraktile Fortsätze der Epithelmuskelzellen sind longitudinal im Ektoderm und ringförmig im Entoderm orientiert. Der Körper der Seeanemonen wird in drei Bereiche eingeteilt, die voneinander unabhängige Funktionen ausüben. Jede Region besitzt ein ihr angepasstes Muskelsystem zur Aufrechterhaltung des hydrostatischen Skeletts. Außerdem ist die Fußplatte für die Adhäsion an eine Oberfläche und Lokomotion zuständig. Der Mundbereich und die Tentakel sind primär für das Fangen der Beute und deren Fressen eingerichtet. Der wichtigste Bereich, der die Form des Tieres erhält und es zu Bewegungen befähigt, ist die mit dem Rumpf assoziierte Muskulatur (Batham und Pantin, 1951). Da Anthozoen kein klassisches Skelett ausbilden, müssen sie ihre Körperspannung durch ein hydrostatisches Skelett aufrechterhalten. Bei diesem Vorgang spielen Muskeln eine wichtige Rolle. Durch bewimperte Kanäle, die Siphonoglyphen, wird Wasser in den Rumpf gepumpt. Die Festigkeit wird dabei von den Muskeln gesteuert. Durch Kontraktion der Ringmuskulatur verringert sich der Durchmesser des Polypen und der Wasserdruck im Gastralraum führt zur Elongation des Körpers. Die Elongation des Körpers führt zur gleichzeitigen Verlängerung der longitudinalen Muskeln in den Mesenterien. Werden die longitudinal angeordneten Retraktormuskeln wieder angespannt, werden gleichzeitig die Ringmuskeln gestreckt und der Durchmesser des Polypen nimmt wieder zu. Das Zusammenspiel zwischen Ring-, Retraktor- und Parietalmuskulatur ermöglicht es also dem Polypen, auf die Umgebung zu reagieren, sich den Strömungsgegebenheiten anzupassen oder auf Fraßfeinde zu reagieren.

Das longitudinale Muskelsystem wird von der Parietalmuskulatur und Retraktormuskulatur gebildet und läuft entlang der oral-aboralen Achse. Die Parietalmuskulatur liegt an der Basis des Mesenteriums und geht direkt in die entodermale Ringmuskulatur über. Die Retraktormuskulatur ist ebenfalls im Mesenterium lokalisiert und liegt dort zwischen der Parietalmuskulatur und dem Verdauungsapparat. Im rechten Winkel dazu verlaufen transversale bzw. radiäre Muskelstränge, die der Parietalmuskulatur entgegenwirken. Zwei verschiedene Muskelfasertypen wurden in Seeanemonen identifiziert. In den freischwimmenden Tieren *Stomphia* und *Aiptasia* wurden Muskelfasern vom Typ A und

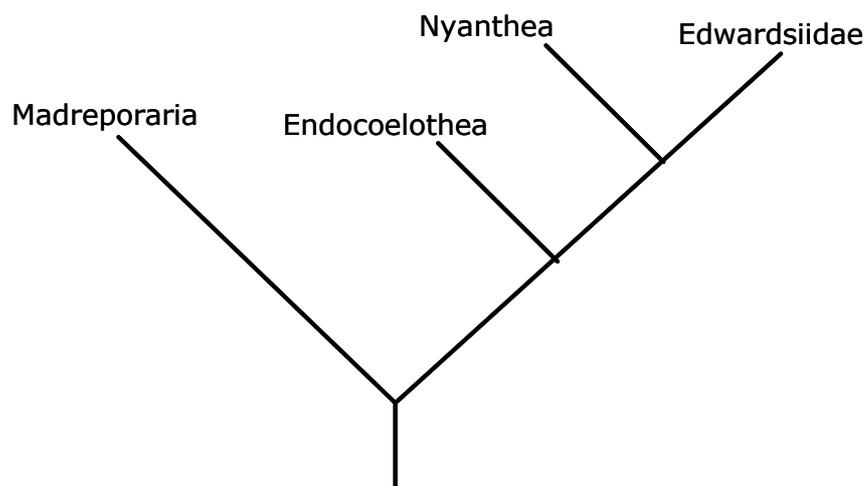
Typ B beschrieben, die sich in ihrer Struktur, Größe, ihrer Reaktion auf die Fixierung und der histologischen Färbung unterscheiden und mit der schnellen und langsamen Muskulatur höherer Tiere vergleichbar sind (Amerongen und Peteya, 1980).



**Abbildung 6: Schematische Querschnitte der Cnidarier (A; a, Hydrozoa; b, Scyphozoa; c, Anthozoa) und schematischer Längsschnitt der Anthozoen (B).**

Die adulten Polypen einer Familie der Anthozoen, der Edwardsiidae (Abbildung 7), behalten den larvalen Körperbau mit seinen acht Mesenterien, zusätzlich fehlt ihnen die basale Fußscheibe (Basiliarmuskulatur). Daly et al., (2002) greifen in ihrer Arbeit mehrere Hypothesen auf, welche phylogenetische Stellung die Edwardsiidae innerhalb der Actinien einnehmen. Die fehlende Basiliarmuskulatur sowie die geringe Anzahl vollständiger Mesenterien könnte auf eine basale phylogenetische Stellung der Edwardsiidae innerhalb

der Actinien oder aber den sekundären Verlust ebendieser Merkmale während der Evolution hinweisen. Die Ergebnisse der Arbeit konnten zu keinem eindeutigen Szenario führen. Pädormorphismus, das Vorhandensein larvaler, juveniler Strukturen in adulten Tieren einer Art, könnte ein möglicher Mechanismus für die Ausbildung der geringen Anzahl an Mesenterien, nicht aber der fehlenden Basiliarmuskulatur sein (Daly et al., 2002).



**Abbildung 7: Stark vereinfachter, schematischer Stammbaum der Actinien.**

Histologische Studien über die Klasse der Anthozoen wurden bereits von Fautin und Mariscal zusammengefasst und detailliert veröffentlicht (1991). Die Histologie und Molekularbiologie der Edwardsiidae weist jedoch noch viele Lücken auf. Gerade hinsichtlich der Frage der phylogentischen Bedeutung der Cnidarier, insbesondere der Anthozoen und Edwardsiidae, ist es von Wichtigkeit, mehr über *Nematostella vectensis* als Vertreter der Edwardsiidae zu erfahren.

### ***Nematostella vectensis***

Die Seeanemone *Nematostella vectensis* gehört zu der Unterordnung Actiniaria, zu der Familie Edwardsiidae. 1935 wurde *Nematostella* von dem Engländer Thomas Alan Stevenson (1898–1961) auf der Kanalinsel Wight entdeckt. Außerdem wurde sie in Brackwasserregionen Südostenglands, entlang der amerikanischen Pazifik- und

Atlantikküste und dem Golf von Mexico lokalisiert. Es wurden bisher zahlreiche Arten beschrieben und detailliert charakterisiert.

*Nematostella vectensis* vereint, im Vergleich zu anderen Arten der Seeanemonen, einige einzigartige Besonderheiten. Während die meisten Seeanemonen marine, stenohaline Organismen sind, stellt *Nematostella* eine Ausnahme hinsichtlich ihres Habitats dar. *Nematostella* ist euryhalin, sie kommt ausschließlich im Brackwasser vor, wo die Flüsse in das Meer münden (Stephenson, 1928; 1935). Dort leben die Tiere bis zum Tentakelkranz eingegraben im Sediment und ernähren sich von Mollusken, Crustaceen, Nematoden, Polychaeten und Insekten (Frank und Bleakney, 1978). *Nematostella vectensis* wird in ihrer natürlichen Umgebung ungefähr 1,5cm, unter Laborbedingungen sogar bis zu 15cm lang (Abbildung 8).

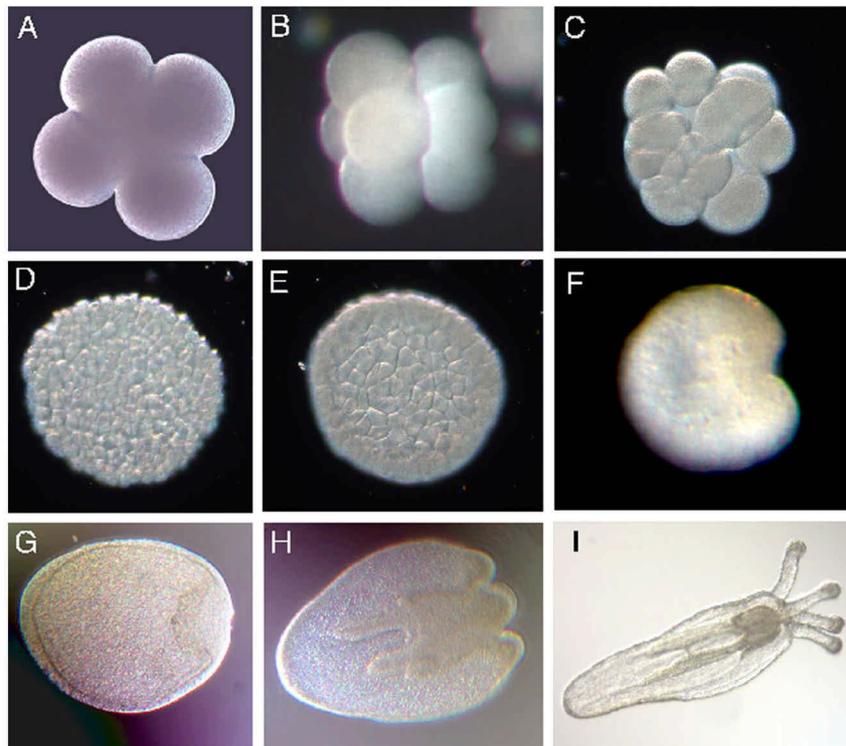


**Abbildung 8:** *Nematostella vectensis* (Fotografie von Timm Nüchter).

Der Körper gliedert sich in einen Kopf-, Rumpf- und Fußbereich. Der Kopfbereich wird vom Tentakelkranz und dem Mund gebildet. Ein Teil des Mundes ist nach innen gestülpt und formt so den Schlund, den sogenannten Pharynx. Die Basis des Pharynx ist mit dem oberen Bereich der Mesenterien verbunden. *Nematostella* hat acht Mesenterien, die

unterhalb der Pharynxregion frei in den Gastralraum hinein reichen und diesen so unterteilen.

Ein großer Vorteil, den *Nematostella* als Modellorganismus hat, ist die zugängliche Embryologie. Die Tiere sind getrenntgeschlechtlich, die weiblichen Tiere legen ihre Eipakete in einer Gallerthülle, die Männchen geben ihre Spermien unter bestimmten Umständen an die Umgebung ab (Fritzenwanker und Technau, 2002). Eine erste Teilung erfolgt ungefähr drei Stunden nach der Befruchtung. Jede weitere Teilung erfolgt zunächst synchron, in allen Blastomeren, ca. stündlich in Abhängigkeit von der Temperatur des Mediums (Fritzenwanker und Technau, 2002). Die Embryonen entwickeln sich über frühe Zellstadien, Blastula und Gastrula zur Planularlarve. Aus der Planularlarve entsteht nach einem Metamorphosestadium der Primärpolyp (Abbildung 9). Bis die Primärpolypen zum adulten Tier gewachsen sind, vergehen ab der Befruchtung ungefähr drei Monate, abhängig von den Haltebedingungen.



**Abbildung 9: Embryonalentwicklung von *Nematostella vectensis*. A: Vierzellstadium. B: Achtzellstadium. C: Frühe Teilung. D: Morula. E: Blastula. F: Gastrula. G: Planularlarve. H: Metamorphose-Stadium. I: Primärpolyp (Bilder: Jens Fritzenwanker).**

## ***Nematostella* als molekularbiologischer Modellorganismus**

Zum besseren Verständnis der Evolution der Körperbaupläne höherer Tiere, sind Cnidarier ein etabliertes Modellsystem. Einer der Hauptunterschiede zwischen Cnidariern und Bilateriern ist das Fehlen des dritten Keimblattes, des Mesoderms. Neuere Studien haben gezeigt, dass das Genom der Cnidarier eine große Vielfalt von Genen beinhaltet, die bei Vertebraten in die Bildung und Differenzierung des Mesoderms involviert sind (Technau und Bode, 1999; Yanze et al., 1999; Spring et al., 2000; Scholz und Technau, 2002; 2003; Martindale et al., 2004; Fritzenwanker et al., 2004; Magie et al., 2005; Technau et al., 2005; Miller et al., 2005). In den letzten Jahren konnte die Seeanemone *Nematostella vectensis* zu einem wichtigen Modellorganismus für die Embryologie der Cnidarier etabliert werden (Hand und Uhlinger, 1992; Fritzenwanker und Technau, 2002; zusammengefasst in Darling et al., 2005). Da Anthozoen von den meisten Forschern als basale Gruppe innerhalb der Cnidarier angesehen werden (Bridge et al., 1992; Collins, 2005; Collins et al., 2006; Abbildung 4), geben ihre Untersuchungen an dieser Gruppe eine wertvolle Einsicht in Funktionen, die Cnidarier und Bilaterier gemeinsam haben.

Interessanterweise werden viele mesodermale Gene, die aus *Nematostella vectensis* isoliert wurden, während der Gastrulation um den Urmund, den Blastoporus oder im voraussichtlichen Entoderm des Tieres exprimiert (Scholz und Technau, 2003; Martindale et al., 2004; Fritzenwanker et al., 2004; Magie et al., 2005). Diese Tatsache deutet darauf hin, dass eben diese Gene eine ancestrale Funktion in diesen Prozessen besitzen (zusammengefasst in Technau, 2003; Technau und Scholz, 2004).

## **Ziele der vorliegenden Arbeit**

In höheren Tieren wird die Muskulatur aus dem dritten Keimblatt, dem Mesoderm gebildet. Cnidarier besitzen kein Mesoderm, haben aber dennoch mesodermspezifische und muskelspezifische Gene sowie eine Muskulatur entodermalen Ursprungs. Diese Arbeit soll zur Klärung der Frage beitragen, wie die Muskeldifferenzierung bei Organismen funktioniert, die kein Mesoderm besitzen. Dies kann auch Hinweise darüber geben, wann das Mesoderm evolvierte bzw. wann die Gene evolvierten, die für die Differenzierung der Muskulatur eine Rolle spielen.

An dem basalen Cnidarier *Nematostella vectensis* wurde die Muskeldifferenzierung histologisch und molekularbiologisch untersucht. Gene, die in höheren Tieren bei der Muskelentwicklung involviert sind, wurden isoliert und charakterisiert. Die Ergebnisse sollen Hinweise auf die Entstehung der Muskulatur hinsichtlich der Evolution des Mesoderms geben.

## 2. Material und Methoden // Allgemein

### **Versuchstiere – *Nematostella vectensis***

*Nematostella vectensis* wird taxonomisch wie folgt eingeordnet:

Stamm: **Cnidarier**

Überklasse: **Anthozoa**

Klasse: **Hexacorallia**

Ordnung: **Actiniaria**

Unterordnung: **Nynantheae**

Familie: **Edwardsiidae**

Die in Darmstadt kultivierten Tiere stammen aus einer Kultur von Cadet Hand und sind F1- und F2-Nachkommen zweier Individuen, CH2 und CH6.

### **Kultivierung von *Nematostella vectensis* und Induktion der Gametogenese**

Die Tiere wurden in Aquarien oder nach Geschlechtern getrennt in speziell angefertigten Behältern in 1/3 künstlichem Seewasser (Nematostellamedium; Tropic Marin) bei 18°C kultiviert. Gefüttert wurden die Tiere 3 mal pro Woche mit Naupliuslarven von *Artemia salina*. Einmal pro Woche wurde das Nematostellamedium gewechselt. Die Induktion der Gametogenese wurde durch einen Temperaturwechsel von 18°C auf 24°C und einem Wechsel von dunkel nach hell erreicht (Fritzenwanker und Technau, 2002). Nach der Befruchtung dauerte die Entwicklung der Embryonen zur Planularlarve drei, zum Primärpolypen 10 Tage bei 18°C.

### **Relaxierung und Fixierung zur Präparation von Flat mounts zur Untersuchung der Muskulatur**

Um die Muskulatur adulter Polypen zu untersuchen, wurden die Tiere nach einer Methode von Batham und Pantin (1951), zunächst relaxiert und anschließend fixiert. Adulte Polypen, die mehrere Tage ungefüttert waren, wurden in eine Petrischale mit Nematostellamedium gelegt. Zur Relaxierung der Tiere wurde langsam ein halbes

Volumen 7,14% Mg in Nematostellamedium hinzupipettiert. Die entspannten Tiere wurden über eine Stunde lang in dieser Lösung inkubiert. Alle 15 Minuten wurde den Tieren die Lösung mit einer abgeflamnten Glaspipette in den Hohlraum pipettiert um auch die inneren Muskeln, die in den Mesenterien lokalisiert sind, zu relaxieren. Nach einer Stunde wurde die Relaxierungslösung durch das Fixativ, 4% Paraformaldehyd in Nematostellamedium, pH 7,4-7,8, ersetzt. Auch das Fixativ wurde alle 15 Minuten in den Hohlraum der Tiere pipettiert, um eine gute Fixierung der Mesenterien zu gewährleisten. Nach 2 Stunden Fixierung wurden die Tiere mehrmals in PBS gewaschen. Die Polypen wurden in eine große Glaspetrischale überführt, die mit Dentalwachs gefüllt war. In die Mitte der Schale wurde Vaseline gegeben um das Präparat gleitfähig zu halten und damit sein Zerreißen zu verhindern. Die Polypen wurden danach der Länge nach aufgeschnitten, um die Mesenterien zugänglich zu machen. Hierzu wurden die Polypen mit einem Skalpell vom Tentakelkranz zum Fuß aufgeschnitten und aufgeklappt. Das Präparat wurde mit Stecknadeln auf dem Wachs fixiert und entweder mikroskopiert, mit Phalloidin gefärbt oder die Mesenterien wurden herausgeschnitten und weiter untersucht.

## **Mikroskopie und Fotografie der Präparate**

### Lichtmikroskopie

Die Präparate wurden mit dem Axiovert 100 Mikroskop (Zeiss) mikroskopiert und mit einer Digitalkamera (Canon Power Shot G5) fotografiert. Die digitalen Bilder wurden mit der Software Photoshop von Adobe bearbeitet.

### Elektronenmikroskopie

Die Ultradünnschnitte wurden mit dem Ultracut der Firma Leica hergestellt. Die Bilder wurden mit dem Elektronenmikroskop Zeiss EM 109 und zugehöriger Kamera der Firma Leica betrachtet bzw. fotografiert. Die Negative der entwickelten Filme wurden eingescannt und im BMP- oder JPEG-Format abgespeichert.

### 3. Material und Methoden // Histologie

#### **Schnitttechniken und Einbettverfahren**

##### Einbettung von *Nematostella vectensis* zur Herstellung von Kryotomschnitten

Unterschiedliche Entwicklungsstufen oder Gewebestücke von *Nematostella vectensis* wurden über Nacht bei 4°C in 4% PFA in Nematostellamedium fixiert. Am folgenden Tag wurden die Proben fünfmal für je 5 Minuten in PBS gewaschen. Es wurden zwei verschiedene Varianten der Einbettung vorgenommen. Zum einen wurden die Proben in eine Lösung aus 25% Sucrose in PBS gegeben und über Nacht darin inkubiert. Die Tiere oder Gewebestücke sanken ab und wurden direkt am Kryotom auf einen gefrorenen Sucrosetropfen (100%) gegeben und festgefroren. Die Präparate wurden am Kryotom geschnitten (Kryotomeinstellung: Kammertemperatur – 25°C; Blocktemperatur – 40°C; Schnittdicke 15-25µm).

Eine weitere Variante zur Einbettung von *Nematostella* zur Herstellung von Kryotomschnitten basiert auf einer für Zebrafisch verwandten Methode, die in der Arbeitsgruppe von Thomas Becker, SARS Centre of Marine Molecular Biology, Bergen, Norwegen. Als Einbettmedium wurde Tissue Tec (Plano) anstelle der Sucroselösung verwendet. Als Form zur Orientierung der Proben diente der zylindrisch geformte Teil einer 1000µl Pipettenspitze. Dieser wurde auf einen Objektträger gestellt und zur Hälfte mit Tissue Tec gefüllt. Die Tiere bzw. Gewebestücke wurden hineingelegt und unter dem Binokular wie gewünscht orientiert. Die Objektträger wurden langsam auf einen Metallblock gezogen, der zuvor eine halbe Stunde in flüssigem Stickstoff lag. Das Tissue Tec mit dem Gewebe im Förmchen begann sofort durchzufrieren. Kurz bevor das Präparat ganz durchgefroren war, wurde das Förmchen bis oben mit Tissue Tec gefüllt und einige Sekunden gewartet bis das Präparat durchgefroren war. Mit einem Skalpell wurde das Förmchen an der Seite eingeschnitten, der gefrorene Präparateblock herausgenommen und bis zum Schneiden auf den Metallblock gelegt. Die Präparate wurden am Kryotom geschnitten (Kryotomeinstellung: Kammertemperatur – 25°C; Blocktemperatur – 40°C; Schnittdicke 15-25µm).

### Einbettung von *Nematostella vectensis* zur Herstellung von Vibratomschnitten

Um eine detaillierte Beschreibung der Expressionsmuster von *Gata* und *Myosin heavy chain* zu machen, wurden zuvor grob geschnittene, adulte Polypen nach der *in situ*-Hybridisierung mit dem Vibratom in 70-100µm dünne Querschnitte geschnitten. Hierzu wurden die Tiere nach der Färbereaktion 30 Minuten in 4% PFA, pH 7,4-7,8 in PBS bei Raumtemperatur refixiert. Das Fixativ wurde durch sechs Schritte von je 5 Minuten in PBS ausgewaschen. Als Förmchen für die Tiere wurden Eiswürfelbehälter verwendet, für jedes Förmchen wurden 5,5ml Einbettmedium, bestehend aus einem BSA/Gelatine-Mix, verwendet. Für den BSA/Gelatine-Mix wurde PBS mit 0,5% Gelatine auf 60°C erhitzt bis alles gelöst war. Die Mischung wurde auf Raumtemperatur abgekühlt und mit 15,6% BSA und 20% Sucrose gemischt und gelöst. Der BSA/Gelatine-Mix konnte nun in Falcon-Röhrchen aufgeteilt und bei -20°C eingefroren werden. Vor dem Einbetten wurden die Gewebestücke mit 1-2 Tropfen Glutaraldehyd (25%, Sigma) benetzt. In einem Falcon-Röhrchen wurden 5ml BSA/Gelatine-Mix vorgelegt. Kurz vor dem Einbetten wurden dem Mix 1/10 Volumen 25% Glutaraldehyd hinzugegeben, 2-3mal invertiert und in die Förmchen gegossen. Da die Polymerisierung nach etwa 30 Sekunden startet, mussten die Gewebestücke schnell in das Einbettmedium gelegt und mit einer Pinzette orientiert werden. Nach 15-30 Minuten war die Polymerisierung abgeschlossen. Der Block konnte vorsichtig aus dem Förmchen entfernt, mit einer Rasierklinge getrimmt und zum Schneiden am Vibratom verwendet werden. Die Rasierklingen, die zum Schneiden der Blöcke in die Vorrichtung des Vibratoms eingespannt wurden, mussten fettfrei sein und wurden daher in Acteon gelagert. Die Schnitte wurden in mit einem Pinsel aus der Kammer gefischt und jeder Schnitt wurde in eine 24-Kavitäten Platte gegeben und danach mit dem Pinsel auf einen Objektträger gezogen. Mit Kaisers Glyceringelatine (Sigma) wurden die Schnitte dauerhaft montiert.

### Einbettung von *Nematostella vectensis* zur Herstellung von Semi- und Ultradünnschnitten

Um licht- und ultramikroskopische Untersuchungen der Anatomie und Histologie der Tiere zu ermöglichen, musste das Gewebe mehreren vorbereitenden Behandlungen unterzogen werden. Nach einer Fixierung des Gewebes folgt dessen Dehydrierung, seine Infiltration

und Einbettung. Alle folgenden Schritte wurden in sogenannten Schnappdeckelgläsern durchgeführt. Die Primärpolypen und adulte Polypen wurden vor der Fixierung mit 7,14% Mg relaxiert. Nach ca. 15-30 Minuten wurden die Tiere in 4% PFA und 2% GA in PBS für 2 Stunden auf Eis fixiert, danach folgten 5 Waschrunde von je 5 Minuten auf Eis. Über Nacht wurden die Tiere in 1% Osmiumtetroxid in PBS nachfixiert und vorkontrastiert. Anschließend wurden die Tiere 5 mal je 5 Minuten auf Eis gewaschen. Die Dehydrierung wurde mit einer aufsteigenden (25%, 50%, 70%, 95%, 100% in PBS) MeOH-Reihe (alles eiskalt) durchgeführt. In 70% MeOH konnten die Tiere bis auf weiteres gehalten werden. Nach der Dehydrierung folgte die Infiltration und die Tiere wurden 30 Minuten in eiskaltem MeOH und eiskaltem Propylenoxid im Verhältnis 1:1 für inkubiert. Nach einem ersten Inkubationsschritt in 100%, eiskaltem Propylenoxid für 30 Minuten folgte dessen Wiederholung bei Raumtemperatur. Danach wurde der Alkohol als Komponente durch das Einbettmedium Polybed ersetzt. Im ersten Schritt wurden die Proben in einer Mischung von Propylenoxid und Polybed im Verhältnis 3:1, danach im Verhältnis 1:1 für je 3 Stunden inkubiert. Ein dritter Schritt folgte über Nacht in einem Verhältnis der Propylenoxid-Polybedmischung von 1:3. Am nächsten Tag wurde die Mischung durch 100% Polybed ersetzt und wiederum über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Vor der Polymerisierung des Einbettmediums wurden die Proben in frisches Polybed überführt und in Beem-Kapseln oder Flacheinbettförmchen unter dem Binokular je nach Wunsch ausgerichtet. Die Polymerisierung erfolgte bei 70°C für 2-3 Tage. Nach der Aushärtung der Präparate wurden diese mit dem Ultracut (Leica; Angaben des Herstellers) in Semi- oder Ultradünnschnitte geschnitten.

Um Semidünnschnitte zu erhalten, wurden die Präparate mit einem Glasmesser (Knifemaker, Leica; Angaben des Herstellers) 1-2µm dick geschnitten. Die Schnitte wurden in einem Tropfen Wasser auf einem Objektträger (Superfrost Plus, Gläser und Menzer) gesammelt und auf einer Heizplatte getrocknet. Danach wurden die Schnitte mit einer Lösung aus 0,1% Toluidinblau und 0,1% Natriumborat (Borax) in ddH<sub>2</sub>O beträufelt, einige Sekunden auf der Heizplatte inkubiert und anschließend mit ddH<sub>2</sub>O wieder gewaschen. Bei dieser Färbung werden alle Strukturen angefärbt, die als basophil bekannt sind, wobei die Blaufärbung mit der Elektronendichte des Gewebes korreliert. Die Schnitte

wurden mit einigen Tropfen eiskaltem Polybed versehen und eingedeckelt. Die Präparate konnten nun lichtmikroskopisch ausgewertet werden.

Die Ultradünnschnitte von 90nm Dicke wurden mit einem Diamantmesser (Hersteller: Diatome) hergestellt. Die Schnitte wurden mit einer Wimper aus der Metallwanne gefischt und auf ein beschichtetes Kupfernetz gezogen. Biologische Objekte bestehen zum überwiegenden Teil aus Atomen niedriger Ordnungszahlen (Kohlenstoff, Wasserstoff, Stickstoff, Sauerstoff) und erzeugen einen nur geringen Kontrast. Zur Erhöhung der Elektronendichte und damit zur Erhöhung des Kontrasts im Präparat wurden die Schnitte auf den Netzen in zwei Schritten je 2 Minuten mit einer 1%igen ethanolischen Lösung Uranylacetat und Bleicitrat nachkontrastiert. Durch die Behandlung mit den Salzen der Schwermetalle Uran und Blei wird die Elektronendichte in den Bereichen der biologischen Strukturen, wie Zellen, Organellen, Proteinen und Nukleinsäuren erhöht. Elektronenmikroskopische Bilder sind stets schwarz-weiß. Der Schwärzungsgrad spiegelt die Elektronendichte im durchstrahlten Präparat wider. Nach der Schwermetallkontrastierung konnten die Schnitte auf Kupfer-beschichtete Netze mit einer Maschengröße von 250 nm im Elektronenmikroskop betrachtet werden.

### **Färbung von filamentösem Aktin (F-Aktin) mit Phalloidin**

Die vom Grünen Knollenblätterpilz (*Amanita phalloides*) stammenden Phallotoxine, insbesondere das Phalloidin, schädigen die Zellen lebender Organismen durch deren Aufnahme in das Cytoplasma und deren Bindung an Aktinfilamente (Wieland und Govindan, 1974; Faulstich et al., 1975). Diese Eigenschaft wurde verwendet, um F-Actin von *Nematostella vectensis* durch eine Färbung mit Phalloidin sichtbar zu machen und damit den Nachweis von Muskelgewebe zu erbringen.

Je nachdem, ob Embryonalstadien, Primärpolypen, adulte Polypen oder Flat mounts mit Phalloidin gefärbt wurden, wurden die Tiere unterschiedlich relaxiert und fixiert. Die Flat mounts wurden vor der Phalloidinfärbung wie oben beschrieben, nach Batham und Pantin, (1951) vorbehandelt. Primärpolypen und adulte Polypen wurden vor der Phalloidinfärbung zunächst in Nematostellamedium entspannt und durch die Zugabe einiger Tropfen 7,14% Mg in Nematostellamedium, gelähmt. Embryonen und Polypen wurden über Nacht bei 4°C

in 4% PFA in Nematostellamedium pH 7,4-7,8, fixiert. Am nächsten Tag wurden die Präparate fünfmal für je 5 Minuten in PBS gewaschen und dann 30 Minuten in PBS mit 0,1% Triton X100 inkubiert, um die Zellen zugänglicher zu machen. Danach erfolgte eine Inkubation für 30 Minuten in PBS mit 1% Rinderserumalbumin (BSA) um freie Aminosäuren zu blockieren. In 1U/ml Phalloidinlösung in PBS/BSA, die an den Fluoreszenzfarbstoff Alexa 488 (Molecular Probes; Stammlösung 100U/ml) gekoppelt ist, wurden die Proben 1h bei Raumtemperatur inkubiert. Ungebundenes Phalloidin wurde durch dreimaliges Waschen der Proben für 10 Minuten in PBS entfernt. Die Proben bzw. Tiere wurden in 10% PBS in Glycerin auf Objektträgern montiert und mit einem Alexa 488 Filter am Fluoreszenzmikroskop mikroskopiert und aufgenommen.

### **Quantitative Analyse**

Um eine Verteilung über die Zeitpunkte wichtiger Entwicklungsstufen und Sterberaten während der Entwicklung von *Nematostella vectensis* zu erhalten, wurde eine quantitative Analyse durchgeführt. Hierzu wurde eine Stichprobe von 2 x 50 Tiere verwendet, die über mehrere Monate beobachtet wurden. Die Embryonen wurden kurz nach der Befruchtung aus der Eihülle entfernt und auf die Kavitäten von 24-well-Platten aufgeteilt. Jedes Ereignis während der Embryonalentwicklung, des Metamorphosestadiums und der weiteren Entwicklung zum primären- und adulten Polypen wurde genau dokumentiert.

## 4. Material und Methoden // Molekularbiologie

### **Isolierung von cDNA-Klonen aus *Nematostella vectensis***

#### Auswertung der PCR-Ergebnisse

Alle PCR-Reaktionen wurden auf Agarosegele aufgetragen. Unter UV-Licht wurden die Banden sichtbar, mit einem Skalpell zur weiteren Verwendung ausgeschnitten und/oder fotografiert.

#### Isolierung von Gesamt-RNA aus Gewebe

Aus unbefruchteten Eiern, Embryonen, verschiedenen Entwicklungsstadien und adulten Polypen wurde die Gesamt-RNA isoliert (Suzuki et al., 2001). Embryonen wurden, wenn nötig, vor der Lyse durch die Behandlung in einer 2%igen Cysteinlösung in Nematostellamedium, pH 7,4-7,8 von der Gallerthülle befreit. Die gewonnene RNA wurde mit LiCl gefällt und die DNA wurde mit DNaseI verdaut um Kontaminationen mit genomischer DNA zu vermeiden.

#### Synthese von cDNA als Matrize zur Isolierung von *gata*, *Myosin Heavy chain (MyHC)* und RT-PCR

Die RNA wurde mit der Reversen Transkriptase „Superscript“ (Invitrogen; Angaben des Herstellers) mit einem Gemisch aus zufälligen Oligonukleotiden (Invitrogen) in cDNA umgeschrieben. Nach dem Stoppen der Reaktion durch eine Erhitzung des Reaktionsansatzes auf 70°C wurde diesem das gleiche Volumen TE-Puffer zugesetzt, um die cDNA zu stabilisieren. Als Kontrolle wurden Ansätze mitgeführt, die ohne Reverse Transkriptase inkubiert wurden (RT-Kontrolle).

#### Synthese von cDNA als Matrize zum Komplettieren eines Genfragments in 5'Richtung

Die cDNA, die als Matrize in der 5'-RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends) verwendet wurde, wurde mit dem „Gene Racer“-System (Invitrogen; Angaben des Herstellers) hergestellt. Hierfür wurde aus der Gesamt-RNA der Zellen zunächst die mRNA angereichert (Oligotex mRNA Mini Kit; Angaben des Herstellers). Als

Oligonukleotide zum Start der Reversen Transkription wurden Gene-Racer-Sequenzen gewählt.

### Synthese von cDNA als Matrize zum Komplettieren eines Genfragments in 3'Richtung

Für die Synthese der Matrize zum Amplifizieren der 3'Enden wurde die angereicherte mRNA mit einem oligo-dT-Oligonukleotid (Q(T): CCA GTG AGC AGA GTG ACG AGG ACT CGA GCT CAA GCT TTT TTT TTT TTT TTT T) nach Frohmann (1995) beginnend beim Poly-A-Schwanz der mRNA mit der reversen Transkriptase „Superscript“ (Angaben des Herstellers) in cDNA umgeschrieben.

### Polymerasekettenreaktion

Eine Polymerasekettenreaktion setzt sich aus verschiedenen Schritten zusammen. Sie beginnt mit einem Denaturierungsschritt bei 95°C, bei dem sich die Stränge der DNA trennen. Es folgt ein Annealingschritt, dessen Temperatur von den Oligonukleotiden abhängig ist und bei dem die in der Lösung frei vorhandenen Oligonukleotide an die einzelstrangige DNA binden. Im anschließenden Elongationsschritt wird die Temperatur auf 72°C erhöht, sodass die Taq-Polymerase in ihrem Temperaturoptimum die Lücke zwischen den auf der Einzelstrang-DNA gebundenen Oligonukleotiden mit Nukleotiden auffüllen kann.

### **Isolierung von *gata* aus *Nematostella vectensis***

#### PCR mit degenerierten Oligonukleotiden

Die RNA von Planularlarven und Primärpolypen wurde isoliert und in cDNA umgeschrieben. Durch Alignments unterschiedlicher GATA-Aminosäuresequenzen höherer Tiere wurden die konservierten Bereiche ermittelt, um Primer zur jeweiligen Isolation der Fragmente abzuleiten. Folgende Oligonukleotidkombinationen wurden zur Isolierung des *gata*-Fragments gewählt:

1. PCR-Durchgang mit Gata5'outer und Gata3'outer
2. Nested PCR mit Gata5'inner und Gata3'inner

Die PCR-Ansätze hatten jeweils ein Volumen von 25µl, das sich aus 1µl cDNA, 25mM dNTPs, je 100pmol der Oligonukleotide und 1U Taq-Polymerase in 1x Polymerasepuffer mit 0,5mM MgCl<sub>2</sub> zusammensetzte. Es wurden 35 Zyklen durchgeführt, Denaturierung (bei 95°C), Oligonukleotidanlagerung (bei 42°C) und Elongation (bei 72°C) dauerten jeweils 1 Minute. Zum Anschluss wurde ein fünfminütiger Elongationsschritt durchgeführt, um der Polymerase die Möglichkeit zu geben, jedes begonnene Fragment zu komplettieren.

Nach einer ersten PCR wurde ein Aliquot des ersten PCR-Ansatzes (1µl) als Matrize in einer zweiten PCR mit inneren Oligonukleotiden unter gleichen Reaktionsbedingungen eingesetzt.

### Komplettieren des *gata*-Fragments durch Rapid Amplification of cDNA Fragments (RACE)

#### 3'RACE

Bei der 3'RACE führt man die cDNA-Synthese mit einem am 3'Ende liegenden, modifizierten Oligo-dT-Nukleotid durch, dessen Sequenz dann von einem äußeren und einem inneren Oligonukleotid (Q(o) und Q(i)) erkannt wird. Die 5'Seite besteht aus einem selbstgewählten sequenzspezifischen Oligonukleotid.

Folgende spezifische Oligonukleotide wurden zur Verlängerung des *gata*-Klons in 3'Ende verwendet:

Genspezifische Oligonukleotide: Gata5'RACE 1 + Gata5'RACE 2 (Sequenzen siehe Anhang)

Q (o)            CCA GTG AGC AGA GTG ACG

Q (i)            GAG GAC TCG AGC TCA AGC

Die PCR-Ansätze hatten jeweils ein Volumen von 25µl, das sich aus 1µl cDNA, 25mM dNTPs, und 1U Taq-Polymerase in 1x Polymerasepuffer mit 0,5mM MgCl<sub>2</sub> zusammensetzte. Von der 3'-Richtung wurden in zwei aufeinanderfolgenden PCR-Reaktionen je 100pmol der Oligonukleotide Q(o) und Q(i) sowie von der 5'-Richtung zwei

genspezifische Oligonukleotide mit einer Konzentration von 20pmol verwendet. Es wurden 35 Zyklen durchgeführt. Die Denaturierung wurde 1 Minute bei 95°C, die Oligonukleotidanlagerung 1 Minute bei 54°C und die Elongation 2.30 Minuten bei 72°C durchgeführt. Im Anschluss wurde ein fünfminütiger Elongationsschritt durchgeführt, um der Polymerase die Möglichkeit zu geben, jedes begonnene Fragment zu komplettieren.

Nach einer ersten PCR wurde ein Aliquot des ersten PCR-Ansatzes (1µl) als Matrize in einer zweiten PCR mit inneren Oligonukleotiden unter gleichen Reaktionsbedingungen eingesetzt.

### 5'RACE

Folgende spezifische Oligonukleotide wurden zur Verlängerung des *gata*-Klons in 5'Ende verwendet:

Genspezifische Oligonukleotide: Gata3'RACE 1 + Gata3'RACE 2 (Sequenzen siehe Anhang)

Gene Racer Primer: 5'-CGACTGGAGCACGAGGACACTGA-3'

Gene Racer Nested Primer: 5'-GGACACTGACATGGACTGAAGGAGTA-3'

Die PCR-Ansätze hatten jeweils ein Volumen von 25µl, das sich aus 1µl Gene Racer cDNA, 25mM dNTPs, je 20pmol der Oligonukleotide und 1U Taq-Polymerase in 1x Polymerasepuffer mit 0,5mM MgCl<sub>2</sub> zusammensetzte. Es wurden 35 Zyklen durchgeführt. Die Denaturierung wurde 1 Minute bei 95°C, die Oligonukleotidanlagerung 1 Minute bei 46°C und die Elongation 2.30 Minuten bei 72°C durchgeführt. Nach einer ersten PCR wurde ein Aliquot des ersten PCR-Ansatzes (1µl) als Matrize in einer zweiten PCR mit inneren Oligonukleotiden unter gleichen Reaktionsbedingungen eingesetzt.

### Die genomische Sequenz von *gata*

Die isolierte *Volllängen-gata*-Sequenz wurde mit der genomischen *Nematostella* Bank geblastet. Die Analyse der Intron-Exongrenzen ergab, dass die genomische *gata*-Sequenz aus vier Exons besteht.

## **Isolierung von *Myosin heavy chain***

Die RNA adulter Tiere wurde isoliert und in cDNA umgeschrieben. Die genomische Sequenz von *MyHC* wurde mit den Sequenzen anderer Organismen verglichen. Da die Bereiche mit konservierten Aminosäuren mit großer Wahrscheinlichkeit Exons sind, wurden aus diesen Bereichen Primer zur jeweiligen Isolation der Fragmente gewählt. Zunächst wurde die cDNA in sechs Teilfragmenten amplifiziert (Sequenzen siehe Anhang).

## **Die genomische Sequenz von *Myosin heavy chain* und die Isolierung der Promoterregion von *Myosin heavy chain***

Aus dem *Nematostella* Shotgun-Genom-Datensatz (NCBI trace archive; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/mmtrace.shtml>) wurde anhand des *Myosin heavy chain* EST-Fragments der Sequenzbereich ermittelt, der die genomische Sequenz von *Myosin heavy chain* enthält. Die Analyse ergab, dass die genomische Sequenz von *Myosin heavy chain* aus 36 Exons besteht. Mit Hilfe einer von Pierre Chourrout geschriebenen software „Marche á droite“ wurde ein „genome walk“ ausgehend von dem EST-Fragment durchgeführt und damit die 5' Region des Gens ermittelt und so die vorraussichtliche Promoterregion identifiziert. Ca. 2kb upstream des Startcodons von *MyHC* wurden mit der software „TESS Transcription element search system“ (<http://www.cbil.upenn.edu/cgi-bin/tess/tess>) Bindestellen für Gata identifiziert.

Zur Isolierung und Klonierung der *MyHC* Promoterregion wurden Primer innerhalb dieser 2kb Sequenz ermittelt und PCR-Fragmente von ca. 1000-1500bp amplifiziert, kloniert und sequenziert.

## **Klonierung der Fragmente**

### **Aufreinigung der DNA aus einem Agarosegel**

Um die DNA nach einer PCR aus dem Agarosegel zu extrahieren, wurde die entsprechende Bande aus dem Gel ausgeschnitten und mit dem NucleoTrap Kit (Macherey und Nagel; Angaben des Herstellers) aufgereinigt. Die aufgereingte DNA wurde danach in die Ligationsreaktion eingesetzt.

## Ligation und Transformation des Ligationsansatzes in kompetente Zellen

Die aus einem aufgereinigten Gel erhaltenen Fragmente wurden in den TA-Klonierungsvektor pGEMT (Promega; Angaben des Herstellers) oder TOPO TA-Vektor (Invitrogen; Angaben des Herstellers) ligiert.

Kompetente Zellen sind in der Lage, Plasmide aufzunehmen und durch bakterielle Vermehrung somit für eine Amplifikation des Plamids zu sorgen. 100µl kompetente E.coli-Zellen des Typs TOP F' wurden auf Eis aufgetaut und 10µl des Ligationsansatzes hinzupipettiert. Der Ansatz wurde 30 Minuten auf Eis inkubiert und mehrmals vorsichtig gemischt. Für die Aufnahme der Plasmide wurde bei 42°C 45 Sekunden ein Hitzeschock durchgeführt. Nach der Zugabe von 900µl LB-Medium und nach einstündigem Schütteln wurden die Bakterien auf AXI (Ampicillin/X-Phosphat/IPTG) oder ampicillinhaltigen Platten ausgestrichen und bei 37°C über Nacht inkubiert. Gewachsene Klone wurden gepickt und in Flüssigkultur mit 50µg 7 ml Ampicillin über Nacht hochgeschüttelt. Nach der Isolation der Plasmide durch eine alkalische Detergenzlyse (Nucleo Spin Plasmid, Machery und Nagel; Angaben des Herstellers) wurden die inserierten Fragmente von der Firma GATC nach der Kettenabbruchmethode (Sanger et al., 1977) sequenziert.

## Auswerten der Sequenzen

Um Homologien zu anderen Sequenzen zu finden, wurden die erhaltenen Sequenzen über BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) mit einer Datenbank verglichen.

Für die phylogenetischen Analysen wurden die putativen Proteinsequenzen mit ihren Homologen aus einer Auswahl anderer Organismen mit ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>; Ausgabeformat „phylip“; Altschul et al., 1997) aligniert und anschließend mit der Software TREEPUZZLE (Schmidt et al., 2002) die Proteinstammbäume berechnet. Die Berechnungen wurden nach „Quartet sampling plus Neighbour Joining“ durchgeführt. Das Modell der Aminosäuresubstitution stammte von Jones et al. (1992), die gamma-Verteilungsrate wurde auf acht festgelegt, woraus sich die alpha-Parameter bei der Berechnung ergaben.

Folgende Acession Nummern wurden für die Analyse der Gata Sequenz verwendet:

Nv\_snail, AAT72903.1; Nv\_gata, AAS21059.1; Xt\_gata-3, NP\_001004967.1; Xl\_gata-2, AAA49723.1; Gg\_gata-2, NP\_001003797.1; Dr\_gata-2, NP\_571308.1; Mm\_gata-3, AAH62915.1; Dm\_pannier, P52168; Sp\_gata-e, NP\_001005725.1; Gg\_gata-4, P43691; Dm\_gata-e, BAD00020.1; Dm\_serpent, NP\_995977.1; Dm\_gata-c (grain), P91623; Mm\_gata-6, NP\_034388.2; Mm\_gata-4, NP\_032118.2; Mm\_gata-5, NP\_032119.1.

Folgende Acession Nummern wurden für die Analyse der MyHC Sequenz verwendet:

Ai\_P24733; Pm\_AAB03660; Pm\_AAD52842; Dm\_isoform\_NP\_724006;  
Gg\_MyHC6\_NP\_990097; Gg\_sMyHC\_BAA89233.1; Xl\_vMyHC\_AAW88309;  
Hs\_βMyHC\_CAC20413; Hs\_cMyHC6\_P13533; Hs\_cMyHC\_BAA00791.1;  
Mm\_MyHC18A\_Q9JMH9; Dr\_vMyHC\_XP\_684394.1; Ss\_slowMyHC\_BAB20630.1.

Für das Darstellen der alignierten Sequenzen wurde das frei erhältliche Programm GeneDoc verwendet (Ausgabeformat aus ClustalW ist gcg MSF).

### **Zeitliche Expressionsanalyse: RT-PCR**

Die aus unterschiedlichen Embryonalstadien, Primärpolypen und Geweben adulter Polypen isolierte RNA wurde in cDNA umgeschrieben und als Matrize in eine RT-PCR eingesetzt. Als Kontrolle gegen Kontamination mit genomischer DNA diente eine Matrize, in der die RNA nicht in cDNA umgeschrieben wurde (RT(-)-Kontrolle). Als Positivkontrolle wurde *Actin* verwendet (siehe Tabelle 1). Die PCR-Ansätze hatten jeweils ein Volumen von 25µl, dass sich aus 1µl cDNA, 25mM dNTPs, je 100pmol der Oligonukleotide und 1U Taq-Polymerase in 1x Polymerasepuffer mit 0,5mM MgCl<sub>2</sub> zusammensetzte. Es wurden 35 Zyklen durchgeführt, Denaturierung (bei 95°C), Oligonukleotidanlagerung bei (54°C) und Elongation (bei 72°C) dauern jeweils 1 Minute. Zum Anschluss wurde ein fünfminütiger Elongationsschritt durchgeführt, um der Polymerase die Möglichkeit zu geben, jedes begonnene Fragment zu komplettieren (Sequenzen der Oligonukleotide siehe Anhang).

Gen	Oligonukleotidpaar	Anlagerungstemperatur	Fragmentlänge
<i>Gata</i>	Gata intern for/rev	54° C	395 bp
<i>MyHC</i>	MHC_contig_5'/3'	54° C	380 bp
<i>Actin</i>	Actin5'/3'	54° C	175 bp

**Tabelle 1: Bedingungen der RT-PCR**

### **Räumliche Expressionsanalyse: *in situ*-Hybridisierung**

Die *in situ* (vor Ort)-Hybridisierung ermöglicht den Nachweis von mRNA in der Zelle bzw. dem ganzen Gewebe. Ihr Ziel ist es, bestimmte Gene zu markieren und durch eine chromogene Reaktion den Expressionsort des Gens zu detektieren. Die zu detektierende mRNA wird mit einer digoxigeninmarkierten Antisense-Sonde hybridisiert.

#### Herstellung der RNA-Sonden

Um die Transkripte der zu untersuchenden Gene in den Tieren zu detektieren, wurden digoxigenin-markierte einzelsträngige Antisense-RNA-Sonden hergestellt (DIG RNA Labeling Kit, Roche; Angaben des Herstellers). Zunächst wurden aus den jeweiligen Klonen mit M13forward und M13reverse Standardoligonukleotiden PCR-Produkte vervielfältigt, die das klonierte cDNA-Fragment und die Promotoren für T7, T3 oder SP6 RNA Polymerasen enthalten (25µl Ansatz mit je 20pmol Oligonukleotid, 35 Zyklen, Anlagerungstemperatur 55°C). Die antisense-Sonden wurden, abhängig von der Orientierung des Transkripts im Klon, mittels einer der beiden RNA-Polymerasen hergestellt. In der Synthesereaktion wurden digoxigeninmarkierte Uracilnukleotide verwendet, das Digoxigenin kann dann mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen werden.

#### Relaxieren und Fixieren

Relaxierte Primärpolypen und adulte Polypen wurden zunächst durch langsame Zugabe einiger Tropfen (ca.5ml/25ml Nematostellamedium) von 7,14% MgCl<sub>2</sub> in die Petrischale

betäubt und 15-30 Minuten inkubiert. Embryonen wurden vor der Fixierung mit einer 4% Cysteinlösung aus der Gallerthülle gelöst. Die Tiere wurden dann in 4% Paraformaldehyd/0,25% Glutaraldehyd (25%; Endkonzentration 0,0625%) in Nematostellamedium (pH 7,4-7,8) 10 Minuten auf Eis fixiert. Anschließend wurden die Tiere viermal in PBS/0,1%Tween für je 5 Minuten gewaschen. Nach einem weiteren Waschschrift in ddH<sub>2</sub>O wurden die Tiere entweder in 100% Methanol überführt und eingefroren oder die *in situ*-Hybridisierung wurde direkt im Anschluss an die Fixierung begonnen.

Für Präparate, die nach der *in situ*-Hybridisierung mit dem Kryotom oder Vibratom geschnitten wurden, wurden nach der Fixierung ca. 3mm dicke Schnitte mit einer Rasierklinge angefertigt. Die Schnitte wurden während der *in situ*-Hybridisierung genauso behandelt wie Embryonen oder ganze Tiere.

### Vorbehandlung und Hybridisierung

Die Tiere wurden zu Beginn in einer absteigenden Alkoholreihe (je 5 Minuten 100%, 75%, 50%, 25% Methanol in PBT; viermal 100% PBT) rehydriert. Um das Eindringen der Antisense-RNA-Sonde zu erleichtern, folgte anschließend die Hydrolyse von Proteinen in den Zellhüllen und den Zellen durch die Inkubation von Proteinase K (20Umg; 20µg/ml; Stammlösung 1mg/ml in ddH<sub>2</sub>O; 1:50 verdünnt in PBT) für 12 Minuten. Die Reaktion wurde zweimal 5 Minuten mit 0,4% Glycin gestoppt (4% Glycin Stammlösung in ddH<sub>2</sub>O; 1:10 verdünnt in PBT). Um eine Verbesserung des Signals und eine Reduktion des unspezifischen Hintergrunds zu erreichen, folgten je zwei Waschschrift von je 5 Minuten in 0,1M Depc-behandeltem Triethanolamin, (TEA) pH 7,8 (eingestellt mit NaOH) und 0,25% (v/v) Acetanhydrid gelöst in 0,1M TEA. Die Proben wurden dreimal zu je 5 Minuten in PBT gewaschen und danach 20 Minuten bei Raumtemperatur in 4% PFA in Nematostellamedium refixiert. Das Fixativ wurde fünfmal je 5 Minuten in PBT ausgewaschen. Große Polypen wurden einem Hitzeinkubationsschrift (20 Minuten bei 80°C in PBT) unterzogen, um die Effektivität der Zerstörung endogener alkalischer Phosphatasen zu erhöhen. Die großen Polypen wurden nach dem Hitzeschrift, die übrigen Stadien direkt nach dem Auswaschen des Fixativs auf Hybridisierungslösung (4x SSC; 5x Denhardts; 0,1% Chaps; 0,25mg/ml Hefe RNA; 50µg/ml Heparin; 0,1% Tween-20; 50%

Formamid) äquilibriert. Hierzu wurden die Tiere zunächst 10 Minuten bei Raumtemperatur in einem 1:1 Verhältnis von PBT:Hybridisierungsmix, danach 3-4 Stunden bei 44°C in frischer 100% Hybridisierungslösung inkubiert. Nach der Äquilibrierung wurden die Proben ca. 60 Stunden mit der jeweiligen Sonde (0,25ng/µl) in Hybridisierungslösung hybridisiert.

### Posthybridisierung, Blockieren und Antikörperinkubation

Nach dem Hybridisieren der Proben mit den jeweiligen Sonden war es wichtig, ungebundene Sonden durch extensives Waschen zu beseitigen, um auf diese Weise ein spezifisches Expressionsmuster zu erhalten. In acht Schritten wurden die Proben in einer Posthybridisierungslösung (50% Formamid; 2x SSC; 0,1% Tween-20) je 45 Minuten zunächst zweimal in 48°C, zweimal in 50°C, zweimal 54°C und schließlich zweimal 56°C gewaschen. Ein halbes Volumen der Posthybridisierungslösung wurde abgesaugt, durch 2x SSC ersetzt und 10 Minuten bei 56°C inkubiert. Danach wurde die Lösung durch 100% 2x SSC ersetzt und bei 56°C für 30 Minuten inkubiert. Danach folgten vier Waschschritte von je 5 Minuten in PBS/0,02% Triton bei Raumtemperatur. Um ungebundene antisense-RNA-Sonden zu beseitigen, wurde eine RNase-Behandlung mit RNase T<sub>1</sub> durchgeführt. Die RNase T<sub>1</sub> wurde auf eine Konzentration von 1U/µl in PBS/0,1% Tween-20 verdünnt und die Proben wurden darin 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Proben fünfmal zu je 5 Minuten in PBS/0,1% Tween-20 gewaschen. Um unspezifische Bindungsstellen für Proteine abzusättigen, wurden die Proben über Nacht bei 4°C in 1x Blockierungslösung (Roche) in MAB inkubiert. Die Inkubation mit dem Antikörper (anti-DIG F<sub>AB</sub>-Fragmente; AP-konjugiert; Roche) erfolgte in einer Verdünnung von 1:2000 in 1x Blockierungslösung in MAB bei 4°C über Nacht.

### Auswaschen von ungebundenem Antikörper

Zunächst wurde der Antikörper abgesaugt. Ungebundener anti-DIG-Antikörper wurde in acht Waschschritten von je 30 Minuten entfernt. Zum Abschluss folgte eine Inkubation in MAB über Nacht bei Raumtemperatur.

## Detektion der gebundenen Sonde

Die Proben wurden zweimal für je 5 Minuten in Alkalische Phosphatase Puffer, NTMT, gewaschen. Danach wurde in zwei weiteren Waschsritten durch Zugabe von 1mM Levamisol in NTMT die noch funktionsfähigen alkalischen Phosphatasen unterdrückt. Der Nachweis des antisense-RNA-Sonde/endogene mRNA-Komplex erfolgte enzymatisch über Alkalische Phosphatase, die das Substrat NBT/BCIP (1:50 in NTMT) bei 37°C zu einem blauen Farbstoff umsetzt, der am Ort seines Entstehens ausfällt. Die Enzymreaktion wurde mit 100% Ethanol gestoppt, die Proben in PBS gewaschen und zum Mikroskopieren in 10% Glycerin in PBS auf Objektträger montiert.

## Herstellung eines Reporterkonstrukts mit *MHC*-Promoter

Um *in vivo* mögliche Interaktionen zwischen GATA und dem *MyHC*-Promoters zu testen, wurde ein Reporterkonstrukt mit einem Promoterfragment ligiert. Als Reporterkonstrukt stand der Vektor pER25 (backbone: pCR2, Invitrogen,; Angaben des Herstellers; Plasmidkarte siehe Anhang) aus dem Labor von Ulrich Technau zur Verfügung. Das Promoterfragment wurde aus der genomischen DNA mit Schnittstellenprimern isoliert, die sich auch als *multiple cloning site* auf dem Reporterkonstrukt wiederfinden. Die Erkennungssequenzen der Restriktionsendonukleasen sind in der Primersequenz unterstrichen.

5'primer\_SpeI:gacactagtCCGGATGGGAGCAAAGAAAAC

3'primer\_BamHI:agcggatccCTTGAAACAGTTATTCTAAAC

Sowohl der Vektor als auch das isolierte Promoterfragment wurden aus dem Gel aufgereinigt (Nucleo Spin Trap, Macherey und Nagel; Angaben des Herstellers), und deren Konzentration mittels OD-Messung bestimmt. In einem molaren Verhältnis Promoterfragment zu Plasmid von 3:1 und 5:1 wurde eine Ligation durchgeführt (T4-Ligase, Promega; Angaben des Herstellers). 3µl des Ligationsansatzes wurden in eine Transformationsreaktion eingesetzt.

## **mRNA-Synthese**

Vektoren, die die *Gata*-Vollängen-Sequenz enthielten, wurden, mit einer Restriktionsendonuklease linearisiert und aus dem Gel aufgereinigt (Nucleo Spin Trap, Macherey und Nagel; Angaben des Herstellers). Der linearisierte Vektor mit den internalisierten Transkriptsequenzen wurde als Template für die *in vitro* Transkriptionsreaktion verwendet.

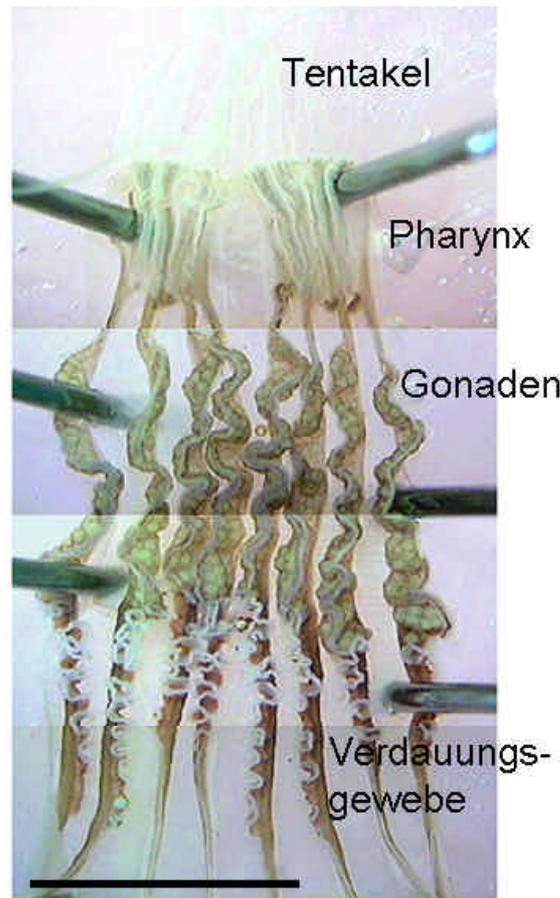
## 5. Ergebnisse // Histologie

*Nematostella* wurde in den letzten Jahren als Modellorganismus zur Untersuchung der Evolution molekularer Entwicklungsprozesse etabliert und es ist daher notwendig, diesen Organismus im ganzen zu verstehen. Ein Ziel dieser Arbeit lag darin, den Organismus auf der anatomischen und auf der histologischen Ebene zu verstehen. Der Focus der histologischen Arbeit lag in der Charakterisierung der Mesenterien, insbesondere der Muskulatur. Um einen Überblick über die Anordnung und Anatomie der Mesenterien zu bekommen, wurden zunächst adulte Polypen untersucht. Nach der Charakterisierung der Mesenterien adulter Polypen als Ganzes wurde die Muskulatur, die sich innerhalb der Mesenterien befindet, näher untersucht. Um mehr über die Entwicklung und Differenzierung der Mesenterien und der Muskulatur zu erfahren, wurden zur weiteren histologischen Analyse verschiedene Stadien von *Nematostella* untersucht. Mit Lokalisierung der Muskulatur innerhalb der Mesenterien wurden desweiteren die Kandidatengene *gata* und *MyHC* untersucht, die in anderen Organismen in die Muskelentstehung und Muskeldifferenzierung involviert sind. Die histologischen Daten wurden mit den molekularen Daten kombiniert um so einen Überblick der Muskelentstehung in *Nematostella* zu erhalten.

### **Anatomie und Ultrastruktur der Seeanemone *Nematostella vectensis***

#### Anatomie adulter Polypen von *Nematostella vectensis*

Klapppräparate (Flat mounts) adulter Tiere, die den inneren Aufbau, insbesondere die Mesenterien zeigen, wurden nach einer Methode von Batham and Pantin (1951) hergestellt, die im Rahmen dieser Arbeit für *Nematostella* modifiziert wurde. Abbildung 10 zeigt die Präparation eines adulten, weiblichen Polypen. Er hat eine Länge von 25mm und eine Breite von 7mm, die Tentakel nicht mit eingerechnet. Der am oralen Ende liegende Pharynx hat eine Länge von ca. 3mm. Die acht Mesenterien sind in diesem Abschnitt mit dem Pharynx verbunden. Am Ende des Pharynx ragen die Mesenterien frei in den Körper hinein und sind nur proximal mit der Körperwand verbunden. Die Mesenterien verlaufen longitudinal von oral nach aboral.



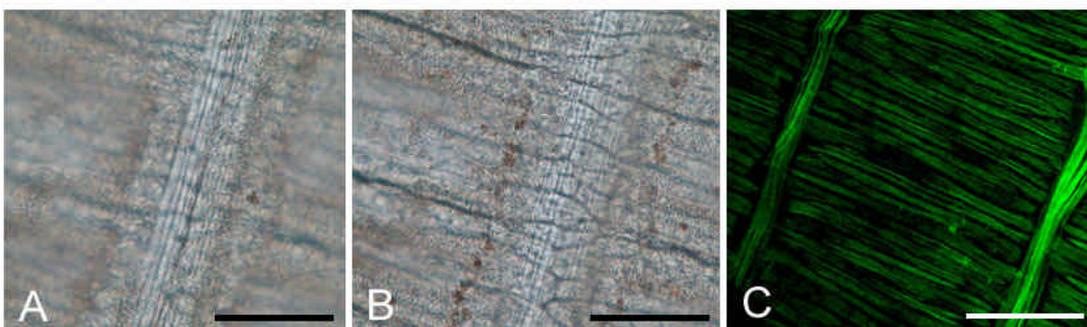
**Abbildung 10:** Klapppräparat eines adulten, weiblichen *Nematostella* Polypen. Die acht voll ausgebildeten Mesenterien sind gut zu erkennen. Im oberen Drittel sind sie mit dem Pharynx verbunden, unterhalb ragen sie frei in den Gastralraum hinein. Der mittlere Bereich des Polypen bildet die Gonaden. Die gelblichen Eier in Paketen scheinen durch die sie umschließende Membran hindurch. Im unteren Drittel befindet sich das Verdauungsgewebe. Der distale Bereich der Mesenterien weist zahlreich Einstülpungen auf, die wohl der Oberflächenvergrößerung dienen. So kann sowohl mehr Nahrung mittels Nematocyten festgehalten als auch verdaut werden. Größenstandard: 5mm

Die Aufsicht auf die Mesenterien zeigt, dass ein großer Teil von den Geschlechtsorganen eingenommen wird. Die Gonaden dieses Weibchens sind 9mm lang. Die Membran, welche die Gonaden umschließt, ist transparent und erlaubt einen Einblick auf die Ovarien mit den darin liegenden Oocyten. Das untere Drittel bildet das Verdauungsgewebe der Mesenterien und hat eine Länge von 13mm. Die Einstülpungen dienen der Oberflächenvergrößerung. In diesem Bereich befinden sich zahlreiche Nematocyten, die die Nahrung bei ihrer Passage durch den Gastralraum fixieren und Drüsenzellen, die die Nahrung verdauen. Bei dem

dunkel erscheinenden Gewebe handelt es sich um die Muskulatur der Mesenterien, die sowohl am proximalen Teil als auch in der Mitte der Mesenterien liegt.

In *Nematostella vectensis* werden im Laufe der juvenilen Entwicklung acht Mesenterien gebildet. Funktional spezialisierte Zellen sind in den Mesenterien als Gewebegruppen zusammengefasst und haben dort organähnliche Funktionen, wie Reproduktion oder Verdauung (angelehnt an Hyman, 1940). Es handelt sich hierbei um sogenannte vollständige Mesenterien, was bedeutet, dass alle acht Mesenterien im oberen Drittel, dem Mundbereich, mit dem Pharynx verbunden sind, die gleiche Größe und gleichwertige Funktionen haben. Verbunden mit der inneren Körperwand, wachsen die Mesenterien einwärts und erstrecken sich longitudinal von der Pharynxregion bis zum Fuß. Unterhalb des Pharynx haben sie keine Verbindung mehr und ragen frei in den Gastralraum.

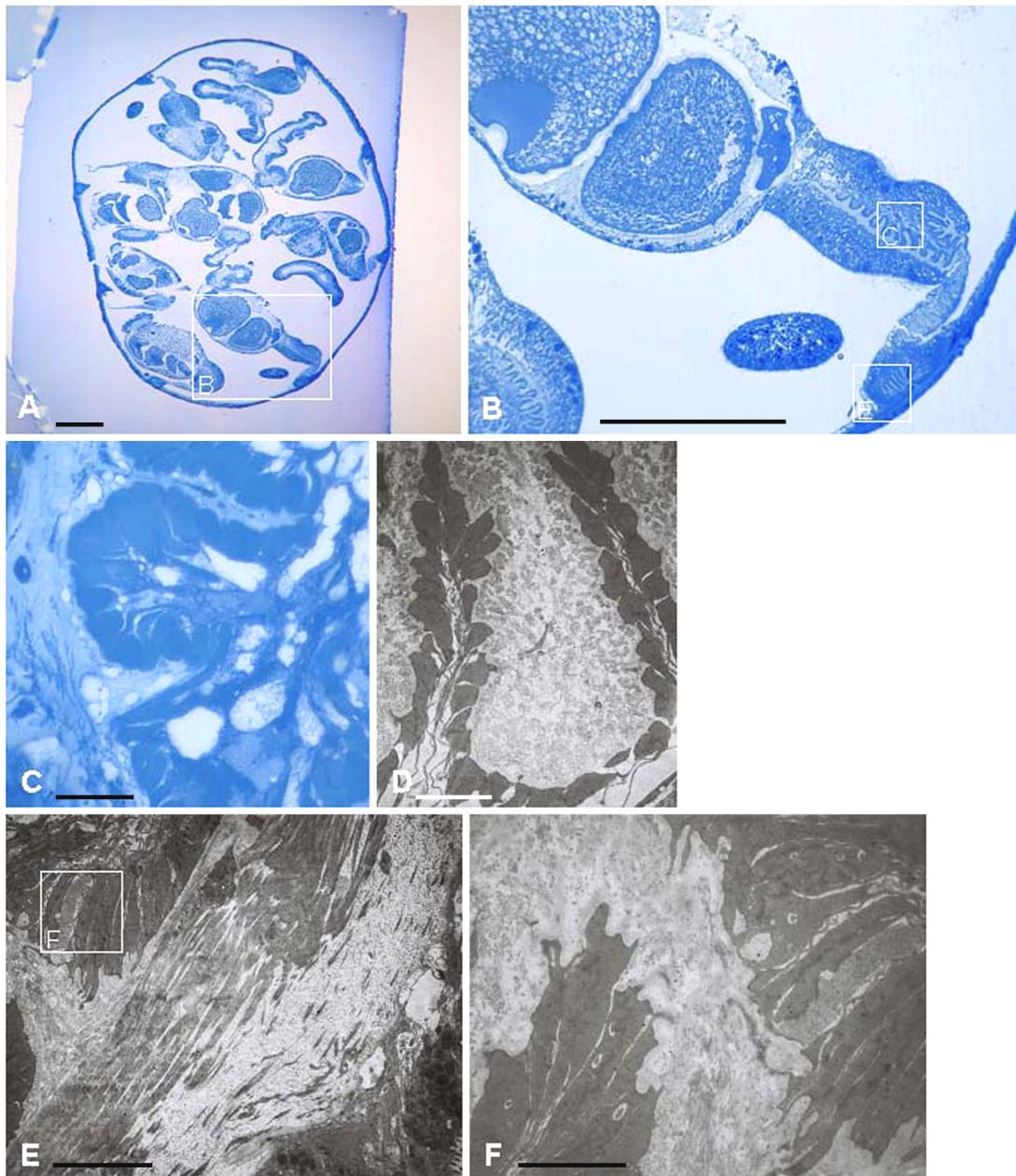
Die Aufsicht auf die äußere Körperwand zeigt die parietale Muskulatur, die von der Ringmuskulatur des Ektoderms gekreuzt wird (Abbildung 11 A, B). Abbildung 11 C dient der Kontrolle und zeigt die Körperwand eines Polypen, der mit Phalloidin gefärbt wurde. Phalloidin bindet an F-Actin und detektiert so das Muskelgewebe. Der Vergleich mit dem phalloidingefärbten Polypen zeigt, dass es sich bei den Strängen auf den beiden oberen Bildern um Muskeln handelt.



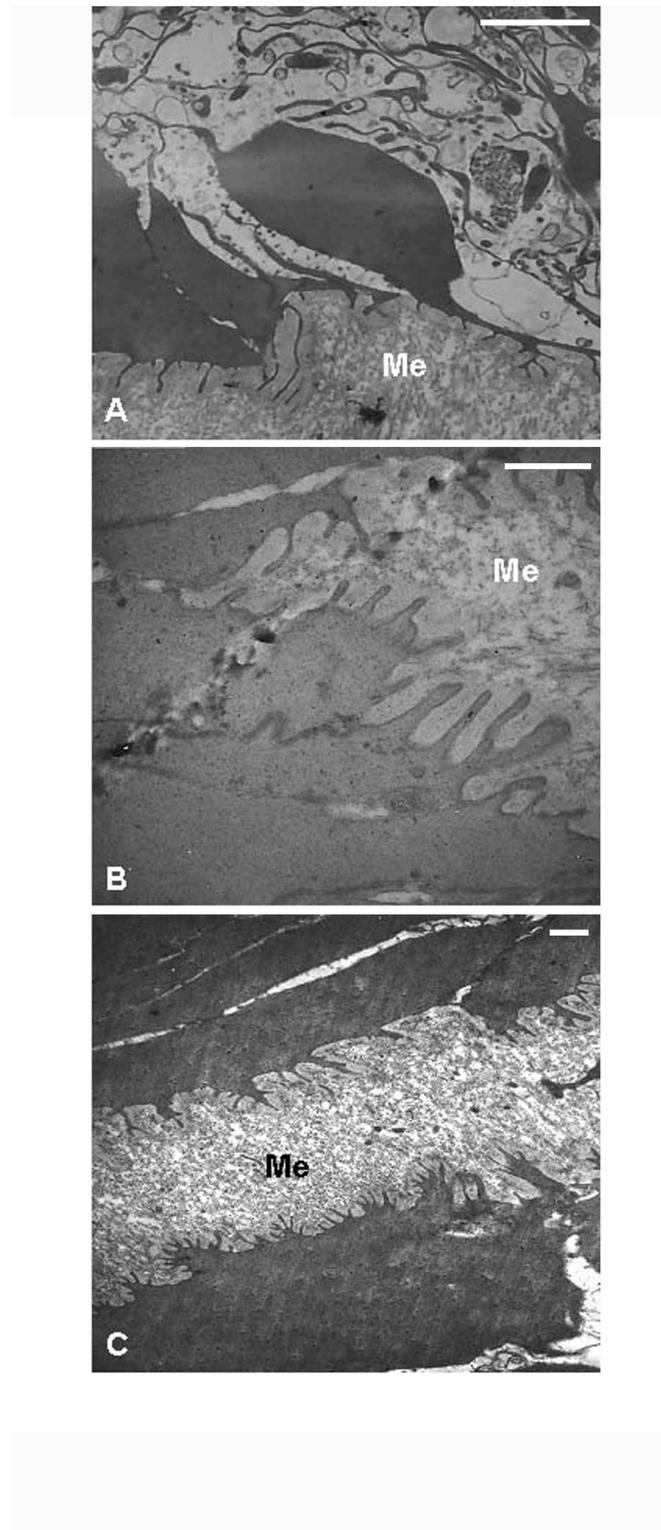
**Abbildung 11: Aufsicht auf die Körperwand. A und B: Lichtmikroskop, C: Polyp phalloidingefärbt und mit dem Fluoreszenzmikroskop aufgenommen. In A liegt der Focus auf der proximal gelegenen Parietalmuskulatur, die sich vom Kopf zum Fuß erstreckt. In B liegt der Focus auf der ektodermalen Ringmuskulatur, die die Parietalmuskulatur kreuzt. Bild C zeigt die beiden Muskulaturen. Größenstandards: 500µm**

## Anatomie und Ultrastruktur der Mesenterien adulter Polypen

Abbildung 12A zeigt den Querschnitt eines adulten Polypen. Innerhalb des Gastralraums liegen die acht Mesenterien mit unterschiedlichen Funktionsbereichen. Am proximalen Teil des Mesenteriums, dem Ansatzpunkt des Mesenteriums, ist dieses mit der Körperwand verbunden. Ein Mesenterium ist in Abbildung 12B dargestellt. An der Basis des Mesenteriums liegt die Parietalmuskulatur, die an dieser Stelle in die entodermale Ringmuskulatur des Polypen übergeht. Die Parietalmuskulatur adulter Tiere hat eine bäumchenähnliche Struktur, jeder „Ast“ dieses Bäumchens ist aus Muskelzellen aufgebaut, die Zwischenräume sind von Mesogloea gefüllt (Abbildung 12E,F). In Abbildung 12C,D wird ein detaillierter Ausschnitt der Retraktormuskulatur gezeigt. Nach einem Zwischenstück, das mit Mesogloea erfüllt ist, folgt die longitudinale Retraktormuskulatur, die den oralen Teil des Tieres mit dem Fuß verbindet (Abbildung 12B Kasten und C,D). Sowohl der Querschnitt als auch der Längsschnitt der Muskelzelle adulter Polypen zeigt, dass die Zellen im Gewebe durch fingerförmige Fortsätze mit der Mesogloea verankert sind (Abbildung 13B). Der Teil der Zelle, der die Muskelfasern enthält, macht den größten Anteil der ganzen Zelle aus und ist durch einen Fortsatz vom epithelialen Teil der Zelle getrennt.



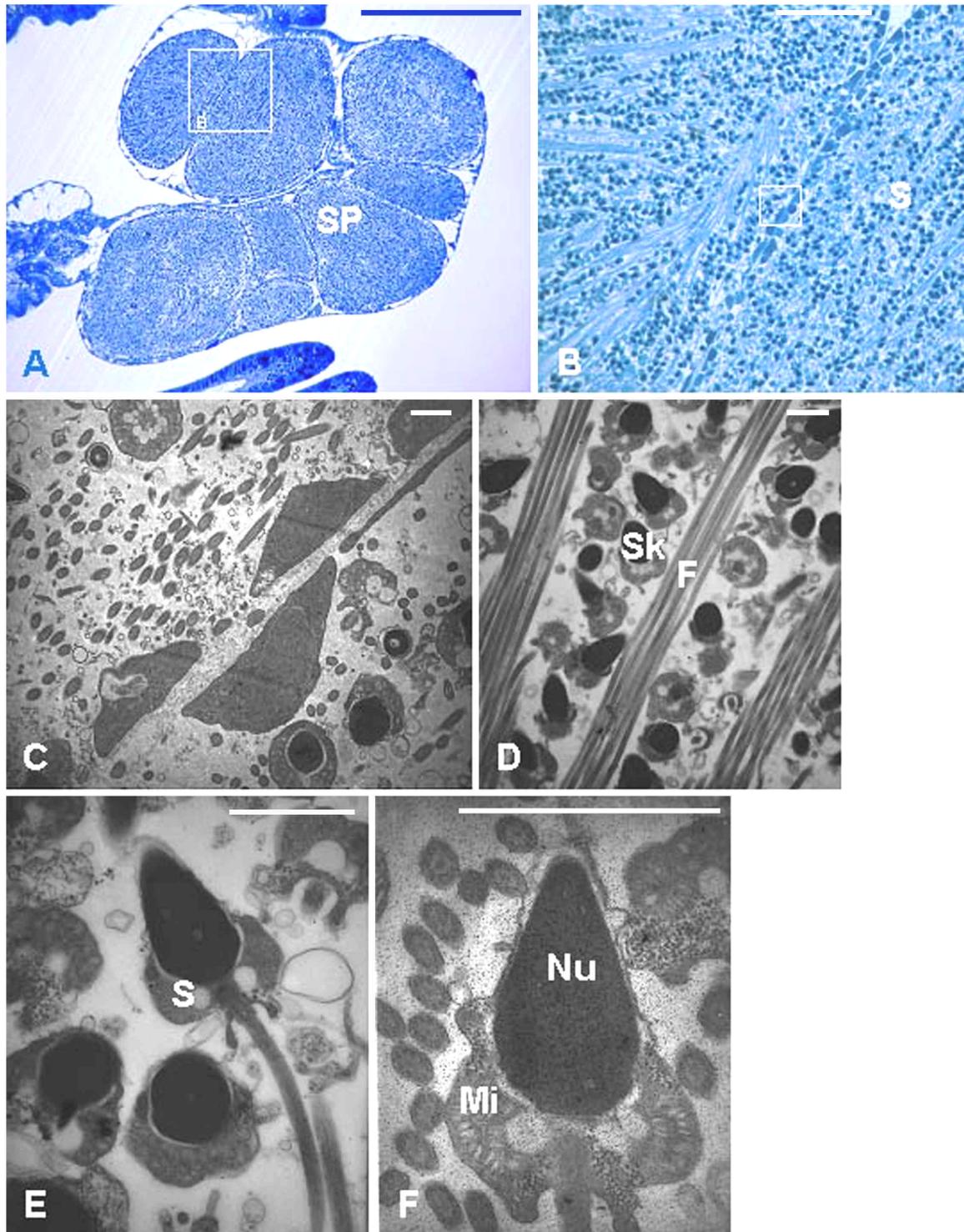
**Abbildung 12: Semi- und Ultradünnschnitte der Mesenterien adulter Polypen. A: Übersicht über einen Querschnitt mit acht Mesenterien. B ist die Detailaufnahme eines Mesenteriums. Semidünnschnitt (C) und Ultradünnschnitt (D) der Retraktormuskulatur. Ultradünnschnitte (E, F) der Parietalmuskulatur. Größenstandards: A und B: 100µm; C und D: 30µm; E: 50µm; F: 30µm**



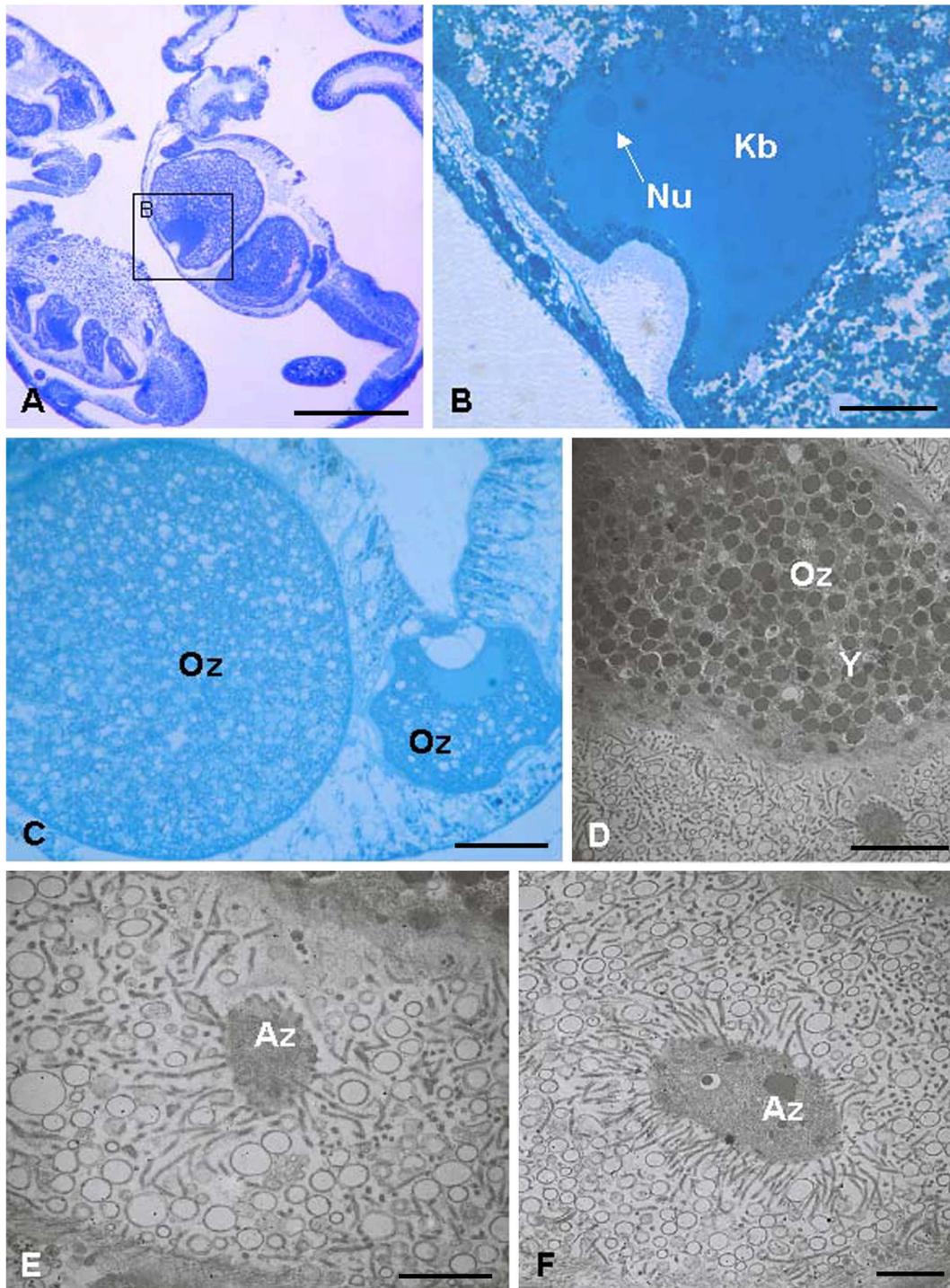
**Abbildung 13: Ultrastruktur der Muskelzellen adulter Polypen. A und B zeigen Muskelzellen eines querschnittenen Polypen, C zeigt die längsgeschnittene Muskulatur. Die Fortsätze der Muskelzellen ragen in die Mesogloea hinein (Me, Mesogloea). Größenstandards: 10µm.**

Distal zur Retraktormuskulatur liegen die Gonaden, die einen großen Teil des ausgewachsenen Mesenteriums ausmachen. In den männlichen Organismen liegen die Spermien zu Tausenden in Gonadenpaketen (Abbildung 14A). Spermatogonien, die Vorläuferzellen der Spermatozoen liegen am äußeren Rand der Pakete während die Spermatozoen sich mehr in der Mitte orientieren und ihr Schwanz zum einen Pol des Pakets ragt (Abbildung 14B,C). Das Köpfchen des Spermiums hat die Form eines Pfeils. Ein Großteil wird vom Zellkern ausgefüllt an dessen Basis links und rechts die Mitochondrien liegen. Dazwischen beginnt der Schaft mit Geißel, durch die sich das Spermium fortbewegt (Abbildung 14D-F). Der Querschnitt der Geißel zeigt eine typische 9+2 Dynein-Anordnung (nicht gezeigt).

Die Eizellen der adulten, weiblichen Polypen liegen innerhalb des Mesenteriums in Paketen vor. Der Querschnitt eines Mesenteriums mit dem Fokus auf einige Eizellen zeigt, dass die Eizelle von einer Vitellinmembran umgeben ist (Abbildung 15A,B). Der Nukleus nimmt eine milchige Form an, die Oocyte ist dotterreich (Abbildung 15B-D). Die Eizellen sind von Mesogloea umgeben in die Amöbocyten eingelagert sind. Amöbocyten sind Zellen, die in Scyphozoen und Anthozoen vorkommen und verschiedene Funktionen haben. Im Kontext der Fortpflanzung spielen sie eine wichtige Rolle in der Nährstoffverteilung und Verdauung (Yonge, 1973; VanPraet, 1977).

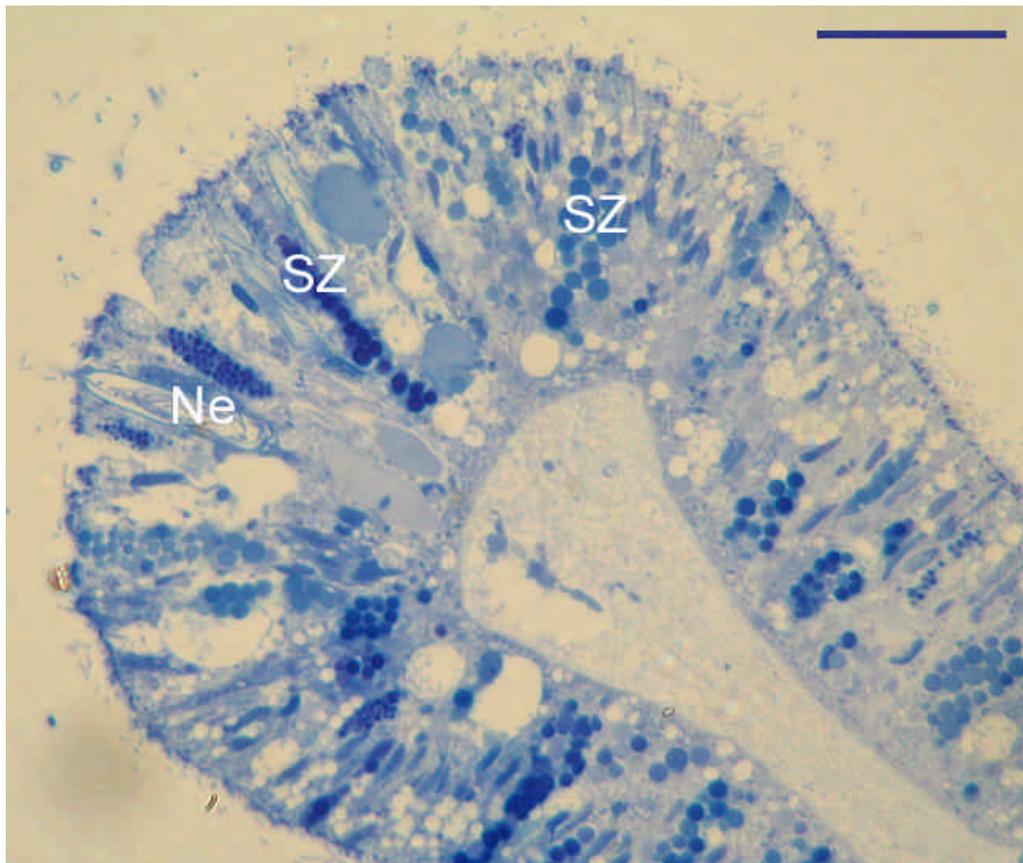


**Abbildung 14: Männliche Gonaden und Spermien.** A zeigt die Übersicht auf ein Spermienpaket eines adulten Polypen. A zeigt die Spermienpakete innerhalb des adulten Mesenteriums, Die Pakete sind von einer Membran umgeben, an deren Rand Spermatogonien liegen (B und C). In D-F sind die Spermien detailliert gezeigt. Das Spermiumköpfchen ist fast vollständig vom Zellkern ausgefüllt. Im Schaft liegen zahlreiche Mitochondrien (F; S, Schaft; Nu, Nukleus; M, Mitochondrien). Größenstandards: A: 100µm; B: 20µm; C-F: 1µm



**Abbildung 15: Semi- (A-C) und Ultradünnschnitte (D-F) der weiblichen Gonaden und Eizellen. A zeigt die Übersicht über ein Mesenterium mit den Eizellen im Zentrum. Die Detailaufnahme (B) zeigt die Keimblase (Kb) und den Nukleus (Nu). Die Eizelle in D ist stark dotterhaltig (yolk, Y). Außerhalb der Eizellen und innerhalb der Mesogloea befinden sich Amöbocyten (E, F; Az). Größenstandards: A: 100µm; B: 10µm; C und D: 10µm; E: 5µm; F: 10µm.**

An der distalen Spitze des Mesenteriums liegt der cnidoglanduläre Bereich, das Verdauungsgewebe der Mesenterien. Dort werden die Nematocyten generiert und Nahrung verdaut (Abbildung 16). Der apikale Teil des Bereichs enthält sekretorische Zellen, die mit Granulae gefüllt und sowie Nematocyten.



**Abbildung 16: Cnidoglandulartrakt am distalen Ende der Mesenterien. Die sekretorischen Zellen (SZ) sind mit zahlreichen Granulae gefüllt. Die Nematocyten (Ne) mit dem aufgerollten Schlauch sind gut zu erkennen. Größenstandard: 25µm.**

### Schematischer Aufbau eines Mesenteriums von *Nematostella vectensis*

Als zusammenfassendes Ergebnis der histologischen Daten zeigt Abbildung 17 die schematische Darstellung des Mesenteriums eines adulten Polypen von *Nematostella vectensis*.

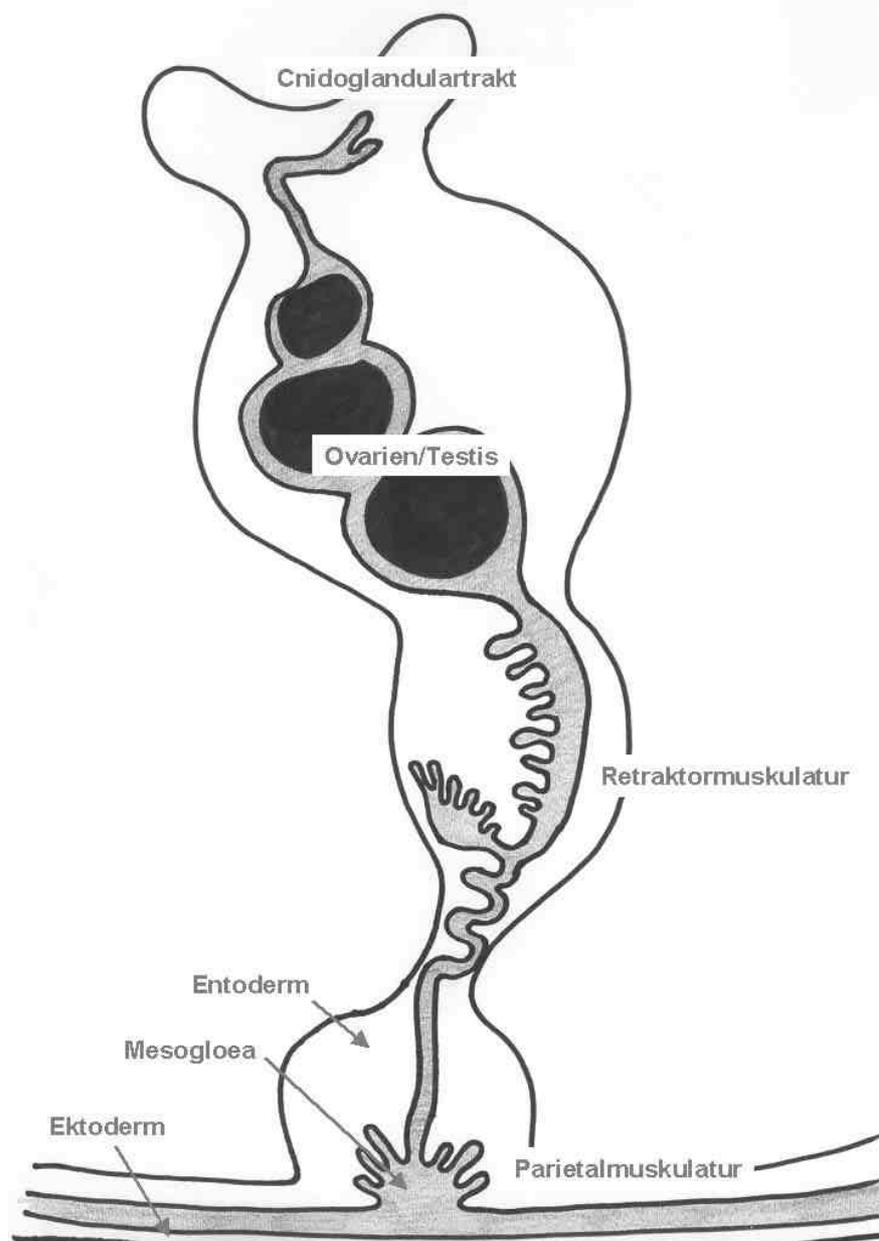


Abbildung 17: Schema eines Mesenteriums von *Nematostella vectensis*