

**EXPERIMENTELLE STUDIEN ZUR EXPRESSION UND INHIBITION
REGULATORISCHER GENE DER ANTP-KLASSE (HOX/PARAHOX-GENE)
IN DEM ATHEKATEN HYDROZOOM *ELEUTHERIA DICHOTOMA* UND
DEM PLACOOZON *TRICHOPLAX ADHAERENS***

Vom Fachbereich Biologie der Universität Hannover
zur Erlangung des Grades

Doktor der Naturwissenschaften
Dr. rer. nat.
genehmigte Dissertation

von
Dipl. Biologe Wolfgang JAKOB
Geboren am 13.11.1971 in Heidelberg

2004

Referent: Prof. Dr. B. SCHIERWATER
Korreferent: Prof. Dr. H.-J. JACOBSEN
3. Gutachter: Prof. Dr. G. FLEISSNER

Disputation:

Vorsitz: Prof. Dr. R. POTT

Prüfende: Prof. Dr. B. SCHIERWATER
Prof. Dr. H.-J. JACOBSEN
Prof. Dr. H. LEHMANN

Tag der Promotion: 9. Dezember 2004

Meinen Eltern, Albert und Brigitte JAKOB

EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe. Diese Dissertation wurde weder als Ganzes noch in Teilen für Diplom-, Promotions- oder ähnliche Arbeiten verwendet.

Hannover, den 05. Oktober 2004

Wolfgang JAKOB

ABSTRACT

Understanding the macroevolution of metazoan bauplans requires knowledge of the function and the expression of developmental regulatory Hox genes in diploblastic animals. While a number of regulatory genes that might be orthologous, paralogous or ancestral to genes of the bilaterian Hox-cluster have been identified from diploblasts, comparatively little is known about their developmental roles. The latter can best be investigated through a combination of in situ expression and gene inhibition studies. This is the first report of modified morpholino-antisense-oligonucleotide and double-stranded RNA (RNAi) inhibition tests in diploblasts. In order to learn about the functions of the previously described Hox/ParaHox genes *Cnox-1*, *Cnox-2*, *Cnox-3*, *Cnox-4*, *Cnox-5* in the metagenic hydrozoan *Eleutheria dichotoma* and *Trox-2* in the placozoan *Trichoplax adhaerens*, correlations between gene expression patterns and observed phenotype changes resulting from inhibition tests are presented.

In situ hybridisation analyses of *Trox-2* gene in growing and fissioning placozoans revealed an expression signal just inside the outer margin of the animals. The signals are localised between the upper and lower epithelium, close to the peripheral boundary. These cells are much smaller than either the epithelial cells or the inner fibre cells. Inhibition studies indicate that *Trox-2* is indispensable for growth and fissioning. Possibly the inhibition of *Trox-2* function is blocking the supply of differentiated somatic cells derived from *Trox-2*-expressing omnipotent precursor cells. This is the first recognition of the existence of this (potentially stem-) cell type in *Trichoplax*.

In the hydrozoan *Eleutheria*, both antisense oligo and double stranded RNA tests also showed significant inhibition effects. Quantitative observations on phenotypic shifts suggest that *Cnox* genes are involved in the determination of local structures (such as tentacle bifurcation), the determination of the main body axis (oral-aboral-axis) and radial symmetry. Specifically, the inhibition of the *Cnox-1* gene caused tentacle anomalies in more than 84% of medusae. The gene is expressed in an outer, ectodermal ring in the “cnidoblast channel” at the oral pole. These results suggest that *Cnox-1* plays a part in the determination of local tentacle structures.

The *Cnox-2* gene is expressed in all three lifecycle stages (polyp, medusa, planula) of *Eleutheria*. Inhibition of the gene resulted in more than 50% of phenotypically abnormal medusae (PAMs) with deformed body axis, and also a high percentage rate of medusae possessing abnormal tentacle structures. These data indicate a very decisive role for *Cnox-2* during the whole developmental bauplan patterning.

In adult medusae, *Cnox-3* gene expression is localised in a distinct ectodermal ring around the manubrium, the feeding organ of the medusa. Inhibition predominantly caused medusae to develop abnormal axis structures and two manubriae (“two heads”). The *Cnox-3* gene appears to be indispensable for differentiation processes of the oral pole of the medusa stage and particularly for patterning the manubrium.

In contrast, *Cnox-4* inhibition did not result in any phenotypic changes. A low number of *Cnox-4* transcripts could be detected in the course of RT-PCR reactions in the medusa stage, but no signals were found in in situ hybridisation experiments. The gene is only expressed in primary polyps at the aboral pole in the ectodermal tissue. *Cnox-4* appears to play a minor role in patterning major morphological features in *Eleutheria* medusae.

Cnox-5 expression is first apparent in 3 to 6 day old planula larvae at the ectodermal, aboral pole. In late primary polyps, expression pattern spreads to the oral end. No signals could be detected in the medusa stage. *Cnox-5* inhibition tests, however, resulted in the highest rate of medusae with a deformed body axis. The data suggest a fundamental role for the *Cnox-5* gene for bauplan patterning during all developmental stages from a primary polyp to a medusa.

In summary, the complete set of results reveal that *Cnox* genes have important tasks in developmental processes involving a complex interplay of numerous regulatory genes. The examined Diplox genes play, in a manner similar to their triploblastic homologs, fundamental roles in bauplan patterning and reproduction processes.

Keywords: Diplox genes, gene inhibition, gene expression, bauplan patterning

ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurden die Funktionen und Expressionsmuster der Homöoboxgene *Cnox-1*, *Cnox-2*, *Cnox-3*, *Cnox-4*, *Cnox-5* des Hydrozoons *Eleutheria dichotoma* und *Trox-2* des Placozoons *Trichoplax adhaerens* untersucht. Während die Expressionen mittels *whole mount in situ* Hybridisierung nachgewiesen werden konnten, wurde die Inhibition der verschiedenen Hox-Gene durch Antisense-Oligonukleotide und doppelsträngiger RNA (dsRNA) herbeigeführt. Die Ergebnisse zeigten eindeutig und erstmalig in Diploblasten, dass mit beiden Methoden eine gezielte Inaktivierung von Hox-Genen möglich ist. Die kombinierte Analyse der Resultate aus den Inhibitions-Experimenten und den *in situ* Hybridisierungen erlaubt gezielte Aussagen über die Funktionen der untersuchten Gene.

Eine Inhibition des *Trox-2*-Gens hat den Verlust der vegetativen Teilungsfähigkeit von *T. adhaerens* zur Folge. Das Expressionsmuster beschreibt eine distinkte Ringform in der peripheren Randzone der Tiere. Das Gen wird in kleinen, zuweilen geclusterten Zellen zwischen dem funktionell oberen und unteren Epithelium exprimiert. Wahrscheinlich handelt es sich hierbei um einen neuen, in Placozoen noch nicht beschriebenen Typ von Stammzellen.

Die Einzelinhibitionsstudien der fünf Hox-Gene in *E. dichotoma* resultierten entweder in der Ausbildung zusätzlicher oder dem Verlust einzelner Merkmalsstrukturen. Die erhobenen Daten zeigen, dass die untersuchten Hox-Gene 1.) eine Funktion bei der Determination der Aboral-Oral-Achse ausüben und 2.) in regionale Strukturbildungsprozesse - vor allem die Tentakeldifferenzierung - involviert sind. Das *Cnox-1*-Gen scheint hierbei eine gewichtige Funktion bei der Tentakeldetermination zu besitzen. In den Inhibitionsstudien wurden bei mindestens 84% der phänotypisch abnormalen Medusen (PAMs) Veränderungen an Tentakelmerkmalen dokumentiert. Das *Cnox-1*-Gen wird nur in der Medusengeneration in vereinzelter Zellen des oralen, ektodermalen Nesselkanals exprimiert.

Für das *Cnox-2*-Gen konnte gezeigt werden, dass mit der Inhibition dieses Gens sowohl eine Deformation der Aboral-Oral-Achse und der radialen Symmetrie als auch Missbildungen an Tentakelmerkmalen einhergehen. Ein Expressionsmuster konnte in allen drei Stadien des Lebenszyklus (Polyp, Meduse, Planula) gefunden werden. Die gewonnenen Datensätze suggerieren eine grundlegend regulatorische Stellung des Gens im Zuge der gesamten Musterbildung von *Eleutheria*.

Die Inhibition des *Cnox-3*-Gens resultierte überwiegend in Medusen mit deformierter Aboral-Oral-Achse und doppeltem "Kopf" mit jeweils zwei basal verbundenen Mundrohren. Das *Cnox-3-Ed*-Gen nimmt demnach offensichtlich eine gewichtige Funktion bei der Determination des axialen und radialen Musters sowie der oralen Polregion

der Medusengeneration ein. Bestärkt wird diese These durch das im ektodermalen Gewebe ringförmig um das Manubrium angeordnete Expressionsmuster.

Der Genausfall von *Cnox-4* im Zuge der Inhibitionsstudien hatte keine phänotypisch sichtbaren Auswirkungen auf die Medusen. Die zudem sehr niedrige Expressionsrate (RT-PCR-Nachweis) lässt darauf schliessen, dass dem Gen eine eher untergeordnete Rolle bei Musterbildungsprozessen des Medusenstadiums zukommt. Ein Expressionsmuster des Gens konnte nur in der Primärpolypengeneration am aboralen Pol nachgewiesen werden, was eine Beteiligung des *Cnox-4*-Gens an Entwicklungsvorgängen dieser Region suggeriert.

Übereinstimmend mit anderen Studien zur Funktion der *Cnox-5*-Gene in Hydrozoen zeigten die Befunde, dass das homologe Gen in *E. dichotoma* gleichsam eine fundamentale Funktion bei der Aboral-Oral-Achsendetermination und der Determination der radialen Körpersymmetrie einnimmt. In jungen Planularlarven wird das *Cnox-5*-Gen am animalen Pol exprimiert, die Primärpolypen wiesen hingegen an beiden Polregionen eine Expression auf. Offensichtlich spielt das Gen eine übergeordnete Rolle im Rahmen der gesamten larvalen Polypenentwicklung. Bemerkenswerterweise hatte die Inhibition des Gens den höchsten prozentualen Anteil an achsendeforzierten Tieren zur Folge, ohne dass in der Medusengeneration ein Expressionsmuster detektiert werden konnte.

Die Ergebnisse insgesamt zeigen, dass die untersuchten Diplox-Gene, gleich ihren Triploblasten-Homologen, eine basale Rolle im Rahmen der Steuerung der Musterbildung einnehmen und auf komplexe Art und Weise miteinander interagieren. Aufbauend auf der vorliegenden Arbeit lassen sich weiterführende Experimente planen, die verbliebene Fragen zum Verständnis der evolutiven Herkunft und Entwicklung grundlegender Musterbildungsprozesse in Diploblasten lösen können.

Schlüsselwörter: Diplox-Gene, Geninhibition, Genexpression, Musterbildung

ABKÜRZUNGSLISTE

A	Adenin
as	antisense
BM	Boehringer Mannheim
bp	Basenpaare
C	Cytosin
cDNA	<i>complementary DNA</i>
<i>Cnox</i>	<i>Cnidarian homeobox</i>
<i>Diplox</i>	<i>Diploblast homeobox</i>
ddH ₂ O	bidestilliertes Wasser
ddNTPs	Didesoxyribonukleosid-5'-triphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTPs	Desoxyribonukleosid-5'-triphosphat
dsRNA	Doppelsträngige Ribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
dUTP	Desoxyuridin-5'-triphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
G	Guanin
hPa	Hektopascal
KCl	Kaliumchlorid
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
mRNA	<i>messenger RNA</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	Ribonukleinsäure-Interferenz
RNase	Ribonuklease
rpm	<i>rotations per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
SDS	Natriumdodecylsulfat (Sodiumlaurylsulfat)
T	Thymin
Taq-Polymerase	Polymerase aus dem Eubakterium <i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borsäure-EDTA
TE	Tris-EDTA
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
<i>Trox</i>	<i>Trichoplax homeobox</i>
U	Unit
UV	Ultraviolett
V	Volt

INHALTSVERZEICHNIS

WIDMUNG	II
EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG	III
ABSTRACT	IV
ZUSAMMENFASSUNG	VI
ABKÜRZUNGSLISTE	VIII
INHALTSVERZEICHNIS	IX
1. EINLEITUNG	1
2. MATERIAL UND METHODEN	9
2.1 Die Untersuchungsobjekte	9
2.1.1 <i>Trichoplax adhaerens</i>	9
2.1.1.1 Morphologie und Lebenszyklus.....	11
2.1.1.2 Tiermaterial und Kultivierung.....	14
2.1.2 <i>Eleutheria dichotoma</i>	15
2.1.2.1 Morphologie und Lebenszyklus.....	16
2.1.2.2 Tiermaterial und Kultivierung.....	19
2.2 Tierbeobachtung.....	20
2.3 Geninhibition mittels RNA-Interferenz (RNAi).....	21
2.3.1 Mechanismus der RNAi-Expressionsinhibition	21
2.3.2 Synthese der dsRNA	23
2.3.3 Transfektion der dsRNA	26
2.3.4 Prinzip der RNAi-Studie	26
2.3.5 Reverse Transkriptase-PCR (RT-PCR).....	27
2.4 Geninhibition durch (Morpholino-) Antisense-Oligonukleotide.....	28
2.4.1 Mechanismen der Expressionshemmung	28
2.4.2 Modifikation der Morpholino-Antisense-Oligonukleotide.....	31
2.4.3 Prinzip der Morpholino-Studie	31
2.4.4 <i>Trox-2</i> -Inhibitions-Zusatzstudie mit modifizierter Antisense-DNA.	33

2.5 Nicht-radioaktive <i>in situ</i> Hybridisierung.....	34
2.5.1 Synthese der RNA-Sonde	34
2.5.2 Durchführung der <i>whole mount in situ</i> Hybridisierung	35
2.5.3 Semi-Dünnschnitte	37
2.6 Statistische Datenauswertung	38
2.6.1 χ^2 -Anpassungstest	38
2.6.2 Korrelationsanalyse von SPEARMAN.....	38
2.6.3 Wilcoxon-Test für gepaarte Stichproben	38
2.6.4 Regressionsanalyse	39
3. ERGEBNISSE	40
3.1 <i>Trichoplax adhaerens</i>	40
3.1.1 Expressionsstudien	40
3.1.1.1 Expression des β -Aktin Gens	40
3.1.1.2 Expression des <i>Trox-2</i> -Gens.....	41
3.1.2 <i>Trox-2</i> -Inhibition mittels dsRNA.....	44
3.1.2.1 Transfektionsnachweis der dsRNA	44
3.1.2.2 Funktionalitätsnachweis des RNAi-Mechanismus mittels RT-PCR.....	44
3.1.2.3 Ergebnisse des RNAi- <i>Knock-Downs</i>	45
3.1.3 <i>Trox-2</i> -Inhibition mittels Morpholino-Antisense-Oligos	48
3.1.3.1 Transfektionsnachweis der Morpholino-Antisense-Oligos.....	48
3.1.3.2 Ergebnisse der Morpholino-Antisense-Gen-Inhibition	49
3.1.4 <i>Trox-2</i> -Inhibition mittels Antisense-DNA-Oligos	52
3.1.4.1 Ergebnisse der Antisense-Gen-Inhibition	52
3.2 <i>Eleutheria dichotoma</i>	56
3.2.1 Untersuchungen am <i>Cnox-1</i> -Gen.....	56
3.2.1.1 Expressionsstudien	56
3.2.1.2 <i>Cnox-1</i> -Inhibition mittels dsRNA	60
3.2.1.2.1 Transfektionsnachweis der dsRNA	60
3.2.1.2.2 Funktionalitätsnachweis des RNAi-Mechanismus mittels RT-PCR	60
3.2.1.2.3 Quantitative Analyse des <i>Cnox-1</i> -RNAi- <i>Knock-Downs</i>	62
3.2.1.2.4 Qualitative Analyse des <i>Cnox-1</i> -RNAi- <i>Knock-Downs</i>	63
3.2.1.3 <i>Cnox-1</i> -Inhibition mittels Morpholino-Antisense-Oligos	66

3.2.1.3.1	Transfektionsnachweis der Morpholino-Antisense-Oligos.....	66
3.2.1.3.2	Quantitative Analyse der <i>Cnox-1</i> -Morpholino-Gen-Inhibition ..	66
3.2.1.3.3	Qualitative Analyse der <i>Cnox-1</i> -Morpholino-Gen-Inhibition	67
3.2.1.4	Exemplarische Darstellung der PAMs der <i>Cnox-1</i> -Studien.....	69
3.2.2	Untersuchungen am <i>Cnox-2</i> -Gen.....	72
3.2.2.1	Expressionsstudien	72
3.2.2.2	<i>Cnox-2</i> -Inhibition mittels dsRNA	75
3.2.2.2.1	Quantitative Analyse des <i>Cnox-2</i> -RNAi- <i>Knock-Downs</i>	75
3.2.2.2.2	Qualitative Analyse des <i>Cnox-2</i> -RNAi- <i>Knock-Downs</i>	76
3.2.2.3	<i>Cnox-2</i> -Inhibition mittels Morpholino-Antisense-Oligos	78
3.2.2.3.1	Quantitative Analyse der <i>Cnox-2</i> -Morpholino-Gen-Inhibition ..	78
3.2.2.3.2	Qualitative Analyse der <i>Cnox-2</i> -Morpholino-Gen-Inhibition	79
3.2.2.4	Exemplarische Darstellung der PAMs der <i>Cnox-2</i> -Studien.....	81
3.2.3	Untersuchungen am <i>Cnox-3</i> -Gen.....	83
3.2.3.1	Expressionsstudien	83
3.2.3.2	<i>Cnox-3</i> -Inhibition mittels dsRNA	86
3.2.3.2.1	Quantitative Analyse des <i>Cnox-3</i> -RNAi- <i>Knock-Downs</i>	86
3.2.3.2.2	Qualitative Analyse des <i>Cnox-3</i> -RNAi- <i>Knock-Downs</i>	87
3.2.3.3	<i>Cnox-3</i> -Inhibition mittels Morpholino-Antisense-Oligos	89
3.2.3.3.1	Quantitative Analyse der <i>Cnox-3</i> -Morpholino-Gen-Inhibition ..	89
3.2.3.3.2	Qualitative Analyse der <i>Cnox-3</i> -Morpholino-Gen-Inhibition	90
3.2.3.4	Exemplarische Darstellung der PAMs der <i>Cnox-3</i> -Studien.....	92
3.2.4	Untersuchungen am <i>Cnox-4</i> -Gen.....	94
3.2.4.1	Expressionsstudien	94
3.2.4.2	<i>Cnox-4</i> -Inhibition mittels dsRNA	96
3.2.4.2.1	Quantitative Analyse des <i>Cnox-4</i> -RNAi- <i>Knock-Downs</i>	96
3.2.4.2.2	Qualitative Analyse des <i>Cnox-4</i> -RNAi- <i>Knock-Downs</i>	97
3.2.4.3	<i>Cnox-4</i> -Inhibition mittels Morpholino-Antisense-Oligos	98
3.2.4.3.1	Quantitative Analyse der <i>Cnox-4</i> -Morpholino-Gen-Inhibition ..	98
3.2.4.3.2	Qualitative Analyse der <i>Cnox-4</i> -Morpholino-Gen-Inhibition	99
3.2.5	Untersuchungen am <i>Cnox-5</i> -Gen.....	100
3.2.5.1	Expressionsstudien	100
3.2.5.2	<i>Cnox-5</i> -Inhibition mittels dsRNA	102
3.2.5.2.1	Quantitative Analyse des <i>Cnox-5</i> -RNAi- <i>Knock-Downs</i>	102
3.2.5.2.2	Qualitative Analyse des <i>Cnox-5</i> -RNAi- <i>Knock-Downs</i>	103
3.2.5.3	<i>Cnox-5</i> -Inhibition mittels Morpholino-Antisense-Oligos	105
3.2.5.3.1	Quantitative Analyse der <i>Cnox-5</i> -Morpholino-Gen-Inhibition ..	105
3.2.5.3.2	Qualitative Analyse der <i>Cnox-5</i> -Morpholino-Gen-Inhibition	106
3.2.5.4	Exemplarische Darstellung der PAMs der <i>Cnox-5</i> -Studien.....	108

3.2.6 Vergleichende Analyse der Inhibitionsstudien	110
3.2.7 Simultane Inhibition aller fünf <i>Cnox</i> -Gene	112
4. DISKUSSION	114
4.1 Methodische Aspekte	114
4.1.1 Inhibitions-Experimente	114
4.1.2 <i>In situ</i> Hybridisierung	115
4.2 Funktion der untersuchten Homöoboxgene	116
4.2.1 Funktion von <i>Trox-2</i> in <i>Trichoplax</i>	116
4.2.2 Funktionen der untersuchten <i>Cnox</i> -Gene in <i>Eleutheria</i>	117
4.2.2.1 Funktion von <i>Cnox-1</i>	119
4.2.2.2 Funktion von <i>Cnox-2</i>	120
4.2.2.3 Funktion von <i>Cnox-3</i>	122
4.2.2.4 Funktion von <i>Cnox-4</i>	123
4.2.2.5 Funktion von <i>Cnox-5</i>	123
4.3 Ausblick	125
5. ANHANG	126
5.1. cDNA-Sequenzen der Homöoboxgene	126
5.2 Sequenzen der Morpholino-Antisense-Oligonukleotide	131
5.3 Sequenzen der Antisense-Oligodesoxyribonukleotide	131
5.4 Sequenzen der genspezifischen <i>Primer</i>	132
5.5 Ergebnisse der Inhibitionsstudien	133
6. LITERATURVERZEICHNIS	143
7. DANKSAGUNG	158
8. LEBENSLAUF	159

1. EINLEITUNG

“Im Frühjahr 1910 traten *Eleutheria* und *Trichoplax adhaerens* in den Seewasseraquarien des Berliner Zoologischen Instituts in so großen Mengen auf, daß es verlockend schien, die von KRUMBACH angegebenen Beziehungen zwischen diesen beiden Organismen und namentlich Organisation des so interessanten *Trichoplax* neu zu untersuchen.“

H. SCHUBOTZ, 1912

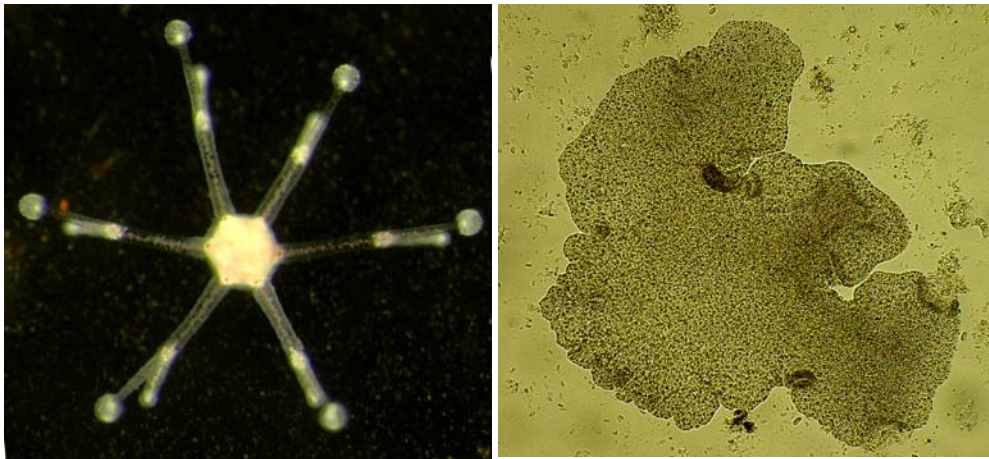


Abb. 1.1 Meduse des Hydrozoons *Eleutheria dichotoma* (links) und *Trichoplax adhaerens* (Aufsicht bei 30-facher Vergrößerung).

Die genetische Basis der Ontogenese, welche die zeitliche und räumliche Organisation eines Lebewesens festlegt (Musterbildung), wird von regulatorischen Genen kontrolliert. Erkenntnisse zum evolutiven Ursprung der Musterbildung in Metazoen sind gleichermaßen abhängig von einem Verständnis der genetischen Grundlagen morphologischer Muster und einem gesicherten Wissen über die phylogenetischen Beziehungen innerhalb der ursprünglichen (diploblastischen) Vielzeller. Hox/ParaHox-Gene sind für die Determination wesentlicher Merkmale des Eumetazoenbauplans essenziell und stellen ein wichtiges Bindeglied zwischen der Ontogenie und Phylogenie von Musterbildungen dar (vgl. HOLLAND et al., 1994; TAUTZ, 1994; AKAM, 1995; SCHIERWATER & DESALLE, 2001; WAGNER, 1996, 2001; TALLAFUSS & BALLY-CUIF, 2002; RONSHAUGEN et al., 2002). Mit der Entdeckung verschiedener Familien von Homöoboxgenen in Diploblasten und ersten Nachweisen ihrer Beteiligung an Musterbildungsprozessen (SCHUMMER et al., 1992; SHENK et al., 1993a, b; AERNE et al., 1995; MOKADY et al., 1998; CARTWRIGHT & BUSS, 1999; CARTWRIGHT et al., 1999; BRIDGE et al., 2000; YANZE et al., 2001; JAKOB et al., 2004) hat sich die Möglichkeit eröffnet, durch das

vergleichende Studium dieser Gene wertvolle Informationen zur Phylogenie der Diploblasten und letztlich zur evolutiven Herkunft der Musterbildung zu gewinnen.

Es sind mehrere Gengruppen für die Embryogenese verantwortlich, sie sind in ihrer Funktion hierarchisch unterteilt. In *Drosophila* wurden die Funktionen dieser basalen, entwicklungsbiologischen Regulatorgene erstmals untersucht und verstanden. Man unterscheidet zwischen den maternalen und den zygotischen Genen (HENNIG, 2002). Die maternalen, auf dem Genom der Weibchen basierenden Genprodukte entstehen während der Oogenese und vorwiegend in den Nährzellen. Der Transport erfolgt über Cytoplasmabrücken in die Oocyte. Es handelt sich bei diesen Produkten um Morphogene - Moleküle, die die Entwicklung des embryonalen Musters regulieren. Die Körperachsen innerhalb des Embryos werden durch Morphogene maternalen Ursprungs festgelegt. Maternale Gene werden zwar während der Oogenese transkribiert, ihre Wirkung zeigt sich allerdings erst im Embryo (HENNIG, 2002). Diese maternalen Polaritätsgene sind für die Lage der anterioren, posterioren und terminalen Region, die Bilateralsymmetrie sowie für die dorsoventrale Achse verantwortlich. Auf der Basis eines Konzentrationsgefälles der Genprodukte entlang der anterior-posterioren Achse wird hierbei die Positionsinformation vermittelt. Der Gradient leitet die Schaffung einer Reihe diskreter Körpersegmente. Dieser Vorgang wird von verschiedenen Klassen von Segmentierungsgenen koordiniert (zygotische Gene): *Gap*-Gene unterteilen zunächst den Embryo grob in vier Zonen (WU et al., 2001). Die genaue Anzahl und Lage der Segmente wird durch die Segmentpolaritätsgene bestimmt (YOFFE et al., 1995). Diese unterstehen regulatorisch der Kontrolle der Paarregelgene, die den Körperplan zuvor in Segmentpaare unterteilen (MINET et al., 1999). Die Segmentidentität wird letztendlich durch homöotische Gene festgelegt (MCGINNIS et al., 1984a, b; GEHRING & HIROMI, 1986; DUBOULE, 1994). Maternale Polaritätsgene, Segmentierungsgene und homöotische Gene wirken so hierarchisch nacheinander auf immer kleinere Bereiche des Embryos ein.

Erstmals beschrieben wurden homöotische Gene in *Drosophila melanogaster* im Rahmen von Mutationsexperimenten (MCGINNIS et al., 1984a; SCOTT & WEINER, 1984; SCHNEUWLY et al., 1987), in den Folgejahren wurden sie aber auch in Organismen zahlreicher anderer Tierstämme nachgewiesen (BEEMAN et al., 1989; DUBOULE, 1994). Allen homöotischen Genen gemein ist eine charakteristische Teilsequenz, welche 180bp umfasst und als Homöobox bezeichnet wird. Die Homöobox kodiert für eine Polypeptidsequenz von 60 Aminosäuren innerhalb des translatierten Proteins (KESSEL et al., 1987; SCOTT et al., 1989). Dieser als Homöodomäne bezeichnete Proteinbereich bindet mit sehr hoher Affinität an spezifische Genkontrollregionen und vermittelt die Funktion der Homöoboxgene

als Transkriptionsfaktoren im Zuge der Genexpression (z.B.: DESPLAN et al., 1985, 1988; ODENWALD et al., 1987; HOEY & LEWINE, 1988; KISSINGER, 1990; GEHRING, 1998). Die Tertiärstruktur der Homöodomäne birgt zwei gegeneinander abgewinkelte Alphahelix-Subdomänen in sich, welche eine Helix-Turn-Helix-Struktur (HTH) ausbilden. Diese HTH ermöglicht die Interaktion zwischen dem Protein und der DNA-Doppelhelix (z.B.: GEHRING et al., 1990, 1994; WOLBERGER et al., 1991; BILLETER et al., 1993; BÜRGLIN, 1994). Die Homöodomänen zweier oder mehrerer solcher Transkriptionsfaktoren können symmetrische Polymere ausbilden und mit dem HTH-Motiv an die Steuersequenz vor den spezifischen Regulatorgenen binden, welche entsprechend aktiviert oder reprimiert werden.

Die erste Sequenz einer Homöobox wurde im Antennapedia-Gen (*antp*) von *Drosophila melanogaster* charakterisiert (MCGINNIS et al., 1984a, b, c; GEHRING & HIROMI, 1986; GEHRING et al., 1990; MCGINNIS & KRUMLAUF, 1992). Die enorme Bedeutung dieser Gensequenz wurde deutlich als man entdeckte, dass eine DNA-Sonde dieser Homöobox mit dem Genom fast aller Eukaryontenstämme hybridisiert (MALICKI et al., 1990; MCGINNIS et al., 1990). Die geringe Sequenzdivergenz zwischen Homöoboxen von Vertebraten und Invertebraten sowie die konservierte genomische Anordnung der homologen (orthologen) Homöoboxgene lassen auf eine frühe Entstehung während der Metazoen-Evolution schließen (KAPPEN et al., 1993; RAFF, 1996; ZHANG & NEI, 1996). Die Anordnung nahezu aller bisher untersuchten Homöoboxgene von Eumetazoen in einem Komplex (Cluster) und die weitestgehend gleiche Kollinearität zwischen der physikalischen Reihenfolge der Einzelgene eines Genkomplexes auf den Chromosomen und dem räumlich-zeitlichen Expressionsmuster im Organismus bestärken diese These (Übersicht in SPIROV et al., 2000). Die lineare Organisation der Homöoboxgene auf dem Chromosom spiegelt die triploblastische Anterior-Posterior-Achse (A-P-Achse) im Embryo wider. Die 3'-nahen Gene werden hierbei früh und weiter anterior, die 5'-nahen Gene später und weiter posterior im Körper exprimiert (GRAHAM et al., 1989; KENYON & WANG 1991; WANG et al., 1993). Die Anzahl dieser Gene und Gencluster variiert innerhalb der einzelnen Tierstämme. Plathelminthen (10 Hox/ParaHox-Gene, HOLLAND, P., 2004, pers. Mittlg.; GARCIA-FERNANDEZ et al., 1991; GUILLERMO et al., 1992; OLIVER et al., 1992; BARTELS et al., 1993), Nematoden (z.B.: KENYON & WANG, 1991; SALSER & KENYON, 1994), Anneliden (z.B.: DICK & BUSS, 1994; SHANKLAND & SEEVER, 2000), Arthropoden (12 Hox/ParaHox-Gene, HOLLAND, P., 2004, pers. Mittlg.; STUART et al., 1991; AVEROF & AKAM, 1993; CARTWRIGHT et al., 1993; AVEROF et al., 1996; DENELL et al., 1996; AVEROF & PATEL, 1997) und Echinodermaten (DOLECKI et al., 1988; POPODI et al., 1996) besitzen einen einzigen Genkomplex, während bei Vertebraten vier solcher Hox-Gencluster (Hox A, Hox B, Hox C, Hox D; 39 Hox-, 6 ParaHox-Gene,

HOLLAND, P., 2004, pers. Mittlg.) vorhanden sind (z.B.: MCGINNIS et al., 1984b, c; RUBIN et al., 1986; BOGARAD et al., 1989). Bei *Drosophila* liegen die Gene des Komplexes zusammengefasst auf dem dritten Chromosom (COULIER et al., 2000). Dieser Homöoboxgencluster (HOM-C) ist in zwei Untergruppen gegliedert, den Antennapedia-Komplex (*Antp-C*; REGULSKI et al., 1987; KAUFMANN et al., 1990; DIEDERICH et al., 1991; CRIBBS et al., 1992) und den Bithorax-Komplex (*BX-C*; LEWIS, 1978; DUNCAN, 1987; LEWIN, 1998). Der Komplex definiert im Rahmen der Embryogenese die Spezifikation der Körpersegmente entlang der anterioren-posterioren Achse (z.B.: SCOTT & O'FARRALL, 1986; SCOTT & CARROLL, 1987; HOLLAND & HOGAN, 1988; MCGINNIS & KRUMLAUF, 1992; RUSCH & KAUFMAN, 2000). In der Evolution der Vertebraten ist durch zweifache Duplikation des Genclusters ein vierfacher Satz entstanden, wobei einige Homöoboxgene sekundär degenerierten (HOLLAND, 1992; GARCIA-FERNANDEZ & HOLLAND, 1994; POLLARD & HOLLAND, 2000). Diese vier Vertebraten-Hox-Genkomplexe sind auf vier verschiedenen Chromosomen angeordnet und bestehen aus je 9-11 Homöoboxgenen der Hox-Genfamilie (insgesamt 39 Hox-Gene; HART et al., 1985; BUCAN et al., 1986; BARON et al., 1987; UTSET et al., 1987; BREIER et al., 1988; AKAM, 1989; HOLLAND, 1992; vgl. Abb. 1.2).

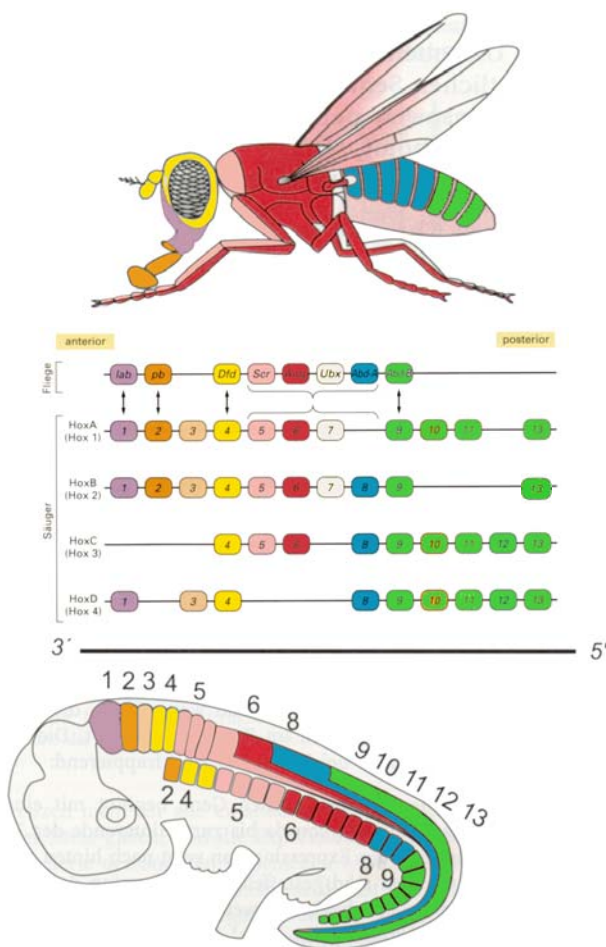


Abb. 1.2 Organisation homöotischer Gencluster und ihre Konservierung in der Evolution bei *Drosophila* und Vertebraten. Gleiche Farben repräsentieren orthologe Homöoboxgene der Hox-Gen-Familie. Die Gene eines Clusters sind paralog und gehen auf Genduplikation in der Evolution zurück. Modifiziert nach MCGINNIS & KRUMLAUF (1992) und MÜLLER & HASSEL (1999). Abkürzungen betreffen: *lab* (labial), *pb* (proboscipedia), *Dfd* (Deformed), *Scr* (Sex combs reduced), *Antp* (Antennapedia), *Ubx* (Ultrabithorax), *Abd-A* (Abdominal-A) und *Abd-B* (Abdominal-B).

1998 konnte die Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Peter HOLLAND am Beispiel von *Amphioxus* (*Cephalochordata*) zeigen, dass drei ParaHox-Gene (*Gsx*, *Xlox* und *Cdx*) ebenfalls in einem Cluster organisiert sind und gleich den Hox-Genen Korrelationen zwischen chromosomaler Anordnung und räumlicher Determinationsfunktion entlang der A-P-Achse des Embryos bestehen (FERRIER & HOLLAND, 2001a, b). Weitere Studien

an *Amphioxus* ergaben, dass das *Gsx*-Gen in der anterioren, cerebralen Körperregion exprimiert wird (BROOKE et al., 1998). Der Hox-Gencluster von *Amphioxus* besteht aus 14 Hox-Genen, plus *EvxA* und *EvxB* (MINGUILLÓN et al., 2002). Die vier ParaHox-Gencluster der Vertebraten besitzen sechs ParaHox-Gene aus drei Genfamilien (*Gsx*-Genfamilie: *Gsh1*, *Gsh2*, HSIEH-LI et al., 1995; LI et al., 1996; SZUCSIK et al., 1997; *Xlox*-Genfamilie: *lpf1*, KIM et al., 2002; *Cdx*-Genfamilie: *Cdx1*, *Cdx2*, *Cdx4*; SPRING, 2002). Hox- und ParaHox-Gene werden gemeinsam mit den NK- und NK-verwandten Genen (LUKE et al., 2003) zu den ANTP-Superklasse-Genen zusammengefasst, die insgesamt aus 29 Genfamilien bestehen (CASTRO & HOLLAND, 2003; HOLLAND, P., 2004, pers. Mittlg.).

Ein gegenwärtiges Evolutionsmodell der Hox/ParaHox-Genkomplexe beschreibt einen ancestralen ProtoHox-Gencluster, aus welchem durch Duplikation, noch vor der Divergenz der Diplo- und Triploblasten, ein Hox- und ein ParaHox-Gencluster entstanden sein sollen (BROOKE et al., 1998; FERRIER & HOLLAND, 2001a, b; YANZE et al., 2001; FERRIER & HOLLAND, 2002; FINNERTY et al., 2003; vgl. Abb.1.3).

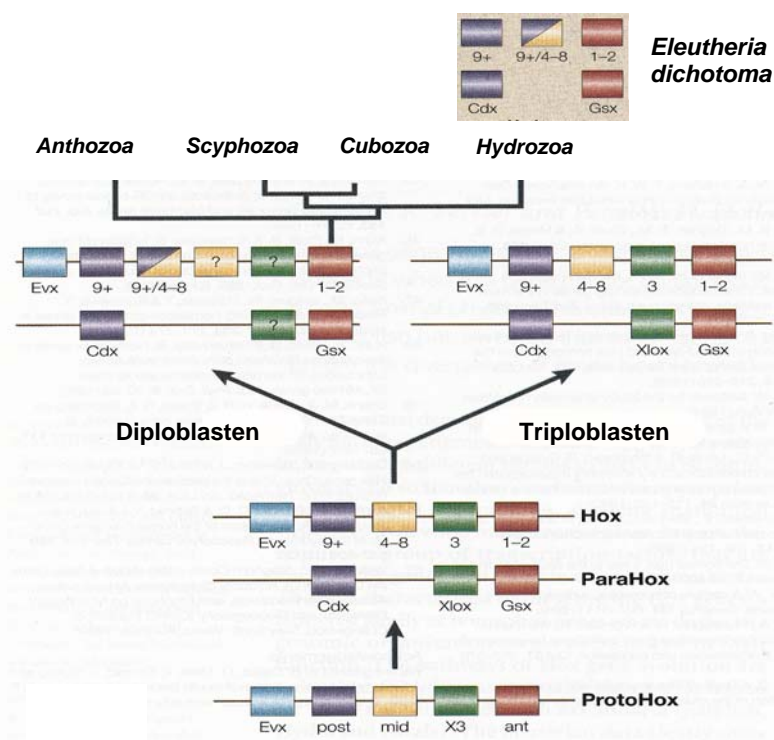


Abb. 1.3 Hypothese zur Evolution von Hox- und ParaHox-Genclustern. Durch Duplikation eines ancestralen ProtoHox-Clusters sollen der Hox- und der ParaHox-Gencluster entstanden sein. Der ProtoHox-Gencluster besteht aus vier Genen (*post*, posterior; *mid*, middle; *X3* und *ant*, anterior) und *Evx*. Gene eines Clusters stellen paraloge Gruppen dar, gleiche Farben beschreiben orthologe Gene (z.B.: *Gsx* im ParaHox-Gencluster und *Hox1-2* des Hox-Genclusters von *Eleutheria dichotoma* gehen phylogenetisch auf das ancestrale *ant*-Gen zurück). Das *Cnox-2*-Gen der Hydrozoen und das *Trox-2*-Gen der Placozoen werden nach diesem Modell als *Gsx*-Homologe angesehen und zu den ParaHox-Genen gruppiert. Modifiziert nach FERRIER & HOLLAND (2001a).

Das "head trunk and tail"-Modell nach SCHUBERT et al. (1993) hingegen beschreibt einen hypothetischen Vorfahren aller Diplo- und Triploblasten, der bereits drei Hox-Gene besaß, von welchen sich der HOM-C-Komplex von *Drosophila melanogaster* (head, anterior: *lab* und *pb*; trunk, medial: *Dfd*, *Scr*, *Antp*, *Ubx* und *abd-A*; und tail, posterior: *Abd-B*; vgl. Abb. 1.2) ableitet. Die Duplikation des ancestralen *lab/pb*-Gens soll nach SCHUBERT et al. (1993) sehr früh in der Evolution der Metazoen stattgefunden haben (auch MURTHA et al., 1991; KAPPEN et al., 1993; SLACK et al., 1993). ZHANG & NEI (1996) modifizierten diese Theorie nachfolgend in Teilen. Da dieses Modell aber fast ausschließlich auf Daten von Triploblasten-Hox-Genen beruht, werfen Ergebnisse neuerer Arbeiten erhebliche Fragen auf, ob das "head trunk and tail"-Modell auch auf diploblastische Organismen übertragbar ist (SCHIERWATER & KUHN, 1998; GAUCHAT et al., 2000; FERRIER & HOLLAND, 2001a; SCHIERWATER & DESALLE, 2001). Bisweilen wurden wenige Studien erbracht, welche dieses Modell bestärken. Es existieren lediglich Arbeiten, die Aussagen über Expressionsintensitäten verschiedener Homöoboxgene entlang der Aboral-Oral-Achse treffen (z.B.: SCHUMMER et al., 1992; NAITO et al., 1993; SHENK et al., 1993a, b; AERNE et al., 1995; MOKADY et al., 1998; CARTWRIGHT & BUSS, 1999; CARTWRIGHT et al., 1999; BRIDGE et al., 2000), eine genaue Beschreibung, wie diese Gene ontogenetische Musterbildungsprozesse steuern, bestimmte phänotypische Merkmale oder gar die Körperlängsachse definieren, wird jedoch nicht geliefert.

Um die Evolution der Hox/ParaHox-Gene insgesamt zu verstehen, wurden verschiedene Anstrengungen unternommen, diese insbesondere bei niederen Tieren (Diploblasten) zu untersuchen. Die Identifizierung von Homöoboxgenen der Hox-Genfamilie in Diploblasten gelang erstmals bei den Hydrozoen *Sarsia spec.*, *Eleutheria dichotoma* (*Cnox-1* und *Cnox-2*) und *Hydractinia symbiolongicarpus* (MURTHA et al., 1991; SCHIERWATER et al., 1991). Die beschriebenen Gensequenzen zeigten Ähnlichkeiten zu den Homöoboxgenen *lab* und *pb* des Antennapedia-Komplexes von *Drosophila*, welche die anterioren Parasegmente 1-4 definieren. 1993 gelang es, ein *Cnox-2*-Homolog in *Hydra vulgaris* zu identifizieren und zu zeigen, dass graduelle Korrelationen zwischen Expressionsort und Expressionsintensität des *Cnox-2*-Proteins entlang der Aboral-Oral-Achse des *Hydra*-Polypen bestehen (SHENK et al., 1993a). Ähnliche aber teilweise auch sehr widersprüchliche Befunde zur Expression der *Cnox-2*-Gene wurden für das Hydrozoon *Hydractinia symbiolongicarpus* postuliert (CARTWRIGHT & BUSS, 1999; CARTWRIGHT et al., 1999; Übersicht in SCHIERWATER et al., 2002). Expressionsstudien bei *Podocoryne carnea* (Hydrozoa) ergaben, dass *Cnox-1-Pc*, ein *Cnox-5*-Homolog von *Eleutheria dichotoma*, in Musterbildungsprozesse der Meduse involviert ist und wahrscheinlich eine regulatorische Funktion bei der

Differenzierung der Muskelzellen einnimmt (AERNE et al., 1995; MÜLLER et al., 1999; YANZE et al., 1999; MASUDA-NAKAGAWA et al., 2000; YANZE et al., 2001). Nachfolgend wurden die ersten fünf Hox-Gene aus einem Scyphozoon (*Cassiopea xamachana*; *Scox-1 - Scox-5*; KUHN et al., 1999) und drei weitere Hox-Gene aus *Eleutheria dichotoma* (*Cnox-3, Cnox-4, Cnox-5*; KUHN et al., 1996; SCHIERWATER & KUHN, 1998) isoliert und sequenziert. Die vollständigen cDNA-Sequenzen der fünf *Cnox*-Gene von *Eleutheria dichotoma* belegen ihre eindeutige Zugehörigkeit zur Familie der Hox-Gene, wobei Anzahl und strukturelle Eigenschaften dieser Gene einigen zuvor geäußerten Vorstellungen zur Beschaffenheit eines für die Triploblasten ancestralen Hox-Genclusters nicht entsprechen (KUHN et al., 1996; KUHN et al., 1999; FERRIER & HOLLAND, 2001a, b; SCHIERWATER & DESALLE, 2001; FERRIER & HOLLAND, 2002).

In Schwämmen (*Porifera*) und Rippenquallen (*Ctenophora*) konnten bisher keine Homöoboxgene der Hox-Genfamilie isoliert werden. Alle ehemals beschriebenen Hox-Genfragmente dieser beiden diploblastischen Tierstämme (KRUSE et al., 1994, SEIMIYA et al., 1994, DEGNAN et al., 1995; FINNERTY et al., 1996; FINNERTY & MARTINDALE, 1998) wurden als nicht real zurückgezogen, da es sich in allen Fällen um Kontaminationsprodukte von anderen Tiergruppen (v.a. *Plathelminthes*) handelte. Der fehlende Nachweis von Hox-Homologen in Schwämmen ließe sich dadurch erklären, dass diese Gene in diesem Tierstamm sekundär verloren gegangen sind bzw. nie vorhanden waren. Letztere Erklärung wäre wahrscheinlicher, wenn die *Porifera* basal innerhalb der Diploblasten wären (COLLINS, 1998; MÜLLER, 1998; PETERSON & EERNISSE, 2001). Dieser Hypothese widersprechen allerdings viele der bisherigen, phylogenetischen Rekonstruktionsversuche (z.B.: ENDER & SCHIERWATER, 2003; SCHIERWATER et al., 2004, unveröffentlichte Daten).

Aus *Trichoplax adhaerens*, dem einzigen rezenten Vertreter der *Placozoa*, konnte ein Homöoboxgen der Hox-Genfamilie (*Trox-2*) isoliert und beschrieben werden (SCHIERWATER & KUHN, 1998). Zweifelsfrei ist das *Trox-2*-Gen homolog zum *Cnox-2*-Gen der Hydrozoen, Scyphozoen und Anthozoen (*Anthox-2*, FINNERTY & MARTINDALE, 1997; FINNERTY, 1998) und möglicherweise ubiquitär in allen Diploblastengruppen vorkommend (SCHIERWATER et al., 2002). Verschiedene Autoren verstehen das *Diplox-2*-Gen als *Gsx*-Homolog der Triploblasten, und somit als ein ParaHox-Gen (FINNERTY & MARTINDALE, 1999; GAUCHAT et al., 2000; KOURAKIS & MARTINDALE, 2000; FERRIER & HOLLAND, 2001a, b; YANZE et al., 2001; FINNERTY et al., 2003; vgl. Abb. 1.3), während andere Autoren eine direkte Homologisierung zwischen den Hox/ParaHox-Genen von Diploblasten und Triploblasten anzweifeln (SCHIERWATER & DESALLE, 2001). Eventuell müssen die Diplox-Gene als chimäre Formen der Triploblasten-Hox-Gene verstanden werden.

Die Funktion der Hox/ParaHox-Gene in Diploblasten ist bis heute weitestgehend unbekannt, so dass derzeit nicht eindeutig entschieden werden kann, ob die Diplox-Gene eine Funktion bei der Ausbildung der Körperlängsachse haben und eine den Triploblasten möglicherweise homologe Anterior-Posterior-Achse determinieren.

Um die Diskrepanz zwischen bestehenden theoretischen Modellen einerseits und den wenigen empirischen Daten andererseits zu nivellieren, werden dringend weitere vergleichend experimentelle Datensätze zur Expression und Funktion der Hox/ParaHox-Gene in Diploblasten notwendig. Die vorliegende Arbeit soll einen Beitrag zum Verständnis von Expression und Funktion der Hox/ParaHox-Gene in diploblastischen Organismen liefern. Als Untersuchungsobjekte dienen das athekate Hydrozoon *Eleutheria dichotoma* und das Placozoon *Trichoplax adhaerens*, von welchen die gDNA- und cDNA-Sequenzen von sechs Homöoboxgenen der Hox-Genfamilie bereits bekannt sind (*Cnox-1* - *Cnox-5* und *Trox-2*; SCHIERWATER et al., 1991; KUHN et al., 1996; KUHN, 1997; SCHIERWATER & KUHN, 1998).

Es soll mittels Antisense-Oligodesoxyribonukleotiden (z.B.: ZAMECZNIK & STEVENSON, 1978; STEIN & COHAN, 1989; WOOLF et al., 1992; HARTH et al., 2000), Morpholino-Antisense-Oligonukleotiden (PARTRIDGE et al., 1996; SUMMERTON et al., 1997; SUMMERTON & WELLER, 1997) und doppelsträngiger RNA (dsRNA; z.B.: FIRE et al., 1998; TIMMONS & FIRE, 1998; TABARA et al., 1999; MARTENS et al., 2002) eine Inhibition einzelner Hox/ParaHox-Gene herbeigeführt werden, um phänotypische Veränderungen in der Entwicklung und/oder in der Morphologie zu dokumentieren. Des Weiteren soll, neben den Inhibitionsstudien, ein Protokoll für ein neues, nicht-radioaktives *whole mount in situ* Hybridisierungs-Verfahren für Diploblasten, speziell für *Trichoplax adhaerens*, entwickelt werden, um die zeitlichen und räumlichen Expressionsmuster der untersuchten Gene aufzuklären.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 DIE UNTERSUCHUNGSOBJEKTE

2.1.1 *TRICHOPLAX ADHAERENS*



Abb. 2.11 *Trichoplax adhaerens* (Aufsicht bei 50-facher Vergrößerung).

“In den Seewasseraquarien des Zoologischen Institutes der Universität Graz lebt ein bisher noch nicht beschriebenes Thier, dessen Organisation und Lebenserscheinung mir ein so gründliches und lange fortgesetztes Studium zu erfordern scheinen, (...)“ begann der deutsche Zoologe Franz Eilhard SCHULZE 1883 respektvoll seine Mitteilung über die Entdeckung eines bis dato unbekanntes Tieres. Eine genaue Beschreibung der von ihm *Trichoplax adhaerens* genannten neuen Spezies folgte 1891. Demnach handelt es sich um einen beidseitig begeißelten (griech.: *trichos* = Haar), aus drei Epithelien aufgebauten Organismus, dessen “dorsoventral“ abgeplatteter Körper (griech.: *plax* = Platte, Scheibe) sich mit der Unterseite an Substratunterlagen anzuheften vermag. SCHULZE (1883) vermutete aufgrund der geringen Größe - bei

rundlicher Gestalt selten größer als 2 mm, bei langgezogener Form selten länger als 10 mm - und des überaus einfachen histologischen Körperbaus, dass es sich bei *Trichoplax adhaerens* um einen besonders ursprünglichen Vielzeller handelt, dem im System der mehrzelligen Tiere (*Metazoa*) eine basale Stellung zukommt. 1884 entwickelte der deutsche Zoologe O. BÜTSCHLI, angeregt durch SCHULZES *Trichoplax*-Beschreibung, ein neues Modell zur Metazoenevolution, die so genannte Plakula-Theorie, welche er als Alternative zu Ernst HAECKELS Blastaea-/Gastraea-Theorie (1866) veröffentlichte (s.a. BÜTSCHLI, 1910; GRELL, 1971a, c, 1974, 1979; SYED & SCHIERWATER, 2002a). 1893 meldete der Italiener MONTICELLI die Entdeckung einer Spezies, die *Trichoplax adhaerens* morphologisch sehr ähnlich war, und vergab für diese den Namen *Treptoplax reptans* (MONTICELLI, 1896; GRELL & BENWITZ, 1971). Inzwischen bezweifelt man aber ihre Existenz, da diese Form seitdem nie wieder beobachtet werden konnte.

1907 postulierte der Zoologe T. KRUMBACH, dass es sich bei *Trichoplax adhaerens* um eine aberrante Larvenform der Hydromeduse *Eleutheria krohni* handeln würde. Obwohl dafür wissenschaftliche Befunde fehlten, setzte sich diese Vermutung in bedeutenden zoologischen Lehrbüchern fest und führte zu einem Verschwinden von *Trichoplax adhaerens* aus der Spezialliteratur. Dieser Ansicht widersprachen Untersuchungen von H. SCHUBOTZ (1912) und F.E. SCHULZE (1914). Der Protozoologe K.G. GRELL widerlegte schließlich KRUMBACHS Larvenhypothese. Er entdeckte 1971 sexuelle Fortpflanzung bei *T. adhaerens* (GRELL, 1971b) und schlug daraufhin vor, für das Tier - obwohl nur durch eine sicher bekannte, rezente Art vertreten - einen eigenen Tierstamm (*Placozoa*) zu errichten (der Name wurde *in memoriam* BÜTSCHLIS Plakula-Theorie vergeben). Diesem Vorschlag wird heute in den meisten zoologischen Standardwerken Folge geleistet. Kontrovers diskutiert wird jedoch, ob diese Stammlinie wirklich an der Basis der Metazoenevolution abzweigte, oder ob es sich um einen sekundär vereinfachten Organismus handelt (Literaturübersicht in SYED & SCHIERWATER, 2002a, b). In diesem Zusammenhang wird *Trichoplax adhaerens* häufig als Nachfahre einer neotenen Planularlarve angesehen, was die widerlegte Larvenhypothese von KRUMBACH (1907) auf der phylogenetischen Ebene reanimiert. Die meisten morphologischen, entwicklungsbiologischen, aber vor allem die neusten molekularbiologischen Befunde suggerieren eine basale Stellung der *Placozoa* in der Metazoenevolution (z.B.: ENDER & SCHIERWATER, 2003; SCHIERWATER et al., 2004, unveröffentlichte Daten).

2.1.1.1 MORPHOLOGIE UND LEBENSZYKLUS

Trichoplax adhaerens ist weltweit im Litoral subtropischer und tropischer Meere in einer Wassertiefe bis ca. 20 m zu finden (GRELL & LÓPEZ-OCHOTERENA, 1987; PEARCE, 1989). Sein sehr einfacher, dreischichtiger Körperbauplan mit lediglich vier verschiedenen somatischen Zelltypen resultiert aus der Entwicklung aus nur zwei Keimblättern, dem Ekto- und Entoderm. Das morphologisch obere Epithel ist außerordentlich dünn und besteht aus einer Lage unregelmäßig miteinander verzahnter Deckzellen, von denen jede eine Geißel trägt. Zuweilen sind in diese obere Zellschicht Glanzkugeln, fettartige Einschlüsse degenerierter Zellen, eingelagert (GRELL & BENWITZ, 1971; vgl. Abb. 2.12).

Die Zwischenschicht, welche das obere und untere Epithel voneinander trennt, stellt einen flüssigkeitsgefüllten Spaltraum dar, der von Faserzellen durchzogen ist, die jedoch in der äußeren Randzone des Tieres fehlen (GRELL & BENWITZ, 1981). Über lange Fortsätze stehen diese miteinander in Verbindung und bilden eine mesenchymartige Schicht. Im Gegensatz zu den übrigen Zelltypen besitzen die Faserzellen sehr große Mitochondrien, die zusammen mit etwa gleichgroßen Vesikeln den charakteristischen Mitochondrienkomplex bilden. Stets enthalten sie eine ausgeprägte Konkrementvakuole. In den Zisternen des endoplasmatischen Reticulums kommen regelmäßig Bakterien vor, die offenbar Endosymbionten der Faserzellen sind (GRELL, 1971b, 1972; vgl. Abb. 2.12).

Das morphologisch untere Epithel ist dicker als das obere, da die Zellen eine birnen- oder keulenförmige Gestalt besitzen und palisadenartig angeordnet sind. Zwischen den Zellen findet sich häufig ein schaumig aufgegliedertes, osmiophiles Material, das – gleich den Glanzkugeln – durch Degeneration von Zellen entsteht (GRELL, 1972). Die begeißelten Zylinderzellen bilden die Hauptmasse des Epithels. An ihrer distalen Oberfläche entspringen leisten- oder faltenartige Fortsätze (Mikrovilli), die bei der Resorption der Nährstoffe beteiligt sind (GRELL, 1972). Da diese Auffaltungen häufig gefenstert sind, erhält die Oberfläche des "Ventralepithels" eine spongiöse Struktur (GRELL & BENWITZ, 1981). Zwischen den Zylinderzellen findet man vereinzelt mit Sekretflüssigkeit gefüllte, unbegeißelte Drüsenzellen eingelagert. Funktionell kann man das nutritorische, untere Epithel als Gastrodermis bezeichnen (GRELL & BENWITZ, 1981). Die Verdauung vollzieht sich zunächst extrazellulär in einem vom Tier überdeckten, oft durch die Ausbildung von Randwülsten oder durch temporäres Aufwölben einzelner Bereiche, abgeschlossenen Raum (GRELL & BENWITZ, 1971; GRELL, 1972). Die durch Exoenzyme sezierte Nahrung wird über Pinocytose in die Drüsen- oder Zylinderzellen aufgenommen (GRELL, 1974; GRELL & BENWITZ, 1981). Größere

Partikel der extrasomatischen Verdauung passieren das untere Epithel über Interzellularräume, um in der Zwischenschicht von den Faserzellen phagozytiert zu werden (GRELL & BENWITZ, 1974a, 1981; RUTHMANN et al., 1986). Den Epithelien von *Trichoplax adhaerens* fehlen Basalmembranen (Basallaminae) völlig, alle Zellen sind lediglich über Desmosomen verbunden. Wie RUTHMANN (1977) nachweisen konnte, finden in allen drei Epithelien Zellteilungen statt. Die Zellen sind mit Ausnahme der tetraploiden Faserzellen diploid, die Chromosomenzahl beträgt 12 (RUTHMANN & WENDEROTH, 1975; RUTHMANN et al., 1981).

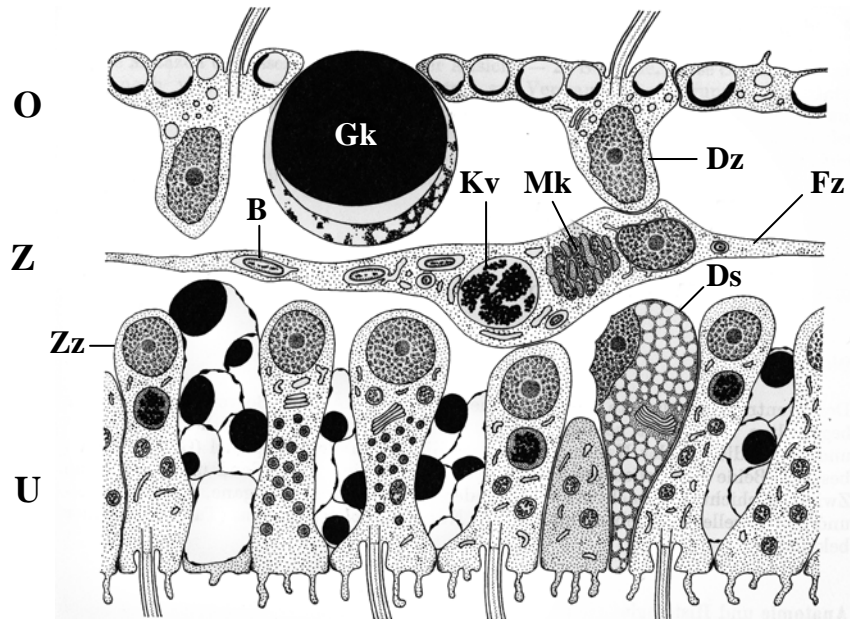


Abb. 2.12 Histologischer Aufbau von *Trichoplax adhaerens*. Abkürzungen betreffen: B= Bakterium in endoplasmatischer Zisterne; Dz= Deckzelle; Ds= Drüsenzelle; Fz= Faserzelle; Gk= Glanzkugel; Kv= Konkrementvakuole; Mk= Mitochondrienkomplex; O= oberes Epithel; U= unteres Epithel; Z= Zwischenepithel; Zz= Zylinderzelle. Modifiziert nach GRELL (1972).

Die gleitende Lokomotion von *Trichoplax adhaerens* auf dem Substrat beruht auf der Tätigkeit der begeißelten Zylinderzellen des unteren Epithels (SCHULZE 1891; GRELL & BENWITZ, 1971). Entsprechend dem Fehlen einer Polarität erfolgt die Bewegung ungerichtet. Die Formveränderungen, die vielfach mit der Gleitbewegung gekoppelt sind, gehen von den kontraktile, mikrotubulin- und aktinfilamenthaltigen Faserzellen aus (GRELL, 1974; BEHRENDT & RUTHMANN, 1986; RUTHMANN et al., 1986; THIEMANN & RUTHMANN, 1989).

Die Fortpflanzungsbiologie von *Trichoplax adhaerens* ist primär durch eine vegetative Zweiteilung oder Knospung charakterisiert. Aus der von SCHULZE (1891) erstmals detailliert beschriebenen, vegetativen Zweiteilung gehen gleichgroße Tochterindividuen hervor, die einen genetisch identischen Klon des Elters darstellen (vgl. Abb. 2.13). Bei der Knospung entstehen, ebenfalls auf vegetativem Wege, durch Abschnürung sphärische Schwärmer, die wesentlich

kleiner sind, als das Muttertier (GRELL & BENWITZ, 1971; THIEMANN & RUTHMANN, 1988, 1990). Beide Fortpflanzungsmodi werden niemals gleichzeitig von einem Tier verwirklicht (GRELL & BENWITZ, 1971). Es ist nicht klar, ob beide beschriebenen Formen der vegetativen Vermehrung auch im Freiland auftreten (GRELL & RUTHMANN, 1991; THIEMANN & RUTHMANN, 1991).

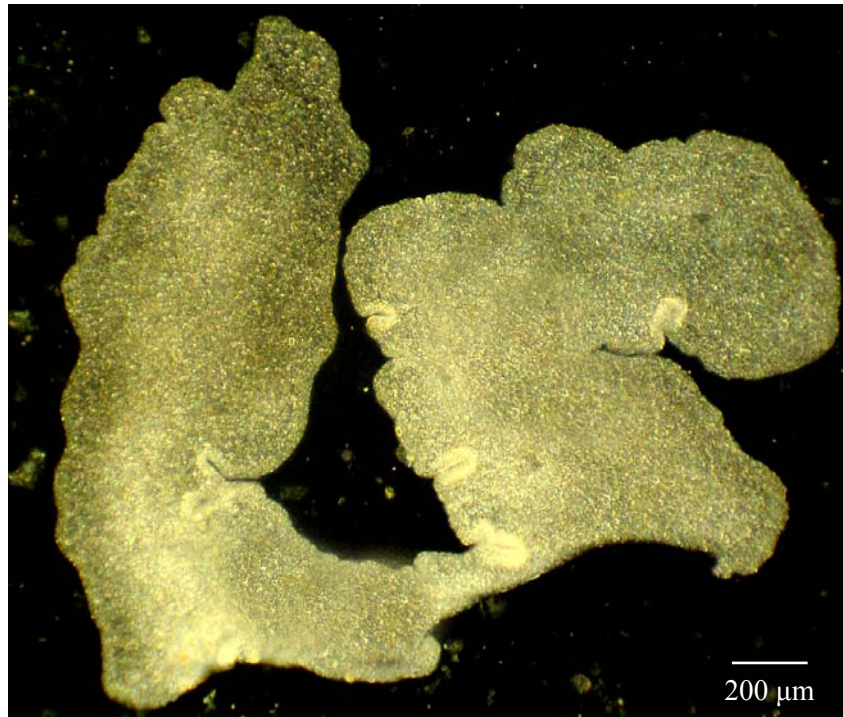


Abb. 2.13 *Trichoplax adhaerens* im Zuge einer vegetativen Zweiteilung (Aufsicht bei 50-facher Vergrößerung).

Die geschlechtliche Fortpflanzung von *Trichoplax adhaerens* ist nur lückenhaft bekannt und in lediglich drei Arbeiten beschrieben (GRELL, 1972; GRELL & BENWITZ, 1974b; GRELL & BENWITZ, 1981). Vermischt man zwei Klone miteinander, wachsen zu Beginn der degenerativen Phase in einigen Tieren Oocyten heran, welche die übrigen Zellen an Größe übertreffen (GRELL, 1974). Diese gehen aus sich transformierenden Zellen des morphologisch unteren Epithels hervor, wachsen dann aber in der Zwischenschicht heran. Dabei werden sie von Faserzellen umgeben, welche die Funktion von Nährzellen (Trophocyten) übernehmen. Die anschließende Furchung verläuft total-äqual (GRELL, 1974; GRELL & BENWITZ, 1981).

2.1.1.2 TIERMATERIAL UND KULTIVIERUNG

Die in den Studien verwendeten Tiere entstammen langjährigen Kulturen von Herrn Prof. Dr. Bernd SCHIERWATER. Die geographische Herkunft der in den Versuchen examinierten Klone betreffen die Gebiete des Indopazifik bei Indonesien (Klon INDO) und des Golfs von Akaba (Rotes Meer, Klon GRELL).

Trichoplax adhaerens wurde unter konstanten und definierten Bedingungen kultiviert, die Hälterungsbedingungen gemäß den Beschreibungen von GRELL & BENWITZ, (1971) vorgenommen. In Abänderung wurde sterilisiertes, künstliches Seewasser (Salinität 37-40‰) benutzt. Als Futter erwies sich der Cryptophyt *Pyrenomonas* als geeignet, da sich die Zellen nach wenigen Minuten auf dem Boden der Zuchtgefäße absetzen und einen dichten Rasen bilden. Wenn eine bestimmte Populationsdichte erreicht war, wurden die Tiere umgesetzt, da sonst alle Individuen schnell degenerieren. Das Wasservolumen in den einzelnen Zuchtschalen betrug ca. 100 ml. Die Kultivierung erfolgte bei konstant 20 °C (Temperaturkonstanz ± 2 °C).

2.1.2 *ELEUTHERIA DICHOTOMA*

“In der ersten Hälfte des Mai 1885 machte mich der Conservator der zoologischen Station in Neapel Herr Salvatore Lobianco auf ein kleines sechsstrahlig-sternförmiges Geschöpf aufmerksam, welches auf Ulven lebte und sich bei näherer Prüfung als *Eleutheria*, die interessante kriechende Cladonemide, erwies, deren Ammengeneration von Hincks als *Clavatella prolifera* beschrieben worden ist.“

C. HARTLAUB, 1886

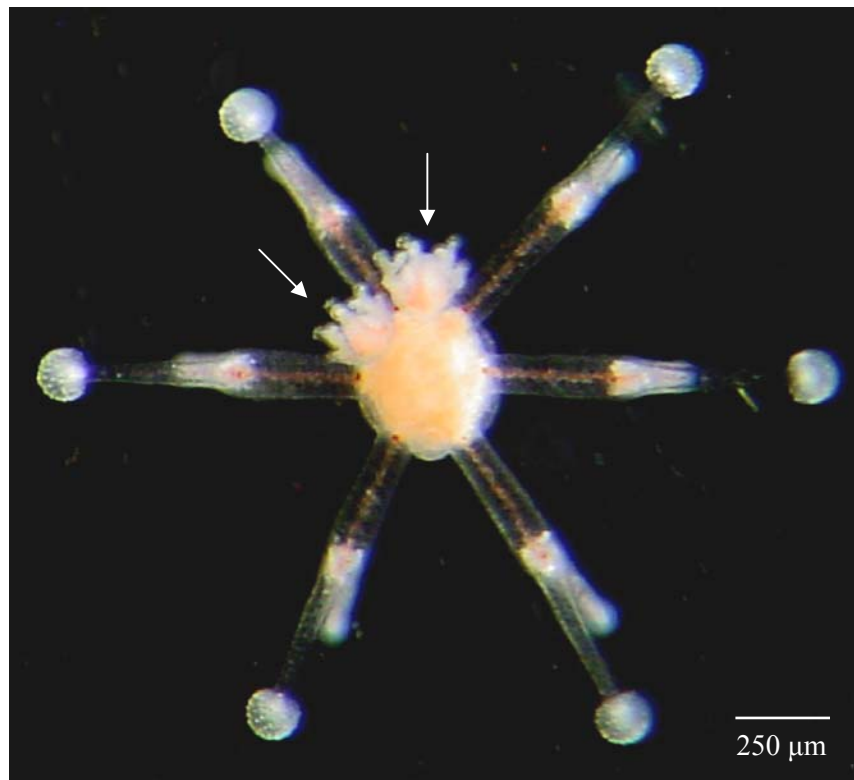


Abb. 2.14 Vegetative Meduse des Hydrozoons *Eleutheria dichotoma* mit zwei Tochtermedusen (siehe Pfeilmarkierungen, Aboral-Ansicht bei 50-facher Vergrößerung).

Das Untersuchungsobjekt, das athekate Hydrozoon *Eleutheria dichotoma* (Hydrozoa, Athecata, Cladonematidae) ist im marinen Eulitoral beheimatet und im seichten Küstenwasser sowie in Brandungszonen der Küste anzutreffen. Dort haftet es bevorzugt auf Thalli der einjährigen Grünalge *Ulva lactuca* in einer Wassertiefe bis zu 2 m. Erstmals beschrieben wurde die bis 3 mm große Hydromeduse 1842 von A. QUATREFAGES auf der französischen Insel Chausey (Atlantik). Den Polypen der Art entdeckte 19 Jahre später T. HINCKS (1861) an der englischen Küste bei Torquay und beschrieb ihn unter dem Namen *Clavatella prolifera* (HARTLAUB, 1886; RUSSEL, 1953). Die heute gültige taxonomische Bezeichnung *Eleutheria dichotoma* geht wieder auf QUATREFAGES zurück.

2.1.2.1 MORPHOLOGIE UND LEBENSZYKLUS

Als diploblastischer Organismus ist *Eleutheria dichotoma* durch einen phylogenetisch vergleichsweise einfachen und ursprünglichen Eumetazoenbauplan charakterisiert. Der Körper ist entlang einer Hauptachse polar und radiärsymmetrisch orientiert. Diese Hauptachse wird während der gesamten Embryonalentwicklung vom Ei über das Planulastadium bis hin zum ausdifferenzierten Hydropolypen beibehalten. Der Urmund wird zur Mundöffnung, der Urdarm zum Gastrocoel. Die Mundöffnung entspricht folglich dem vegetativen (oralen), die davon abgewandte Seite dem animalen (aboralen) Pol des Tieres.

Der Grundbauplan ist, wie bei allen Cnidariern, durch eine primäre Radialsymmetrie des Körpers gekennzeichnet. Die Morphologie resultiert aus einer Entwicklung aus lediglich zwei Keimblättern. Das Außenepithel, die Epidermis und die innere Schicht, die Gastrodermis, entstehen ontogenetisch aus dem Ektoderm bzw. Entoderm, ein Mesoderm fehlt. Dazwischen erstreckt sich eine primäre, azelluläre Stützmatrix aus Proteinen und Mucopolysacchariden, die Mesogloea. In der Medusengeneration ist diese häufig am Apikalpol durch Wassereinlagerung zu einer fibrillären Gallerte erweitert. Bei Eleutheriiden ist jedoch aufgrund der hemisessilen Lebensweise diese Schirmgallerte (Mesogloea) stark reduziert. Auch das Velum, eine ektodermale Hautfalte, welche die Öffnung des subumbrellaren Raumes der Hydrozoen umsäumt, ist bei *E. dichotoma* stark zurückgebildet. Trotzdem vermag es die Meduse ein vorübergehendes Austrocknen des Habitats zu überdauern, indem sie mit Subumbrella und Velum einen temporären Wasserspeicher bildet (KRUMBACH, 1907). Dem Schirmrand der adulten Meduse entspringen in der Regel sechs dichotome, in Wehr- und Haftast gegabelte, Tentakel, bisweilen kann die Tentakelzahl stark variieren (HAUENSCHILD, 1956, 1957a, b). Die Wehrtentakel dienen primär dem Fang zooplanktonischer Beute, die Schreittentakel besitzen an ihrer Basis eine Haftscheibe aus Klebzellen, was eine temporäre und reversible Anhaftung an das Substrat erlaubt (KRUMBACH, 1907; LENGERICH, 1923; HAUENSCHILD, 1957b; SCHIERWATER & TRAGER, 1987; HADRYIS et al., 1990). An der Schirmunterseite (Subumbrella) befindet sich das ausstülpbare Manubrium mit der terminalen Mundöffnung, welche den Gastralraum nach außen öffnet. Der Gastralraum ermöglicht die extrazelluläre Verdauung relativ großer Beutestücke, außerdem dient er der Verteilung der Nährstoffe und Abbauprodukte im Tier und übernimmt damit die Aufgabe eines Gastrovaskularsystems. Die Verdauung beginnt mit einer extrazellulären, enzymatischen Aufspaltung der Nahrung im Gastralraum; sind die Nahrungspartikel klein genug, werden sie durch Phagozytose in die mit Vakuolen versehenen Verdauungszellen aufgenommen (SCHIERWATER et al., 1992).

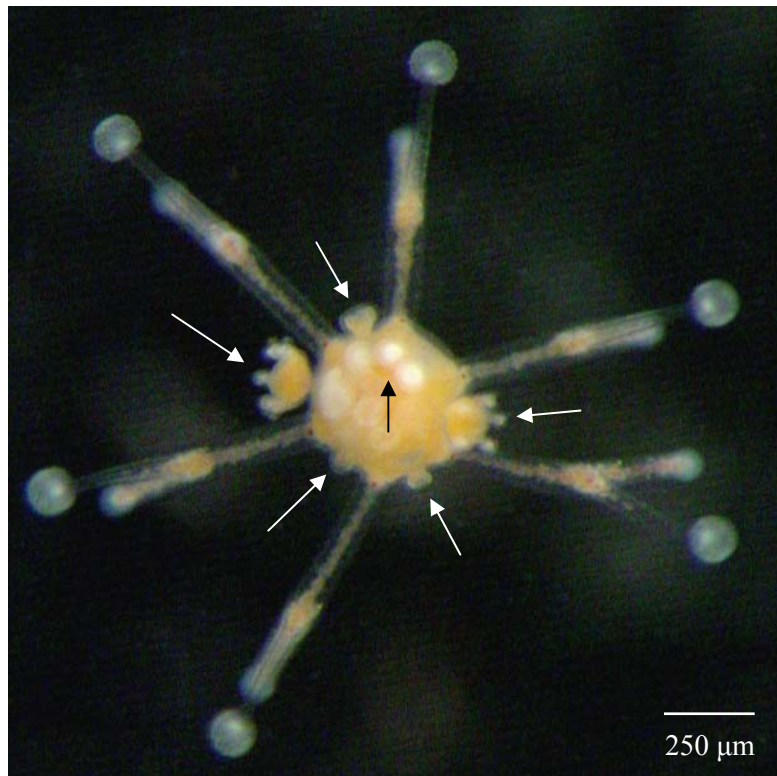


Abb. 2.15 Simultan sexuell-vegetative Meduse des Hydrozoons *Eleutheria dichotoma* mit fünf Tochtermedusen-Knospen (siehe weiße Pfeilmarkierungen) und mit Larven im apikalen, aboralen Brutraum (siehe schwarze Pfeilmarkierung; Aboral-Ansicht bei 50-facher Vergrößerung).

Die Fortpflanzungsbiologie von *Eleutheria dichotoma* ist durch einen zweigliedrigen, metagenetischen Lebenszyklus charakterisiert, wobei auf Medusenebene ein drittes fakultatives Element im Lebenszyklus der Medusengeneration hinzukommt, die sich vegetativ fortopflanzen vermag (HAUENSCHILD, 1956; SCHIERWATER, 1995; vgl. Abb. 2.14, Abb. 2.15 & Abb. 2.17). Die vegetative Polypengeneration bringt über laterale Knospung an der Basis des Hydrocaulus (Scapus) Primärmedusen hervor (SCHIERWATER & HAUENSCHILD, 1990; vgl. Abb. 2.16 & Abb. 2.17). Die Entwicklung von der Anlage der Knospe bis zum Ablösen der Meduse dauert etwa sieben Tage (HAUENSCHILD, 1956). Die Primärmedusen erzeugen ihrerseits auf vegetativem Wege, durch exumbrellare Knospung im interradianalen Bereich des Ringkanals, Sekundärmedusen (vgl. Abb. 2.14 & Abb. 2.15). Alle vegetativ entstandenen Primär- und Sekundärmedusen stellen einen genetisch identischen Klon des Elters dar (HAUENSCHILD, 1956; SCHIERWATER, 1989a, b; SCHIERWATER, 1995).

Die Sekundärmedusen sind, im Gegensatz zu gonochoristischen Arten, simultane Hermaphroditen, die in der Lage sind, auf bisexuellem Weg sowohl Oocyten als auch Spermatozoen zu bilden und durch Selbstbefruchtung Nachkommen hervorzubringen (WILLIAMS, 1975; SCHIERWATER & HADRYIS, 1998; vgl. Abb. 2.17).

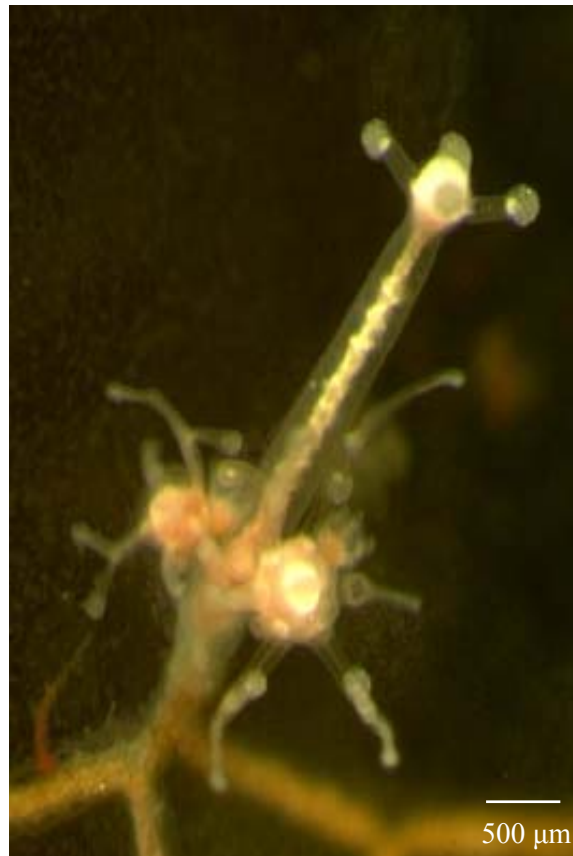


Abb. 2.16 Polyp von *Eleutheria dichotoma* mit zwei Primärmedusen an der Basis des Hydrocaulus (Lateral-Ansicht bei 20-facher Vergrößerung).

Die Befruchtung, Furchung (total-äqual) und Entwicklung zur Planularlarve vollzieht sich im apikalen Brutraum des Elters (LENGERICH, 1923). Der Brutraum ist ektodermalen Ursprungs und wird von einem Epithel zwischen Exumbrella und Magendach ummantelt (HAUENSCHILD, 1956; HAUENSCHILD, 1957a, b). Die Gameten entwickeln sich aus interstitiellen Zellen (I-Zellen), wobei die Oocyten oral im gastralen Gewebe und die Spermatozoen aboral im umbrellaren Bereich des Brutraumes lokalisiert sind (LENGERICH, 1923; HAUENSCHILD, 1956). Auf der morphogenetischen Plastizität der interstitiellen Zellen beruht außerdem die ausgeprägte Fähigkeit zur Regeneration, welche Verletzungen durch schnelle Heilung und den Verlust ganzer Körperteile durch Neubildung auszugleichen vermag. Zwei Formen von Regeneration können hierbei unterschieden werden: Die reparative Regeneration folgt nach Verlust von Körper- oder Organteilen, eine physiologische Regeneration vollzieht sich bei stetigem Verbrauch und Ersatz von Zellen zur Erhaltung der sich in einem Fließgleichgewicht befindlichen Körperorganisation (HAUENSCHILD, 1957b).

Die pelagischen Planularlarven verlassen den Brutraum durch eine subumbrellare Öffnung, setzen sich binnen kurzer Zeit mit dem animalen Pol auf dem Substrat fest und metamorphosieren direkt in einen Primärpolypen (LENGERICH, 1923).

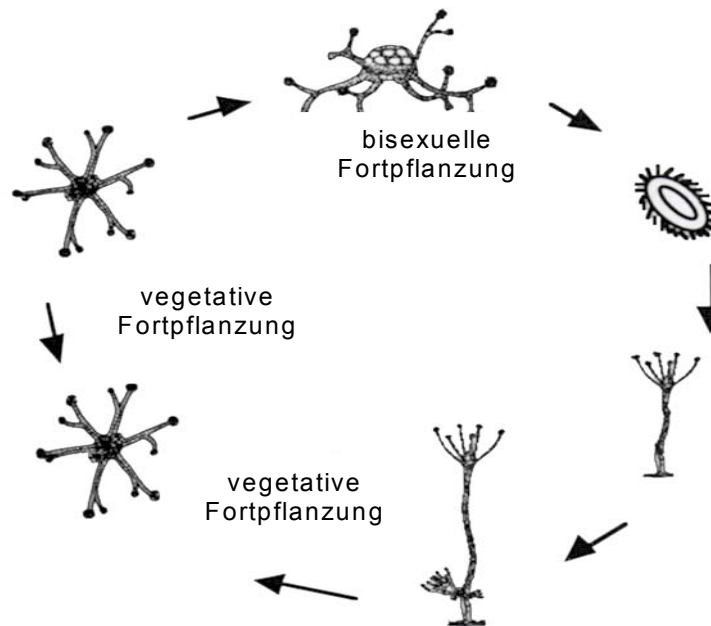


Abb. 2.17 Metagenetischer Lebenszyklus von *Eleutheria dichotoma* (modifiziert nach ENDER, 1997).

Äußere Faktoren nehmen unmittelbar Einfluss auf den Fortpflanzungsmodus der *Eleutheria*-Medusen. So fand SCHIERWATER (1989a), dass ein Erhöhen der Temperatur eine Zunahme der Anzahl sich sexuell fortpflanzender Medusen zur Folge hat, dagegen erhöht ein gesteigertes Nahrungsangebot den Prozentsatz an vegetativen Individuen (s.a. HADRYs et al., 1990; SCHIERWATER & HADRYs, 1998).

2.1.2.2 TIERMATERIAL UND KULTIVIERUNG

Die in den einzelnen Versuchen verwendeten Polypen, Medusen und Larvenstadien von *Eleutheria dichotoma* entstammen langjährigen Kulturen von Herrn Prof. Dr. Bernd SCHIERWATER (SCHIERWATER, 1989a). Der überwiegende Anteil der Klone wurde im westlichen Mittelmeerraum, an der Küste um Banyuls-sur-Mer (Frankreich) und an der Costa Brava bei la Fosca (Spanien) gesammelt.

Die Tiere wurden unter konstant definierten Bedingungen kultiviert, die Hälterungsbedingungen für *Eleutheria dichotoma* gemäß den Beschreibungen von HAUENSCHILD (1956) vorgenommen. In Abänderung wurde sterilisiertes, künstliches Seewasser (Salinität 35-37‰) benutzt, zur Fütterung wurden zweimal wöchentlich 3-5 Tage alte Naupliuslarven der Spezies *Artemia salina* gereicht. Nach Futterzugabe wurde jeweils nach 6 Stunden und abermals nach weiteren 18 Stunden das Seewasser erneuert. Das Wasservolumen in den einzelnen Boverischalen betrug 100 ml. Die Kultivierung erfolgte bei konstant 20 °C (Temperaturkonstanz ± 2 °C).

2.2. TIERBEOBACHTUNG

Die Lebendbeobachtungen der Tiere wurden durch ein Binokular (Zeiss STEMI SV 6) mit variabler 8 bis 50-facher Vergrößerung durchgeführt. Die phänotypischen Veränderungen der Untersuchungsobjekte wurden schriftlich protokolliert und mittels einer Digitalkamera (Sony DSC-P1) photographisch dokumentiert. Die mikroskopische Analyse erfolgte mit einem Fluoreszenzmikroskop der Marke Zeiss (Axiovert 200 M) mit variabler 50-, 100-, 200-, 400-, oder 1000-facher Vergrößerung und wurde ebenfalls mittels einer Digitalkamera (Axio Cam MRn, Zeiss) festgehalten.

Die digitale Bearbeitung und Auswertung der Aufnahmen wurde mit Hilfe des Computerprogrammes Adobe Photoshop 7.0 an einem Macintosh G4MT/733 bzw. an einem Sony Vaio PCG-GRV 616 S Notebook vorgenommen.

2.3 GENINHIBITION MITTELS RNA-INTERFERENZ (RNAi)

Der Begriff RNA-Interferenz (RNAi) beschreibt ein natürliches Phänomen der posttranskriptionalen Regulation der Genexpression. Auslösende Agenzien sind doppelsträngige RNAs (dsRNA), die eine sequenzspezifische Abschaltung der Genexpression induzieren. Der grundlegende Vorgang der RNA-Interferenz wurde ursprünglich in Pflanzen als sogenanntes *post transcriptional gene silencing* (PTGS) beschrieben (AL-KAFF et al., 1998), jedoch gelang der experimentelle "Knock-Down" der Genexpression erstmals im Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* (FIRE et al., 1998; MONTGOMERY & FIRE, 1998; MONTGOMERY et al., 1998). Die Autoren prägten den Ausdruck "RNA Interferenz" (RNAi) für diese Methode der Geninhibition. Im Gegensatz zum "Knock-Out" durch Genunterbrechung wird die Repression durch RNAi als "Knock-Down" bezeichnet. Die Inhibition wurde dabei mittels phänotypischer Faktoren sowie durch quantitative Messungen der mRNA-Mengen (RT-PCR; vgl. Kap. 2.3.5) nachgewiesen. Die für die Inhibition benutzten Mengen an dsRNA waren bei weitem niedriger als die, die für eine Antisense-Hemmung erforderlich gewesen wären (vgl. Kap. 2.4; KUMAR & CARMICHAEL, 1998; BOSHER et al., 1999; HUNTER, 1999). Des Weiteren erwies sich die dsRNA als wesentlich wirksamer als die entsprechenden Einzelstränge. Inzwischen wurden auch komparable Nachweise für *Neurospora crassa* (*Ascomycetes*, COGONI & MACINO, 1999, 2000), *Trypanosoma* (NGÔ et al., 1998; LACOUNT et al., 2000), *Hydra* (LOHMANN et al., 1999), *Planaria* (SÁNCHEZ ALVARADO & NEWMARK, 1999) *Mus musculus* (WIANNY & ZERNICKA-GOETZ, 2000) und den Zebrafisch *Danio rerio* (WARGELIUS et al., 1999; LI et al., 2000; OATES et al., 2000; ZHAO et al., 2001) erbracht. Bei *Drosophila* und *C. elegans* konnte nachgewiesen werden, dass durch die Hemmung der Expression spezifischer Gene durch dsRNA die kodierten Proteine nicht oder in stark reduziertem Maße synthetisiert werden (MISQUITTA & PATERSON, 1999; KETTING & PLASTERK, 2000; SMARDON et al., 2000). Dadurch kommt es zu einem erheblichen bis völligen Ausfall der durch diese Proteine vermittelten Zellfunktionen, vergleichbar mit *Knock-Out*-Phänotypen. Die Studien an *Drosophila*-Embryos zeigten, dass die höchste Aktivität der dsRNA-Fragmente bei einer Länge von 700-800bp zu erwarten ist (KENNERDELL, R.C.J., pers. Mittlg.; KENNERDELL & CARTHEW, 1998; TUSCHL et al., 1999).

2.3.1 MECHANISMUS DER RNAi-EXPRESSIONSINHIBITION

Bei der Suche nach Komponenten der RNA-Interferenz entdeckte man durch die Analyse der RNAi defizitärer Mutanten, u. a. Helikasen (DALMAY et al., 2001), RNaseIII Homologe (BERNSTEIN et al., 2001) und die RNA-abhängige RNA-Polymerase RdRP (SIJEN et al., 2001; MARTENS et al., 2002; SIJEN & PLASTERK, 2003).

Ein weiterer unerwarteter Befund war das Auffinden der eingeführten dsRNAs und der degenerierten Ziel-mRNAs in Form von 20-23bp langen Fragmenten, die als siRNAs (*small interfering RNAs*) bezeichnet werden (ZAMORE et al., 2000; ELBASHIR et al., 2001a, b; COUZIN, 2002). Der Ursprung dieser siRNAs zeigte sich in *Drosophila*. Der Proteinkomplex *Dicer*, der ein RNase Homolog fusioniert mit einer Helikase-Domäne enthält, zerschneidet *in vitro* doppelsträngige RNA in 20-23bp lange Nukleomere (HUNTER, 2000; BERNSTEIN et al., 2001; MARTENS & NELLEN, 2002). Die Funktion der siRNAs im RNAi-Mechanismus wurde aber erst durch die Entdeckung von RISC (*RNA Induced Silencing Complex*) verstanden. RISC ist ein Proteinkomplex, der ein 20-23bp langes Nukleomer als RNA-Komponente enthält. Der Komplex hat Einzelstrang-RNase-Aktivität und erhält seine Spezifität durch die siRNA. RISC findet seine Ziel-mRNA spezifisch durch den Antisense-Strang der an der Komplexaußenseite präsentierten siRNA, bindet und degradiert dann die mRNA (HAMMOND et al., 2000; MARTENS & NELLEN, 2002; vgl. Abb. 2.31).

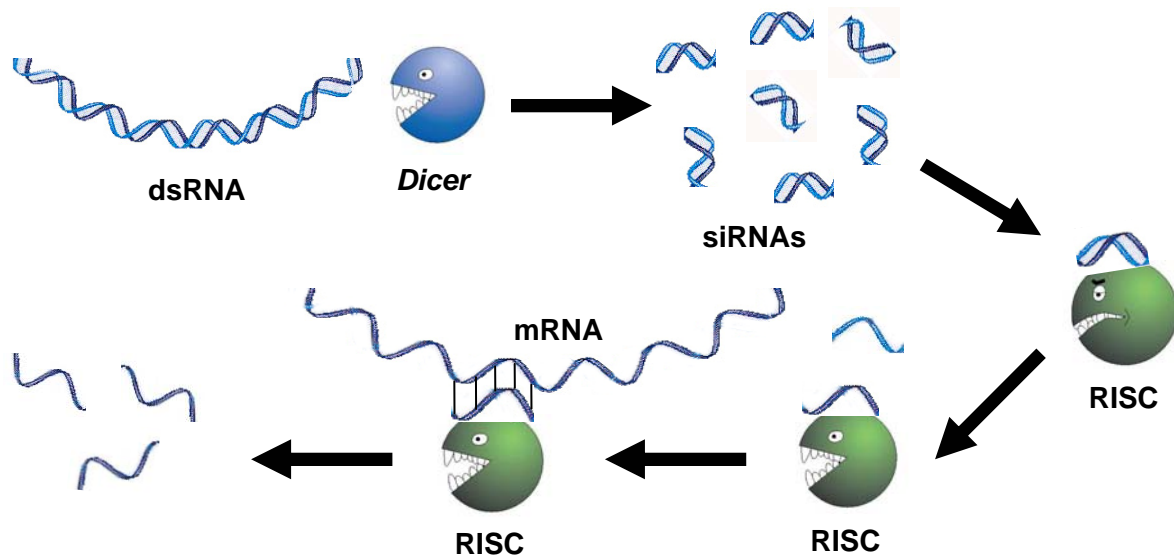


Abb. 2.31 Modell zur RNA-Interferenz (RNAi): Doppelsträngige RNA wird von *Dicer* (ein Homolog der dsRNA-spezifischen RNaseIII) in siRNAs zerlegt, diese werden von RISC (*RNA Induced Silencing Complex* mit ssRNase-Aktivität) gebunden und der Antisense-Strang spezifiziert RISC zur Degradation der Ziel-mRNA.

Doppelsträngige RNA-Fragmente ohne Zielgen (Ziel-mRNA) führen nicht zur Produktion detektierbarer siRNAs, sodass die siRNAs nicht ausschließlich direkte Produkte der eingeschleusten dsRNA sein können (MARTENS et al., 2002). Tatsächlich kann der Antisense-Strang der siRNAs als *Primer* für RdRP dienen und damit an der mRNA die Synthese weiterer dsRNA initiieren (LIPARDI et al., 2001). Wenn der resultierende, von RdRP synthetisierte Doppelstrang wiederum ein Ziel für *Dicer* darstellt, führt das zu einer mRNA Degradation, die RISC nicht benötigt (MARTENS & NELLEN, 2002). Gleichzeitig führt dieser Mechanismus zu einer Ziel-mRNA abhängigen Amplifikation der siRNAs (vgl. Abb. 2.32).

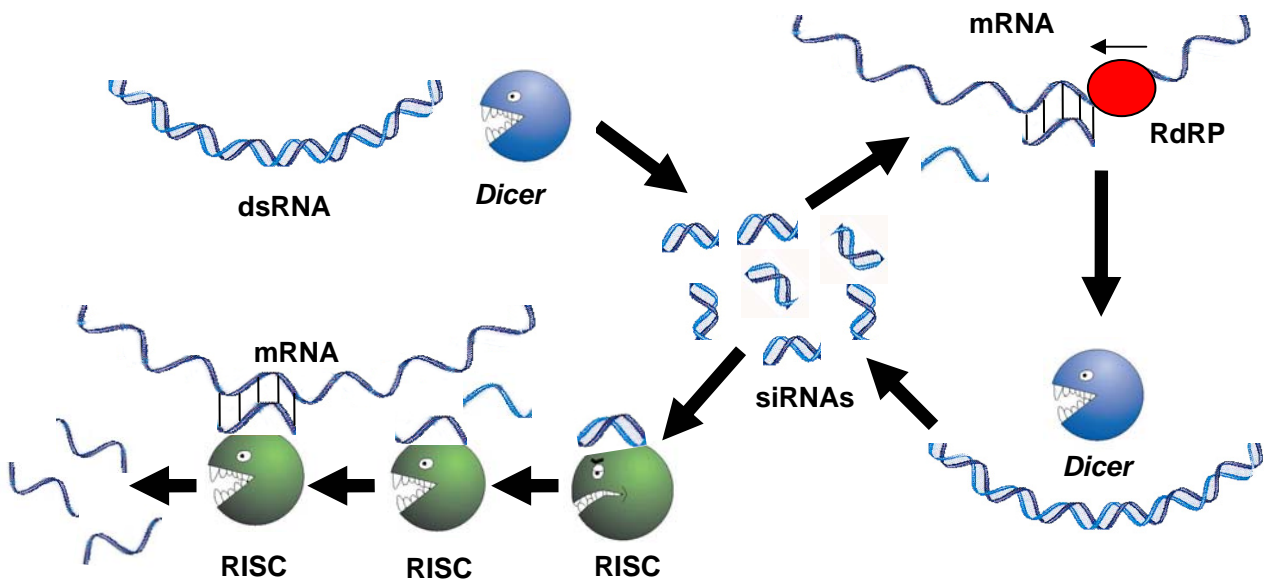


Abb. 2.32 Die Einzelstrang-siRNAs dienen der RNA-abhängigen RNA-Polymerase RdRP als *Primer*, sodass mit der mRNA als Matrize ein neuer Doppelstrang gebildet wird. Weil dieser Doppelstrang wieder als Substrat für *Dicer* dienen kann, ist die mRNA Degradeation durch RISC theoretisch nicht erforderlich.

Die experimentelle Anwendung der RNA-Interferenz bei Säugern erschien zunächst nicht möglich, weil lange doppelsträngige RNA-Moleküle eine durch Interferone vermittelte generelle Abschaltung der Proteinbiosynthese auslösen und die betroffenen Zellen durch Apoptose absterben (VATTEM et al., 2001). Mit exakt 21bp langen siRNAs kann dieser Weg umgangen und ein genspezifischer *Knock-Down* erreicht werden (ELBASHIR et al., 2001a, b; KAPADIA et al., 2003; KONG et al., 2004; PHIPPS et al., 2004).

2.3.2 SYNTHESE DER dsRNA

Als DNA-Templat für die dsRNA-Synthese dienten cDNA-Klone des *Cnox-1*-Gens (401bp), des *Cnox-2*-Gens (426bp), des *Cnox-3*-Gens (241bp), des *Cnox-4*-Gens (199bp), des *Cnox-5*-Gens (219bp) und des *Trox-2*-Gens (384bp). Die Längenangaben der Genfragmente betreffen nur die *Insert*-Größen ohne die Sp6/T7-Vektorflanken (161bp). Es wurde mit Hilfe der Standardprimer T7 und Sp6 vom pGEM[®]-T-Vektor (Promega) via PCR (**P**olymerase **C**hain **R**eaction, SAIKI et al., 1985, 1988) amplifiziert. Im Anschluss an die Synthese der dsRNA wurden die verbliebenen DNA-Matrizen der einzelnen Ansätze mittels DNase-Behandlung verdaut. Nach Präzipitation, Abzentrifugation und Resuspendierung der einzelsträngigen RNAs (ssRNA) wurden die synthetisierten Sense- und Antisense-RNA-Fragmente zur Hybridisierung zusammengeführt.

Amplifikation des DNA-Templats: Die PCR ist eine *in vitro*-Technik zur zyklischen Amplifizierung von Nukleinsäure-Bereichen definierter Länge und Sequenz. Die Standard-PCR-Reaktionen zur Reamplifikation der DNA aus den im pGEM[®]-T-Vektor liegenden cDNA-Klone wurden in einem Volumen von 25 µl im PTC-200 (Peltier Thermal Cycler MJ Research) durchgeführt. Die Reaktionen enthielten 2.5 µl 10x Amplifikations-Puffer (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1.5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 0.1 mg/ml Gelatine; Eurogentec), 1.5 mM MgCl₂, 5 pmol von jedem *Primer* (T7 bzw. Sp6), 0.2 mM dNTPs (ATP, CTP, GTP, TTP, pH 7.5; Roche), 0.5 U Taq-DNA-Polymerase (Goldstar, Eurogentec) und 1 µl DNA-Templat (80-100 ng/µl im pGEM[®]-T-Vektor). Die PCR-Reaktionen erfolgten bei 3 min/94°C Vordenaturierung, 35 Zyklen jeweils 30 s/95°C Denaturierung, 30 s/53°C Hybridisierung, 60 s/72°C Polymerisierung und 6 min/72°C Elongation.

Agarose-Gelelektrophorese zum Nachweis des DNA-Templats: Die Gelelektrophorese ist eine Methode zur Auftrennung von Nukleinsäure- und Proteingemischen. Bei der Wanderung durch ein Gel unter dem Einfluss eines elektrischen Feldes bewirken die unterschiedliche Größe und Ladung der Moleküle eine differente Wanderungsgeschwindigkeit innerhalb des Gels. Die Auftrennung der Amplifikationsprodukte erfolgte bei 100 V in horizontalen 1.0%igen Agaroseflachbettgelen (Agarose NEEO, Roth) für 45 min in TBE-Laufpuffer (10 mM Tris-HCl, 100 mM Borsäure, 2 mM EDTA). Um eine Detektion nach der Elektrophorese unter UV-Licht durchführen zu können, wurde das Gel einer Ethidiumbromidfärbung (0.3 µg/ml) unterzogen. Abschließend wurde die elektrophoretisch separierte DNA unter UV-Licht (312 nm) detektiert und photographisch dokumentiert (Universal Hood - S.N. 75S, BIO RAD; vgl. Abb. 2.33). Als DNA-Längenstandard diente ein 100bp *ladder* (Gibco BRL). Die Aufreinigung des PCR-Produkts wurde nach einem Standard-Protokoll durchgeführt (SAMBROCK et al., 1989).

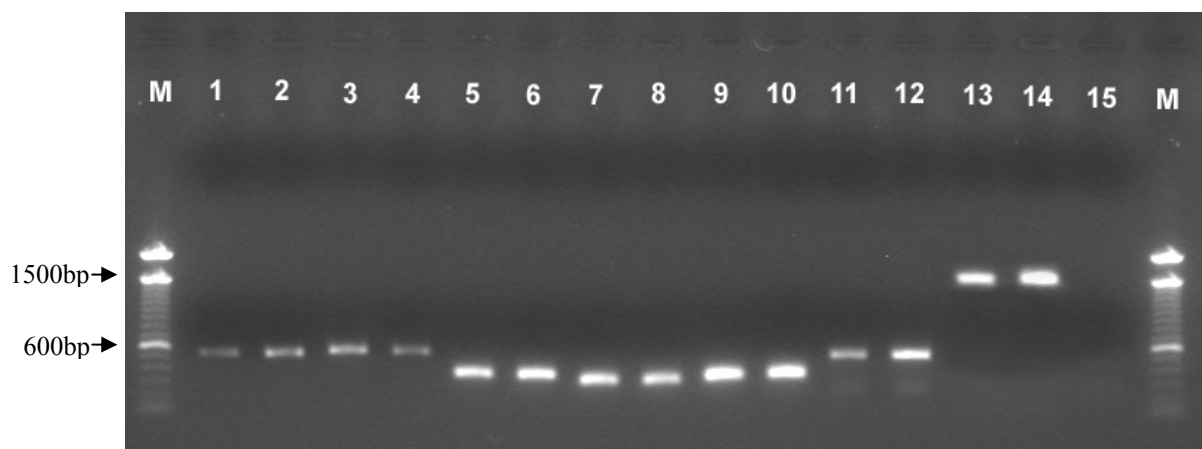


Abb. 2.33 Reamplifikationsprodukte von *Cnox-1* (562bp, Spur 1&2), *Cnox-2* (587bp, Spur 3&4), *Cnox-3* (402bp, Spur 5&6), *Cnox-4* (360bp, Spur 7&8), *Cnox-5* (380bp, Spur 9&10), *Trox-2* (545bp, Spur 11&12) und *Trichoplax*-β-Aktin (1546bp, Spur 13&14). Spur 15 = Negativkontrolle, Spur M = 100bp-Standardlängen-Marker.

T7- und Sp6-Einzelstrang-RNA-Synthese: Die Einzelstrang-RNA-Synthesen der jeweiligen Gene wurden in einem Gesamtvolumen von 20 μ l durchgeführt und enthielten jeweils 4 μ l (ca. 250 ng) DNA-Templat, 2 μ l 10x Transkriptionspuffer (0.4 mM Tris-HCl pH 8.0, 60 mM MgCl₂, 100 mM DTT, 20 mM Spermidin), 1 μ l RNase-Inhibitor (40 U/ μ l), 2 μ l RNA-Polymerase (T7 bzw. Sp6, 20 U/ μ l), 2 μ l 10x dNTPs (10 mM ATP, 10 mM CTP, 10 mM GTP, 6.5 mM UTP, 3.5 mM Fluoreszein-12-UTP, pH 7.5; Roche) und 9 μ l ddH₂O. Die Ansätze wurden für drei Stunden bei 37°C inkubiert.

DNase-Behandlung: Zur Eliminierung der DNA wurden zu den einzelnen RNA-Syntheseansätzen jeweils 1 μ l DNase I RNase-free (10 U/ μ l) pipettiert und die Ansätze für 30 min bei 37°C inkubiert. Der DNA-Restriktionsverdau wurde durch Zugabe von 100 μ l 200 mM EDTA (pH 8.0) beendet.

Präzipitation der RNA-Einzelstränge: Im Anschluss an den DNA-Verdau wurde durch Zugabe von 10 μ l 4 M LiCl und 300 μ l Ethanol (98%) zu den einzelnen Ansätzen eine Präzipitation der RNA-Einzelstrang-Fragmente (30 min, bei -80°C) herbeigeführt. Nach zweimaligem Abzentrifugieren (30 min, 13000 rpm, bei 4°C) und Waschen mit 70% Ethanol wurde das Pellet bei 45°C vakuumgetrocknet und in 20 μ l ddH₂O (steril und RNase frei) und in 1 μ l RNase-Inhibitor resuspendiert.

Hybridisierung der RNA-Einzelstränge: Um die Hybridisierung der Sense- und Antisense-RNA-Einzelstränge herbeizuführen und ein Ausbilden der spezifischen Sekundärstrukturen zu gewährleisten, wurden die kombinierten RNA-Fractionen in 750 mM NaCl und 75 mM Natriumcitrat für 15 min bei 65°C inkubiert. Bis zur Transfektion wurden die einzelnen Produkte bei -80°C gelagert.

Agarose-Gelelektrophorese zum Nachweis der dsRNA: Die Gelelektrophorese zum Nachweis der dsRNAs wurde gemäß den zuvor beschriebenen Angaben durchgeführt. Abweichungen davon betreffen eine Erhöhung der Spannung auf 110 V und die Verkürzung der Auftrennungsdauer auf 25 min. Die Menge der aus dem Gel eluierten dsRNA wurde via Vergleich zu Lambda-DNA bekannter Konzentration abgeschätzt (vgl. Abb.2.34).

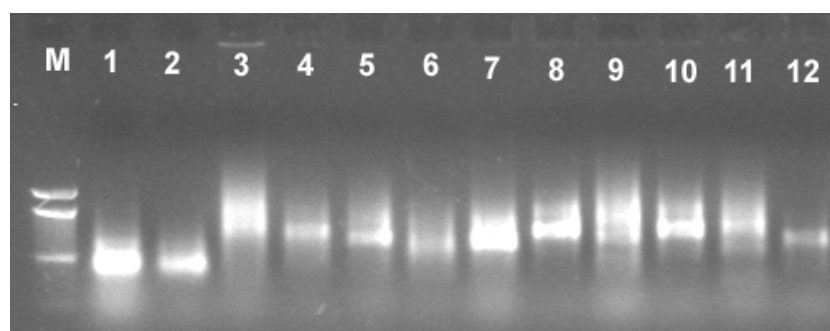


Abb. 2.34 Doppelsträngige RNAs, jeweils 2 Reaktionsansätze von *Cnox-1* (Spur 1&2), *Cnox-2* (Spur 3&4), *Cnox-3* (Spur 5&6), *Cnox-4* (Spur 7&8), *Cnox-5* (Spur 9&10) und *Trox-2* (Spur 11&12). Spur M = 100bp-Standardlängen-Marker.

2.3.3 TRANSFEKTION DER dsRNA

Die Transfektion der dsRNA in die Zellen der Versuchstiere wurde mit Hilfe des FuGene™ 6 (Roche) Transfektions-Reagents durchgeführt. Zu einem vorgelegten Volumen von 50 µl Seewasser (Salinität 35‰) wurden 3 µl FuGene™ 6-Reagent pipettiert. Nach 15 min wurden dann 20 µl dsRNA (2 µg) hinzugegeben und die einzelnen Reaktionsansätze für 45 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die RNA wurde im Anschluss in einem Gesamtvolumen von 200 µl (10 µg/ml dsRNA) für 24 Stunden in die Tiere transfiziert. Der intrazelluläre Nachweis der Fluoreszein markierten dsRNA wurde nachfolgend unter dem Fluoreszenzmikroskop vollzogen (Anregung: 488 nm, Emission: 525 nm; vgl. Abb. 3.16 & Abb. 3.31). Abschließend wurden die Tiere in sterilisiertes, künstliches Seewasser (Salinität 40‰) überführt.

2.3.4 PRINZIP DER RNAi-STUDIE

Die in den Versuchen verwendeten Tiere (*T. adhaerens*; Hydromedusen von *E. dichotoma*) wurden direkt nach der Transfektion in einem Gesamtvolumen von jeweils 50 ml in Boveri-Schalen wie unter Kapitel 2.1.1.2 bzw. 2.1.2.2 beschrieben kultiviert. Jeder Versuchsansatz enthielt zu Beginn der Studie 10 Tiere. Die Dauer einer Versuchsreihe betrug für *Trichoplax adhaerens* 21 Tage und für die *Eleutheria*-Medusen 18 Wochen. Es wurde sichergestellt, dass keines der Versuchstiere zu Versuchsbeginn eine phänotypische Abnormalität, noch offensichtliche Anzeichen einer sexuellen und/oder vegetativen Vermehrung aufwies. Die Versuchstiere wurden täglich gezählt und einer genauen Untersuchung auf morphologische und entwicklungsbiologische Veränderungen unterzogen.

Es wurde für die Homöoboxgene *Cnox-1*, *Cnox-2*, *Cnox-3*, *Cnox-4* und *Cnox-5* (*E. dichotoma*) und für *Trox-2* (*T. adhaerens*) ein Gen-Knock-Down mittels dsRNA herbeigeführt. Pro Experimentalansatz wurde die Wirkung einer dsRNA untersucht, sodass der Gesamtumfang der Studie aus sechs Experimentalansätzen bestand (sechs Hox-Gene). Jeder dieser sechs Ansätze wurde viermal (*Trox-2*) bzw. dreimal (*Cnox-1* – *Cnox-5*) durchgeführt. Als erste Kontrolle fungierte in den *Cnox*-Versuchsreihen die dsRNA des *Trox-2*-Gens und in den *Trox-2*-Versuchsreihen die dsRNA des *Cnox-1*-Gens. Als zweite Kontrolle diente in beiden Versuchsreihen ein Meerwasser-Ansatz mit Tieren, bei denen keine Transfektion mit dsRNA vorgenommen wurde. Die Sequenzen der einzelnen dsRNAs sowie eine tabellarische Auflistung der Einzelergebnisse sind im Anhang aufgeführt (siehe Kap. 5.1 und Kap. 5.5).

Übersicht der experimentellen Versuchsansätze:

E. dichotoma

3 Versuchsreihen mit jeweils:

E₁: *Cnox-1*-dsRNA

E₂: *Cnox-2*-dsRNA

E₃: *Cnox-3*-dsRNA

E₄: *Cnox-4*-dsRNA

E₅: *Cnox-5*-dsRNA

K₁: *Trox-2*-dsRNA

K₂: *Con*-H₂O

T. adhaerens

4 Versuchsreihen mit jeweils:

E₁: *Trox-2*-dsRNA

K₁: *Cnox-1*-dsRNA

K₂: *Con*-H₂O

E= Experimentalansatz; K= Kontrollansatz

2.3.5 REVERSE TRANSKRIPTASE-PCR (RT-PCR)

Die Reverse Transkriptase-PCR diente im Rahmen der dsRNA-Geninhibitions-Studien dem Nachweis der Funktionalität des RNAi-Mechanismus. Die nach einem Standard-Protokoll durchgeführte Methode (GeneRacer™ Kit, Invitrogen; Li et al., 2000) wurde hierbei benutzt, um einen quantitativen Beleg der genspezifischen mRNA-Transkripte in den transfizierten Zellen zu erbringen. Es wurden die mRNAs von jeweils 30 bzw. 25 Tieren (*T. adhaerens* bzw. Medusen von *E. dichotoma*) zwei Tage nach der Transfektion isoliert. Im Anschluss an die Transkription der mRNA in copyDNA (cDNA) mit Hilfe der reversen Transkriptase wurde die 3'-RACE-PCR durchgeführt. Die PCR-Reaktionen erfolgten bei 6 min/94°C Vordenaturierung, 25 Zyklen (22 für *E. dichotoma*) jeweils 30 s/94°C Denaturierung, 30 s/56°C Hybridisierung, 60 s/72°C Polymerisierung und einer abschließenden Elongation von 10 min bei 72°C. Die *Primer*-Kombinationen der PCRs wurden so gewählt, dass die reamplifizierten Sequenzbereiche mindestens ein Intron überspannten, um ein Amplifizieren aus möglicher verbliebener gDNA in den Reaktionsgemischen anhand der Amplifikatsfragmentgrößen ausschließen zu können. Des Weiteren wurde die RT-PCR benutzt, um im Zuge der Expressionsstudien eine Einschätzung zu den Genexpressionsintensitäten, im Speziellen der *Cnox*-Gene untereinander, aber auch im Vergleich zu einem Referenz-Gen (β -Aktin), treffen zu können. Hierbei wurde von 25 unbehandelten *Eleutheria*-Medusen wie zuvor beschrieben RNA isoliert, diese gleichsam in cDNA transkribiert aus welcher nachfolgend via PCR mit genspezifischen *Primern* (*Cnox-1* – *Cnox-5* und *Eleutheria*- β -Aktin) amplifiziert wurde (vgl. Kap. 3.2.4.1).

2.4 GENINHIBITION DURCH (MORPHOLINO-) ANTISENSE-OLIGONUKLEOTIDE

Das Prinzip, wie durch ein synthetisches Oligonukleotid die Expression eines Gens spezifisch inhibiert werden kann, wurde erstmals von den amerikanischen Wissenschaftlern P.C. ZAMECZNIK und M.L. STEVENSON (1978) beschrieben. Sie synthetisierten ein 13 Nukleotide langes Antisense-Oligodesoxyribonukleotid, dessen Sequenz komplementär zu mRNA-Bereichen des *Rous-Sarkom-Virus* war. Durch Zugabe dieses Oligodesoxyribonukleotids zur Zellkultur wurde das Wachstum dieses Virus in den Zellen gehemmt.

Antisense-Oligonukleotide hybridisieren mit Zielsequenzen der mRNA, die komplementär zu ihrer eigenen Sequenz sind und können so eine spezifische Inhibition der Gen-Expression bewirken (z.B.: WAGNER, 1994; OH et al., 1995; GALDERISI et al., 1996; STEPKOWSKI et al., 2000). Die Spezifität einer solchen Bindung steigt exponentiell zur Basis vier mit der Anzahl der Hybridnukleotidpaare an (BROWN, 1999). Daraus resultiert, dass schon relativ kurze Oligonukleotide eine sehr hohe Affinität zur Zielsequenz aufweisen (AGRAWAL et al., 1989; WOOLF et al., 1992; NELLEMAN et al., 2000). Für die Inhibition der Proteinexpression durch Antisense-Moleküle werden verschiedene molekulare Mechanismen diskutiert, die im Folgenden besprochen werden.

2.4.1 MECHANISMEN DER EXPRESSIONSHEMMUNG

Hemmung des Spleissens: Das Spleissen der prä-mRNA erfolgt an spezifischen, hoch konservierten Sequenzen, den *Spliceacceptor-* und *Splicedonor-Sites*. Blockiert ein Antisense-Oligonukleotid eine dieser Sequenzen, sodass sie für die zum Spleissen notwendigen Enzyme unzugänglich werden, wird die Bildung der mRNA verhindert (SCHLINGENSIEPEN et al., 1997; MORCOS, 2001).

Hemmung des Nukleoplasma-Cytoplasma-Transports der mRNA: Die spezifische Bindung von Antisense-Oligonukleotiden an die mRNA nach dem Prozessieren kann die Bindung bestimmter *Carrier-Proteine* verhindern, die für den transmembranen Übergang der mRNA vom Kern ins Cytoplasma nötig sind (HÉLÈNE & TOULUME, 1990; KUTADA et al., 1993; IVERSEN et al., 1994).

Induktion der Ribonuklease-H (RNase-H): In *in vitro*-Experimenten konnte gezeigt werden, dass einer der wichtigsten Mechanismen, die zu einem durch Antisense-Oligonukleotide induzierten Abbau der Ziel-mRNA führen, durch Induktion der RNase-H-Aktivität zustande kommt (z.B.: GILES et al., 1995; DIAS & STEIN, 2002). Das Enzym RNase-H ist eine Endonuklease, die bei der DNA-Replikation eine gewichtige Funktion begleitet. Während der Synthese des zweiten DNA-Stranges

werden zunächst kurze RNA-Fragmente gebildet, die als *Primer* von der DNA-Polymerase für die diskontinuierliche Synthese des komplementären Stranges (Okazaki-Fragmente) verwendet werden. Diese RNA-Fragmente müssen nach der Replikation wieder verdaut werden, damit sie durch DNA-Fragmente mit gleicher Sequenz ersetzt werden können (LEWIN, 1998). Der Abbau dieser RNA-*Primer* wird durch RNase-H katalysiert, die folgende Funktionen ausübt:

- Erkennung des DNA-RNA-Hybrids
- Bindung an das RNA-Fragment
- Selektiver Abbau des RNA-Anteils des Hybrids

Bindet ein Antisense-Oligonukleotid an die komplementäre Zielsequenz der mRNA bzw. prä-mRNA, so entsteht ein Hybrid, der von der zellulären RNase-H erkannt wird. Die Endonuklease bindet an dieses Hybridmolekül und verdaut die entsprechenden mRNA-Sequenzen (SCHLINGENSIEPEN et al., 1997; MORCOS, 2000). Zur Induktion des RNase-H-vermittelten RNA-Verdau ist es nicht wichtig, an welchen Bereich der mRNA das jeweilige Antisense-Oligonukleotid bindet, da Ribonuklease-H die RNA sequenzunspezifisch schneidet (STEIN & CHENG, 1993). Allerdings wurde belegt, dass in manchen Fällen die Zielsequenz, an der Antisense-Oligonukleotide mit der mRNA hybridisieren, sehr wohl von Bedeutung ist. Dies liegt darin begründet, dass die unterschiedlichen mRNAs spezifische Sekundärstrukturen ausbilden, sodass nicht alle Sequenzbereiche von den Antisense-Oligonukleotiden sterisch gleich gut zu erreichen sind (GILES et al., 1995; SUMMERTON, 1999). Da die RNase-H-Aktivität unmittelbar von der Bindung eines Nukleotids an die mRNA abhängig ist, wird verständlich, warum bestimmte mRNA-Sequenzen sensitiver für einen durch Antisense-Oligonukleotide induzierten Verdau sind als andere (SHARMA & NAMASWAMY, 1995).

Inhibition der Translation: Für die Hemmung der Translation ist der Sequenz-Bereich, an welchem das Antisense-Oligonukleotid innerhalb der mRNA bindet von größerer Bedeutung (STEIN & COHAN, 1989; AGRAWAL et al., 1991; MORCOS, 2000). Hybridisiert ein Antisense-Oligonukleotid im Sequenzbereich des AUG-Startkodons, wird die Bindung des Ribosoms, und damit die Initiation der Translation unterdrückt. Interagiert ein Antisense-Oligonukleotid im Bereich der translatierten Sequenz, wird die Wanderung der Ribosomen entlang der mRNA an diesen Stellen behindert, und es kann zu einem Abfallen der Ribosomen kommen (CHANG et al., 1989; NECKERS et al., 1992; WAGNER et al., 1994; LEWIN, 1998). Ein Antisense-Oligonukleotid, welches im Sequenzbereich der Terminationskodons UAG, UAA und UGA mit der mRNA bindet, interferiert entsprechend mit der Termination der Translation (CHANG et al., 1989; WEISS et al., 1993). Ein Antisense-Oligonukleotid, welches die Translation durch Hybridisierung mit der

mRNA beeinflusst, induziert gleichwohl auch den zuvor beschriebenen Abbau der mRNA durch die Ribonuklease-H.

Reduktion der mRNA-Stabilität: Die Primärstruktur der mRNA ist durch einen Poly-A-Bereich, eine längere Abfolge von Adenosinnukleotiden am 3'-Ende, und das 5'-Cap, ein methyliertes Guanosinnukleotid am 5'-Ende, charakterisiert. Diese beiden Faktoren sind maßgeblich für die Stabilität der mRNA verantwortlich. Bindet ein Antisense-Oligonukleotid in der Nähe dieser Sequenzen, kann eine Instabilität und damit verbunden eine Verminderung der Translationsrate einhergehen (AGRAWAL et al., 1991; SHARMA & NAMASWAMY, 1995; SCHLINGENSIEPEN et al., 1997).

Induktion der RNAi-Antwort: Neuste Befunde suggerieren, dass Antisense-Oligonukleotide den unter Kapitel 2.3.1 beschriebenen RNAi-Mechanismus induzieren können (MARTENS & NELLEN, 2002). Durch die Hybridisierung des Antisense-Oligonukleotids mit der mRNA resultiert ein dsRNA-ähnliches Molekül, welches die Interferenz-Kaskade auslösen kann. Zusätzlich wird das Antisense-Oligonukleotid von der *primer*unabhängigen Synthetase RdRP (vgl. Kap. 2.3.1) als aberrant erkannt und zum Doppelstrang transkribiert, der wiederum als Substrat für den Restriktionsenzymkomplex *Dicer* dient. Die resultierenden siRNAs greifen entsprechend potenzierend in die RNAi-Maschinerie ein (MARTENS et al., 2002).

Die molekulare Verbindung des posttranskriptionalen RNAi- bzw. Antisense-Mechanismus zum langfristigen epigenetischen Stilllegen von Genen auf transkriptionaler Ebene ist erst seit kurzer Zeit Gegenstand intensiver Forschung. Bekannt ist, dass siRNAs auch auf das Chromatin wirken und dort die Methylierung von Cytosinen in der DNA und die Modifikation von Histonen vermitteln können (KUHLMANN & NELLEN, 2004; VERDEL et al., 2004). Welche enzymatische Maschinerie die RNA-vermittelte DNA-Methylierung und Chromatinmodifikation bewirkt und wie die Zelle entscheidet, wann ein Gen transkriptional und wann posttranskriptional inaktiviert wird, ist noch nicht klar.

2.4.2 MODIFIKATION DER MORPHOLINO-ANTISENSE-OLIGONUKLEOTIDE

Da Nukleinsäuren intra- und extrazellulär durch die Anwesenheit von Endo- und Exonukleasen binnen kürzester Zeit abgebaut werden, lässt sich durch gezielte Modifikationen synthetisch hergestellter Oligonukleotide eine Steigerung ihrer biochemischen Stabilität erreichen (z.B.: WAGNER et al., 1993; SPEARMAN et al., 1994; SHARMA & NAMASWAMY, 1995). Morpholino-Antisense-Oligonukleotide (Gene Tools, LLC) sind speziell modifizierte Nucleomere. Das Pentoserückgrad des RNA- (Ribose) bzw. des DNA-Nucleosids

(Desoxyribose) ist bei Morpholino-Antisense-Oligonukleotiden durch einen Morpholinoring ersetzt (vgl. Abb. 2.41). Jeweils eine Base (**B**; Adenin, Cytosin, Guanin oder Thymin) ist an der Position 1 des Morpholinorings über eine Glycosidbindung mit dem N₁- (Pyrimidine) oder dem N₉-Atom (Purine) verbunden. Die Morpholino-Nucleoside sind über anionische Phosphorodiamid-Untereinheiten miteinander assoziiert. Zusätzlich sind die Morpholino-Antisense-Oligonukleotide 3'-Carboxyfluoreszein markiert, um eine intrazelluläre Detektion zu ermöglichen (Anregung: 488 nm, Emission: 525 nm). Im Versuch wurde die transmembrane Endocytose der Morpholino-Oligos ins Cytosol mittels einer EPEI-Lösung (*Ethoxilated Polyethylenimine*, Gene Tools, LLC; MORCOS, 2000, 2001; ARORA et al., 2002) katalysiert. Morpholino-Antisense-Oligonukleotide erreichen ihre maximale Effizienz bei einer Länge von 25 Basen und bei einer Konzentration von 1-2 µM (SUMMERTON et al., 1997; SUMMERTON & WELLER, 1997; SUMMERTON, 1999). Um einen *cum granum salis* vollständigen Gen-*Knock-Down* zu erreichen, sollte die Zielsequenz auf der mRNA nicht weiter als 30 Basen in 3'-Richtung vom AUG-Start-Codon entfernt liegen (PARTRIDGE et al., 1996; RAMCHANDANI et al., 1997; SUMMERTON, 1999; MORCOS, 2000, 2001).

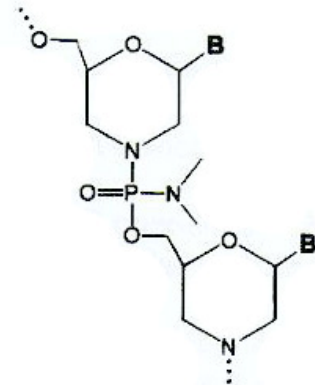


Abb. 2.41 Strukturformel von zwei Morpholino-Nucleosiden, verbunden über eine Phosphorodiamid-Untereinheit (Erklärung siehe Text 2.4.2; **B**=Base).

2.4.3 PRINZIP DER MORPHOLINO-STUDIE

Die Morpholino-Antisense-Oligonukleotide wurden einmalig in einem Gesamtvolumen von 10 ml EPEI-Transfektionslösung (9 ml Seewasser, Salinität 40‰; 960 µl H₂O; 20 µl 0.2 mM EPEI-*Special Delivery Solution*, Gene Tools, LLC; 20 µl 0.5 mM *Special Delivery* Morpholino-Oligo-Nucleotide, Gene Tools, LLC; Endkonzentration: 1 µM; Inkubationsdauer 24 Stunden; MORCOS, 2001; vgl. Kap. 2.4.2) in die Zellen der Versuchstiere endocytiert. Die in den Morpholino-Versuchsreihen verwendeten Tiere (*T. adhaerens*; Hydromedusen von *E. dichotoma*)

wurden nach der EPEI-Behandlung in einem Gesamtvolumen von jeweils 50 ml in Boveri-Schalen in künstlichem Seewasser (Salinität 40‰) unter den in Kapitel 2.1.1.2 bzw. 2.1.2.2 beschriebenen Kultivierungsbedingungen gehältert. Jeder Versuchsansatz enthielt zu Beginn der Studie 10 Tiere. Es wurde sichergestellt, dass kein *Trichoplax* und keine Meduse bei Versuchsbeginn eine phänotypische Abnormalität aufwies. Keines der Tiere zeigte Anzeichen einer sexuellen und/oder vegetativen Vermehrung. Die Versuchsdauer betrug, gleich den dsRNA-Studien, für *Trichoplax adhaerens* 21 Tage und für die *Eleutheria*-Medusen 18 Wochen. Eine Quantifizierung der Versuchstiere und eine genaue Untersuchung auf morphologische und entwicklungsbiologische Veränderungen wurden täglich vorgenommen.

Es wurde für die Homöoboxgene *Cnox-1*, *Cnox-2*, *Cnox-3*, *Cnox-4* und *Cnox-5* (*E. dichotoma*) und für *Trox-2* (*T. adhaerens*) ein Gen-Knock-Down mittels Morpholino-Antisense-Oligonukleotide herbeigeführt. Pro Experimentalansatz wurde die Wirkung eines Morpholino-Antisense-Oligonukleotids untersucht, sodass der Gesamtumfang der Studie aus sechs Experimentalansätzen bestand. Der *Trox-2*-Experimentalansatz für *Trichoplax* wurde sechsmal, die fünf *Cnox*-Experimentalansätze (fünf Hox-Gene) für *Eleutheria* wurden dreimal durchgeführt. In den Kontrollansätzen wurde an Stelle der Morpholino-Antisense-Oligonukleotide ein 25 Nukleotide langes Morpholino-Oligo mit einer zufälligen Sequenz verwendet. Die Endkonzentration betrug ebenfalls 1 µM. Als zweite Kontrolle diente in allen insgesamt neun Versuchsreihen (*Trichoplax*- und *Eleutheria*-Studie) ein Meerwasser-Kontrollansatz mit Tieren, bei denen keine Transfektion mit Morpholino-Antisense-Oligonukleotiden vorgenommen wurde. Die Sequenzen der einzelnen Morpholino-Oligonukleotide sowie eine tabellarische Einzelauflistung der Ergebnisse werden im Anhang gezeigt (siehe Kap. 5.2 und Kap. 5.5).

Übersicht der experimentellen Versuchsansätze:

E. dichotoma

3 Versuchsreihen mit jeweils:

E₁: *Cnox-1-25-Morpholino*

E₂: *Cnox-2-25-Morpholino*

E₃: *Cnox-3-25-Morpholino*

E₄: *Cnox-4-25-Morpholino*

E₅: *Cnox-5-25-Morpholino*

K₁: *Con-25-Morpholino*

K₂: *Con-H₂O*

T. adhaerens

6 Versuchsreihen mit jeweils:

E₁: *Trox-2-25-Morpholino*

K₁: *Con-25-Morpholino*

K₂: *Con-H₂O*

E= Experimentalansatz; K= Kontrollansatz

2.4.4 *Trox-2*-INHIBITIONS-ZUSATZSTUDIE MIT MODIFIZIERTER ANTISENSE-DNA

Für das *Trox-2*-Gen wurde alternativ zur dsRNA- und Morpholino-Studie eine dritte Inhibitionsmethode getestet. Hierbei wurden Antisense-Oligodesoxyribonukleotide (Eurogentec) benutzt, die täglich, zur Fütterung und nach jedem Wasserwechsel, ins Meerwassermedium hinzugegeben wurden.

Auch wurden verschiedene Endkonzentrationen (1 μM , 2 μM , 5 μM , 10 μM und 20 μM) der Antisense-Oligodesoxyribonukleotide im Medium untersucht. Die Länge der Antisense-Oligos betrug, abweichend zur Morpholino-Studie (25), nur 14 Nukleotide; als Kontrolle wurde die Wirkung eines Oligodesoxyribonukleotids mit zufälliger Sequenz analysiert. Zusätzlich wurde, gleich den dsRNA- bzw. den Morpholino-Oligo-Untersuchungen, eine Meerwasser-Kontrolle als Referenz benutzt. Die Dauer der Studie pro Versuchsreihe (insgesamt 8) betrug 21 Tage; jeder Versuchsansatz (3 pro Versuchsreihe) umfasste zu Beginn 10 Tiere. Die Versuchstiere wurden täglich gezählt und einer genauen Untersuchung auf morphologische und entwicklungsbiologische Veränderungen unterzogen.

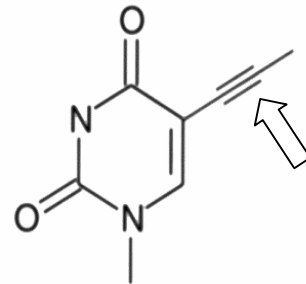


Abb. 2.42 5-(1-Propynyl)-Thymin, chemisch modifiziert am C5-Atom durch eine Propynyl-Gruppe (siehe Pfeilmarkierung). Das C5-(1-Propynyl)-Cytosin ist entsprechend gleich modifiziert.

Die Modifikationen der in dieser Untersuchung verwendeten Oligodesoxyribonukleotide betreffen die Pyrimidin-Basen Cytosin und Thymin. An der Position C-5 der Pyrimidin-Basen ist an das Kohlenstoffatom an Stelle des Wasserstoffatoms (Cytosin) bzw. des Methylrests (Thymin) eine Propynyl-Gruppe gebunden (vgl. Abb. 2.42; WAGNER et al., 1993). Die Sequenzen der Oligodesoxyribonukleotide sind im Kapitel 5.3 aufgeführt.

Übersicht der experimentellen Versuchsansätze:

T. adhaerens

8 Versuchsreihen mit jeweils:

E₁: *Trox-2*-14-Antisense

K₁: *Con*-14-Sense

K₂: *Con*-H₂O

E= Experimentalansatz; K= Kontrollansatz

2.5 NICHT-RADIOAKTIVE *in situ* HYBRIDISIERUNG

Die Bildung eines Duplexmoleküls aus zwei komplementären Nukleinsäuresträngen wird als Hybridisierung bezeichnet. Sie ist die Basis einer Technik, welche es ermöglicht das Vorhandensein von mRNA bestimmter Gene in den Zellen oder Geweben (*in situ*) von Lebewesen gezielt zu detektieren. Hierbei wird eine der Ziel-mRNA des untersuchten Gens komplementäre, markierte Sonde in die Zellen eingeschleust. Nachfolgend werden die entstandenen mRNA/RNA-Hybride mittels einer Farb- oder Fluoreszenzreaktion sichtbar gemacht. Die *in situ* Hybridisierung ermöglicht es so, zeitliche und räumliche Expressionsmuster von Genen aufzuzeigen (vgl. SCHWARZACHER & HESLOP-HARRISON, 2000). Die Methode wurde von J.G. GALL und M.L. PARDUE (1969) entwickelt.

2.5.1 SYNTHESE DER RNA-SONDE

Als DNA-Templat für die Synthese der RNA-Sonden dienten die gleichen cDNA-Klone wie bei der Synthese der dsRNA [*Cnox-1-Gen* (401bp), *Cnox-2-Gen* (426bp), *Cnox-3-Gen* (241bp), *Cnox-4-Gen* (199bp), *Cnox-5-Gen* (219bp), *Trichoplax adhaerens*- β -Aktin-Gen (1360bp) und *Trox-2-Gen* (384bp)]. Die Längenangaben der Genfragmente betreffen nur die *Insert*-Größen ohne die Sp6/T7-pGEM[®]-T-Vektorflanken (Sp6-Flanke: 93bp, T7-Flanke: 68bp, gesamt: 161bp). Es wurde mithilfe der Standardprimer T7 und Sp6 vom pGEM[®]-T-Vektor (Promega) bzw. im Falle des β -Aktin-Gens vom pCR[®]II-TOPO[®]-Vektor (Invitrogen; Sp6-Flanke: 98bp, T7-Flanke: 88bp, gesamt: 186bp) via PCR amplifiziert.

Amplifikation des DNA-Templats: Die Standard-PCR-Reaktionen zur Reamplifikation der DNA aus den im pGEM[®]-T-Vektor liegenden cDNA-Klone wurden in einem Volumen von 25 μ l in einem PE GeneAmp[®] PCR System 9700 Cycler (Applied Biosystems) durchgeführt. Die Reaktionen enthielten 2.5 μ l 10x Amplifikations-Puffer (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1.5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 0.1 mg/ml Gelatine; Eurogentec), 1.5 mM MgCl₂, 5 pmol von jedem *Primer* (T7 bzw. Sp6), 0.2 mM dNTPs (Roche), 0.5 U Taq DNA-Polymerase (Goldstar, Eurogentec) und 1 μ l DNA-Templat (80-100 ng/ μ l im pGEM[®]-T-Vektor). Die PCR-Reaktionen erfolgten bei 3 min/94°C Vordenaturierung, 35 Zyklen jeweils 30 s/95°C Denaturierung, 30 s/53°C Hybridisierung, 60 s/72°C Polymerisierung und 6 min/72°C Elongation. Die Auftrennung und Reinigung der Amplifikationsprodukte erfolgte wie in Kapitel 2.3.2 beschrieben (vgl. Abb. 2.33).

T7- und Sp6-RNA-Sonden-Synthese: Die Synthesen der Sondeneinzelstränge wurden für die jeweiligen Gene in einem Gesamtvolumen von 20 μ l durchgeführt

und enthielten jeweils 4 µl (ca. 250 ng) DNA-Templat, 2 µl 10x Transkriptionspuffer (0.4 mM Tris-HCl pH 8.0, 60 mM MgCl₂, 100 mM DTT, 20 mM Spermidin), 1 µl RNase-Inhibitor (40 U/µl), 2 µl RNA-Polymerase (T7 bzw. Sp6, 20 U/µl), 2 µl 10x dNTPs (10 mM dATP, 10 mM dCTP, 10 mM dGTP, 6.5 mM dUTP, 3.5 mM dUTP Fluoreszein-12- bzw. DIG-markiert, pH 7.5; Roche) und 9 µl ddH₂O. Die Ansätze wurden für drei Stunden bei 37°C inkubiert. Die anschließende DNase-Behandlung zur Eliminierung des DNA-Templats und die Präzipitation der RNA-Sonden erfolgte wie in Kapitel 2.3.2 beschrieben. Für jedes Gen wurde entsprechend der Orientierung des Fragments im Vektor entweder der Sp6- oder der T7-Strang als (Antisense-) Sonde verwendet. Der mRNA-sequenzgleiche Sense-Strang diente für die jeweiligen Gene als Kontrolle. Die Orientierung des Fragments im pGEM[®]-T-Vektor wurde via Sequenz-PCR mit dem PE GeneAmp[®] Sequence Detector 5700 (Applied Biosystems) ermittelt.

Agarose-Gelelektrophorese zum Nachweis der RNA-Sonden: Die Gelelektrophorese zum Nachweis der RNA-Sonden wurde gemäß den zuvor beschriebenen Angaben durchgeführt (vgl. Kap. 2.3.2). Abweichungen davon betreffen eine Erhöhung der Spannung auf 120 V und die Verkürzung der Auftrennungsdauer auf 5 min, um einem Verdau der Einzelstrang-RNA-Fragmente im Gel zu begegnen (vgl. Abb.2.51). Die Menge der aus dem Gel eluierten dsRNA wurde via Vergleich zu Lambda-DNA bekannter Konzentration abgeschätzt.

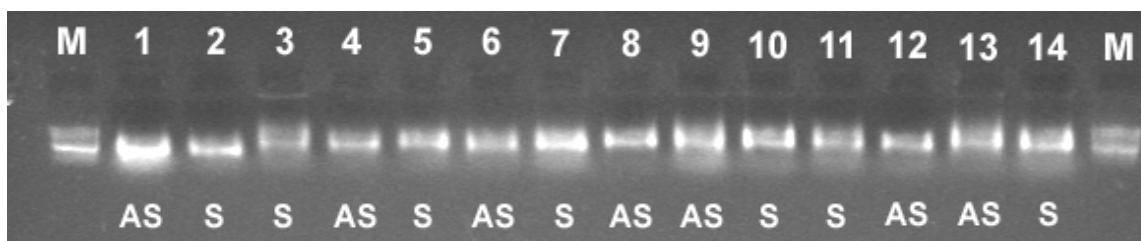


Abb. 2.51 RNA-Sonden von *Cnox-1* (Spur 1&2), *Cnox-2* (Spur 3&4), *Cnox-3* (Spur 5&6), *Cnox-4* (Spur 7&8), *Cnox-5* (Spur 9&10), *Trox-2* (Spur 11&12) und *Trichoplax*-β-Aktin (Spur 13&14). Spur M = 100bp-Standardlängen-Marker. Abkürzungen betreffen: AS= Antisense, S= Sense.

2.5.2 DURCHFÜHRUNG DER *whole mount in situ* HYBRIDISIERUNG

Die *whole mount in situ* Hybridisierung wurde nach einem modifizierten Standardprotokoll durchgeführt (GRÖGER et al., 1999; MÜLLER et al., 1999; SCHWARZACHER & HESLOP-HARRISON, 2000).

Fixierung und Permeabilisierung der Versuchstiere: Die Fixierung der Versuchstiere wurde mit Lavdowsky-Fixierungslösung (Ethanol 98% / Formaldehyde 16% / Essigsäure 100% / 10xPBS: 44/20/4/32) bei 4°C vorgenommen. *Trichoplax adhaerens* und die Medusen von *Eleutheria dichotoma* wurden für

6 Stunden, Planularlarven und Primärpolypen von *Eleutheria dichotoma* für 3 Stunden im Fixierungsmedium inkubiert. Im Anschluss wurden die Tiere dreimal für 10 min mit PBST Puffer (8.0 g/l NaCl, 0.2 g/l KCl, 1.44 g/l Na₂HPO₄, 0.24 g/l KH₂PO₄, pH 7.5 in DEPC-H₂O, 1 ml Tween 20/l) gewaschen. Die nachfolgende Permeabilisierung der Gewebe erfolgte mittels eines Pronase-Verdau bei 37°C (10 µg/ml; *T. adhaerens*, Planularlarven und Primärpolypen von *E. dichotoma* für 3 min; Medusen und Polypen von *E. dichotoma* für 15 min). Nach dreimaligem Waschen in PBST-Puffer wurde optional eine Postfixierung mit 4% Paraformaldehyd/0.2% Glutaraldehyd vorgenommen.

Hybridisierungsreaktion: Zunächst wurden die Tiere in PBST/Hybridisierungspuffer (1:1) für 15 min einmalig gewaschen. Die anschließende Prähybridisierung in Hybridisierungspuffer (HB; 50% Formamid ultrapur, 5x SSC-Puffer, 1% SDS, 125 mg/ml Dextran-Sulfat, 100 µg/ml Hefe-tRNA, 25 µg/ml Poly-A-RNA-Fragmente) erfolgte für eine Stunde bei 55°C. Die Inkubation mit der genspezifischen RNA-Sonde (100 ng/ml) wurde nachfolgend über Nacht in Hybridisierungspuffer bei 55°C durchgeführt. Das Dextran-Sulfat des Puffers erhöht die Hybridisierungsrate von RNA-Sonde und Ziel-mRNA um das 100-fache (WAHL et al., 1979) und wirkt dadurch der 5-10-fachen Verlangsamung der Hybridisierungsreaktion durch Formamid entgegen (PEARSON, 1991). Nach dreimaligem Waschen in 1x SSC-Puffer/1% SDS (150 mM NaCl, 300 mM Natriumcitrat in DEPC-H₂O) wurden die ungebundenen Sondenfragmente mittels RNase A-Verdau (20 µg/ml, DNase frei) eliminiert.

Detektionsreaktion: Die mit den direkt Fluoreszein markierten Sonden behandelten Tiere wurden nach dreimaligem Waschen mit TNT-Puffer (100 mM Tris-HCL, pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.1% Tween) einer DAPI-Zellkernfärbung (4,6-Diamidin-2-phenylindol-dihydrochlorid, BM) unterzogen (Anregung: 364 nm, Emission: 465 nm), auf Mikroskopobjektträgern in Glycerol/PBST-Medium (7:3; + DABCO, 1,4-diazobicyclo-2,2,2-oktan, BM) eingebettet und unter dem Fluoreszenzmikroskop analysiert.

Die Tiere der NBT/X-Phosphat-Färbung wurden zunächst für eine Stunde in Blocking-Puffer (100 mM Tris-Hcl, 150 mM NaCl, 0.5% Maleinsäure; pH 7.5) überführt, um unspezifische Antikörperbindestellen zu eliminieren. Nachfolgend wurde mit dem Anti-DIG-Antikörper (**D**igoxigenin; 1:1000; BM) bei Raumtemperatur über Nacht inkubiert. Nach sechsmaligem Waschen in Substrat-Puffer (100 mM Tris pH 9.5, 100 mM NaCl, 50 mM MgCl₂) erfolgte die Farbreaktion (in jeweils 1 ml Substrat-Puffer, 4.5 µl NBT, 3.5 µl X-Phosphat, 5 mg Levamisol). Beide Substrate, NBT (blau) und X-Phosphat (rot), werden von der Alkalischen

Phosphatase in zwei Farbstoffe umgesetzt und bilden zusammen ein dunkelviolett Farbräzipitat. Abschließend wurden die Tiere in Glycerol/PBST-Medium (7:3; +0.5% n-Propyl-Gallat) eingebettet und unter dem Lichtmikroskop analysiert.

2.5.3 SEMI-DÜNNSCNITTE

Nach der *in situ* Hybridisierung wurden die Präparate über eine Ethanolreihe mit aufsteigender Konzentration (10%, 30%, 50%, 70%, 80%, 90% und 98%) stufenweise entwässert. Um eine 100%ige Entwässerung zu erreichen, wurden die fixierten Tiere nachfolgend zunächst mit Ethanol/Propylenoxid (1:1) und weiter mit reinem Propylenoxid jeweils zweimalig für 15 min gewaschen. Danach wurden die Präparate für 20 Stunden in Propylenoxid/DURCUPAN-ACM-Einbettungsmedium (1:1) inkubiert und im Anschluss für drei Stunden in reinem DURCUPAN-ACM-Einbettungsmedium (Fluka) bei 50°C im Wärmeschrank vorgetrocknet. Um eine optimale Polymerisation der Präparate in der monomeren vier Komponenten Kunstharzmischung (A/M Epoxidharz 11.36 g; B Härter 964 10.00 g; C Beschleuniger 964 0.34 g; D Weichmacher 0.16 g) zu gewährleisten, wurden diese abschließend für 24 Stunden bei 40°C, weitere 48 Stunden bei 60°C und drei Tagen bei Raumtemperatur nachgehärtet.

Die fixierten Tiere wurden nachfolgend aus dem Kunstharzblock ausgesägt. Zur Anfertigung der ca. 1 µm dicken Dünnschnitte wurden neue Dreiecksglasmesser am Knifemaker LKB Type 7801 A gebrochen und die Proben abschließend am Pyramitom LKB sektioniert.

2.6 STATISTISCHE DATENAUSWERTUNG

Sofern nicht explizit anders genannt, beträgt das Signifikanzniveau in allen statistischen Tests 5% ($p < 0.05$) und die Nullhypothese wird abgelehnt, wenn die Überschreitungswahrscheinlichkeit für das beobachtete Ereignis geringer ist.

2.6.1 χ^2 -ANPASSUNGSTEST

Der χ^2 -Anpassungstest ist ein nichtparametrischer Test zum Prüfen von Verteilungen. Geprüft wird die Nullhypothese, dass die Stichprobe und eine bekannte theoretische Verteilung gleich sind. In der vorliegenden Arbeit wurde mit Hilfe des χ^2 -Tests auf Gleichverteilung geprüft, d.h., ob die gegebene empirische Verteilung aus der Grundgesamtheit einer Binomialverteilung stammt, *in concreto*, ob in der *Trox-2*-Studie ein signifikanter Unterschied zwischen den Experimentalansätzen und den Kontrollansätzen einer Versuchsreihe besteht.

2.6.2 KORRELATIONSANALYSE VON SPEARMAN

Die Korrelationsanalyse gibt die Stärke des Zusammenhanges zweier Merkmale an. Der Korrelationskoeffizient kann Werte zwischen +1 und -1 annehmen. Er ist positiv, wenn mit der Zunahme des Werts eines Merkmals auch eine Zunahme des Werts eines anderen Merkmals verbunden ist (bzw. die Werte beider Merkmale abnehmen) und negativ, wenn die Werte beider Merkmale gegenläufig variieren. Der Rang-Korrelationskoeffizient von SPEARMAN ist ein nicht-parametrischer Korrelationskoeffizient, d.h., er setzt keine Kenntnis darüber voraus, ob die beiden Zufallsvariablen eine verbundene zweidimensionale Normalverteilung besitzen. Alle durch dieses Testverfahren ermittelten Korrelationskoeffizienten haben eine Korrektur aufgrund der Berücksichtigung gleicher Rangzahlen (Bindungen) erfahren (WEBER, 1980).

2.6.3 WILCOXON-TEST FÜR GEPAARTE STICHPROBEN

Der Wilcoxon-Test für gepaarte Stichproben ist ein nichtparametrischer Test zum Vergleich zweier verbundener Stichproben bei gepaarten Beobachtungen. Er beruht auf Ranginformationen der beobachteten Differenzen von Wertepaaren. Bei einem Stichprobenumfang >20 Wertepaaren erreicht er nahezu die Trennschärfe des t-Tests, setzt im Gegensatz zu diesem aber nicht eine Normalverteilung der Zufallsvariablen voraus. In der vorliegenden Untersuchung wurde mit dem Wilcoxon-Test für gepaarte Stichproben geprüft, ob in den *Cnox*-Studien ein signifikanter Unterschied zwischen den Experimentalansätzen und den Kontrollansätzen einer Versuchsreihe besteht.

2.6.4 REGRESSIONSANALYSE

Zum Test auf lineare Abhängigkeit zwischen zwei Merkmalen wurden Regressionsgeraden und ihre Signifikanzen berechnet. Die Punkte, die den Beobachtungspaaren (x und y) entsprechen, lassen sich in vielen Fällen, bei denen der Wert y des Merkmals Y in einem kausalen oder korrelativen Abhängigkeitsverhältnis zu dem Wert x des Merkmals X steht, durch eine Gerade $y = a + b \cdot x$ darstellen, wobei die Konstante a die Lage und b (Regressionskoeffizient) die Steigung der Geraden angeben. Der Regressionskoeffizient b_y gibt an, um wie viele Einheiten sich y verändert, wenn die unabhängige Variable x um eine Einheit steigt. Gesucht wird die Gerade, die sich dem Punkteschwarm am besten anpaßt. Kriterium hierfür ist, dass die Summe der Quadrate der Differenzen zwischen den beobachteten und den geschätzten Werten ein Minimum hat. Wie gut oder schlecht sich ein Punkteschwarm von der Regressionsgeraden darstellen läßt, gibt der dazugehörige Korrelationskoeffizient (R) an. Die Signifikanzschwelle in den vorliegenden Fällen (vgl. Kap. 3.2) bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% und 16 Freiheitsgraden liegt bei $R_{(\alpha < 0,05; f=16)} > 0,4683$. Die Größe des Quadrates aus R heißt Bestimmtheitsmaß und gibt den Anteil (%) der durch die Regressionsgerade erklärten Summe der Abweichungsquadrate an (WEBER, 1980).

3. ERGEBNISSE

3.1 *TRICHOPLAX ADHAERENS*

3.1.1 EXPRESSIONSSTUDIEN

Für *Trichoplax adhaerens* wurde die Expression zweier Gene (β -Aktin und *Trox-2*) mittels *whole mount in situ* Hybridisierung untersucht. Die Ganztierpräparate wurden eingesetzt, um die Orte der Genexpression im Hinblick auf die Gesamtorganisation des Organismus besser einordnen zu können. Die Signalanalyse erfolgte alternativ durch NBT/X-Phosphat- (vgl. Abb. 3.10 & Abb. 3.12) oder Fluoreszenz-Detektion (vgl. Abb. 3.11 & Abb. 3.13). Distinkte Signale wurden für beide Gene und Methoden nur mit der Antisense-Sonde, nicht mit der Sense-Sonde (Kontrolle) detektiert. Es zeigten sich genspezifisch und interindividuell gleiche Färbe-Ergebnisse, die Hintergrundfärbung war gering und immer gut von der Signalantwort unterscheidbar.

3.1.1.1 EXPRESSION DES β -AKTIN GENS

Der Expressionsnachweis des *Trichoplax*- β -Aktin-Gens diente im Rahmen der Studie als Positivkontrolle. Das *Trichoplax*- β -Aktin-Gen war regelmäßig in fast allen Zellen und im gesamten Tier hoch exprimiert. Durch sektionales Fokussieren der Untersuchungsobjekte mittels des Fluoreszenz- bzw. Lichtmikroskops (1000-fache Vergrößerung) wurde deutlich, dass der Hauptteil der Signale aus Zellen des funktionell mittleren und unteren Epithels resultiert. Wahrscheinlich handelt es sich

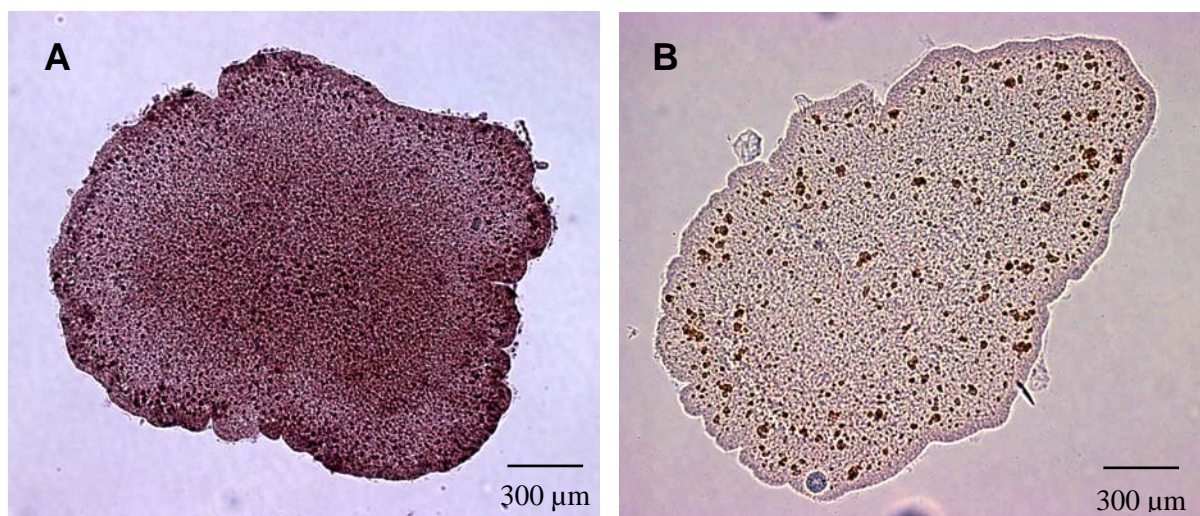


Abb. 3.10 Expression des β -Aktin-Gens bei *Trichoplax adhaerens* (A), detektiert mittels NBT/X-Phosphat-Färbung. Das Gen ist gleichmäßig über das gesamte Tier exprimiert. Die Sense-Kontrolle (B) zeigt keinerlei Farbsignale.

hierbei um Faser- und Zylinderzellen. Gleichwohl findet man das Gen aber auch in ca. 50-60% der Deckzellen exprimiert. Eine besonders hohe Expressionsrate des β -Aktin-Gens war in den Zellen der äußersten Randzone von *T. adhaerens* zu finden. Der Expressionsnachweis des *Trichoplax*- β -Aktin-Gens war problemlos reproduzierbar und in allen untersuchten Tieren positiv ($n > 200$). Aufgrund dieser Befunde ist das Gen bestens als Positivkontrolle für die *Trox-2*-Expressionsstudie geeignet.

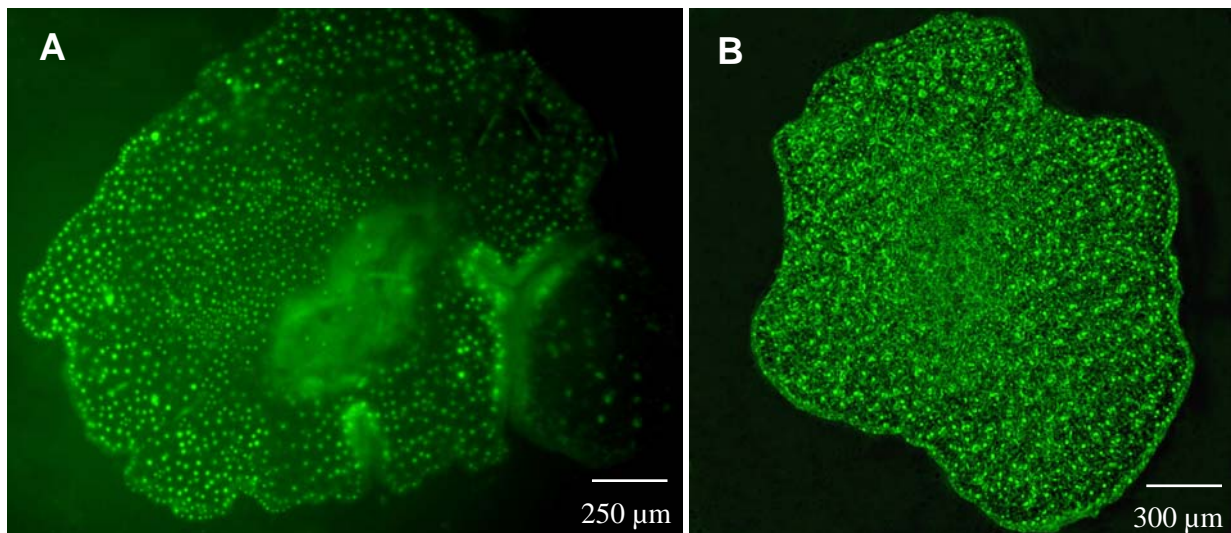


Abb. 3.11 Expression des β -Aktin-Gens bei *Trichoplax adhaerens*, detektiert mittels Fluoreszein markierter Sonden. Das Gen zeigt ein gleichmäßiges Expressionsmuster (A), ist aber häufig in den Zellen der äußersten Randzone höher exprimiert (B).

3.1.1.2 EXPRESSION DES *TROX-2*-GENS

Aus den Ergebnissen der quantitativen PCR (RT-PCR; vgl. Abb. 3.17) lässt sich schließen, dass das *Trichoplax*- β -Aktin-Gen ca. 5-8 mal so hoch exprimiert ist wie das *Trox-2*-Gen. Die Detektion der *Trox-2*-Signale erforderte folglich eine weitaus sensitivere Handhabung. Des Weiteren war das *Trox-2*-Gen nicht in allen Tieren aktiv, vielmehr zeigten nur etwa 85-90% der examinieren Tiere eine positive *Trox-2*-Signalantwort ($n > 100$). Die Expressionssignale der *whole mount in situ* Hybridisierung konnten sowohl mittels NBT/X-Phosphat-Färbung als auch mittels Fluoreszein markierter Sonden detektiert werden.

Das *Trox-2*-Gen findet man in einem distinkten Ring nahe der peripheren Randzone von *Trichoplax adhaerens* exprimiert. Eine sehr geringe Anzahl vereinzelter Zellen innerhalb und außerhalb dieses Expressionsrings zeigten ebenfalls eine positive Signalantwort (vgl. Abb. 3.12 und Abb. 3.14).

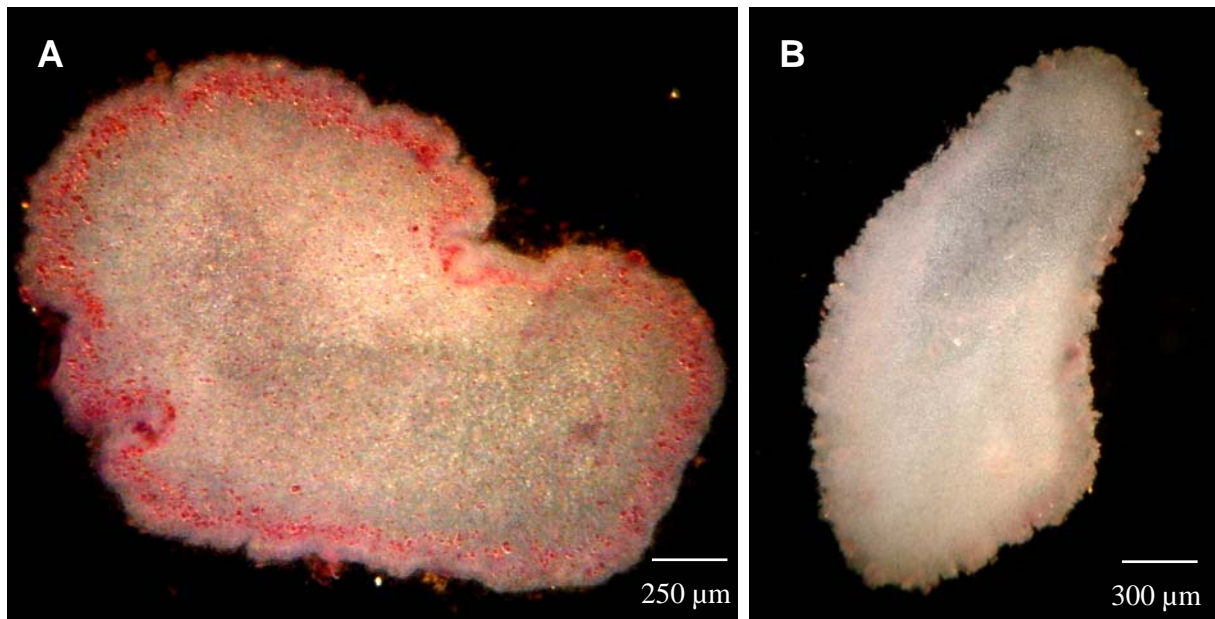


Abb. 3.12 Expression des *Trox-2*-Gens bei *Trichoplax adhaerens* (A), detektiert mittels NBT/X-Phosphat-Färbung. Das Gen ist in einem distinkten Ring in der Peripherie des Tieres exprimiert. Die Sense-Kontrolle (B) zeigt keinerlei Farbsignal.

Durch sektionales Fokussieren und anhand von histologischen Querschnitten konnten die Expressionssignale in kleinen, regelmäßig verteilten Zellen zwischen dem funktionell oberen und unteren Epithelium lokalisiert werden. Das



Abb. 3.13 Histologischer Querschnitt durch *Trichoplax adhaerens*. *Trox-2* exprimierende Zellen zwischen dem morphologisch oberen (O) und unteren (U) Epithel (siehe Pfeilmarkierungen; Photo S. SAGASSER aus JAKOB et al., 2004).

Expressionsmuster beschreibt eine Ringform in der Randzone des Tieres, dort wo sich die beiden Epithelien vereinen. Bemerkenswerter-

weise sind die Zellen wesentlich kleiner als die Faserzellen der Zwischenschicht (JAKOB et al., 2004); zuweilen erscheinen die Zellen geclustert (vgl. Abb. 3.13).

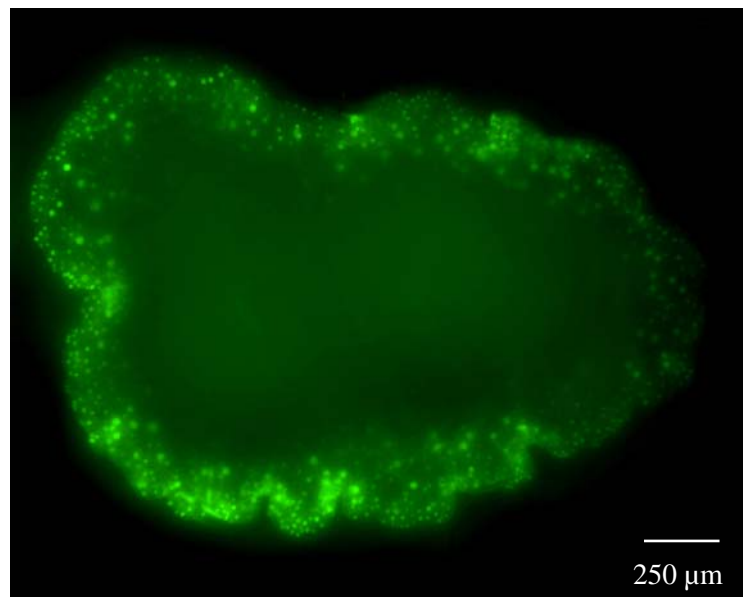


Abb. 3.14 Expression des *Trox-2*-Gens bei *Trichoplax adhaerens*, detektiert mittels Fluoreszein markierter Sonden.

Im Zuge von Regenerationsexperimenten konnte bei einem Tier eine Expression des *Trox-2*-Gens in einer Ringform, vergleichbar mit der des "normalen" *Trox-2*-Expressionsmusters, um eine verletzte Stelle im Körperzentrum nachgewiesen werden. Der untersuchte *Trichoplax* wurde hierbei 15 min nach dem Zufügen der Verletzung fixiert (vgl. Abb. 3.15).

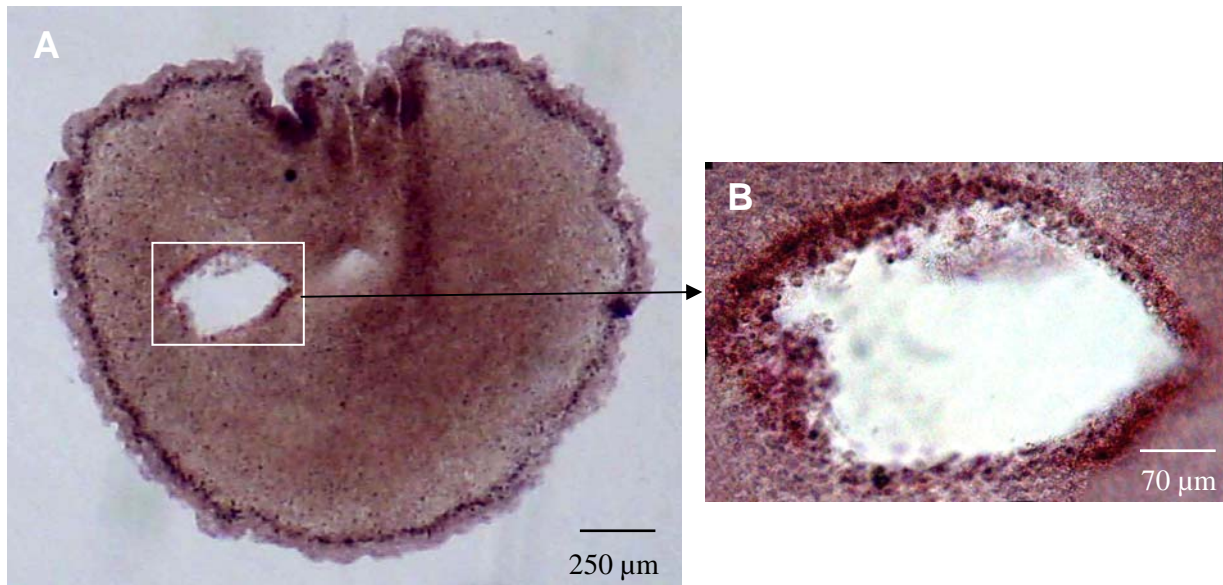


Abb. 3.15 A Expression des *Trox-2*-Gens bei einem verletzten *Trichoplax adhaerens*, detektiert mittels NBT/X-Phosphat-Färbung. Zusätzlich zu dem typisch peripheren *Trox-2*-Expressionsring ist das Gen, ebenfalls ringförmig, um die sich regenerierende Stelle exprimiert. **Abb. 3.15 B** zeigt eine Detail-Aufnahme der verletzten Stelle.

3.1.2 *Trox-2*-INHIBITION MITTELS dsRNA

3.1.2.1 TRANSFEKTIONSNAHWEIS DER dsRNA

Die in der Inhibitionsstudie verwendeten dsRNA-Fragmente (545bp) wurden Fluoreszein markiert, um eine zelluläre, posttransfektionale Detektion zu ermöglichen. Hierbei wurden im Zuge der dsRNA-Synthese an den Uracil-Nukleotidpositionen der ssRNAs Fluoreszein-12-UTPs eingebaut. Der intrazelluläre Nachweis der dsRNAs erfolgte mit dem Fluoreszenzmikroskop 24 Stunden nach der Transfektion (Anregung: 488 nm, Emission: 525 nm).

Bei jedem der transfizierten Individuen konnte ein deutliches und weitestgehend homogenes Fluoreszenzsignal in allen Zellen detektiert werden (vgl. Abb. 3.16). Die *Trox-2*-Versuchs- und die *Cnox-1*-Kontroll-Tiere zeigten keine Signaldivergenz. Die Intensität der Signalantwort dieser Tiere war jedoch deutlich von der geringen Eigenfluoreszenz der nicht-transfizierten Meerwasser-Kontroll-Tiere unterscheidbar. Sieben Tage nach der Transfektion konnte nur noch ein schwaches Fluoreszenzsignal in den Zellen der Untersuchungsobjekte detektiert werden. Nach weiteren sieben Tagen war kein Unterschied mehr zwischen *Trox-2*-Versuchs- und den Meerwasser-Kontroll-Tieren feststellbar.

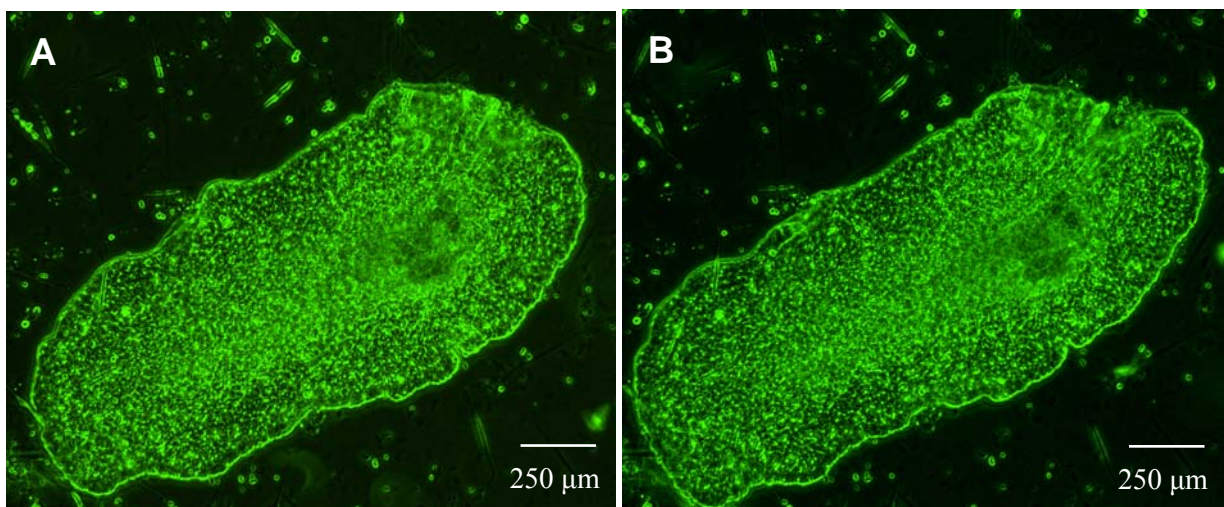


Abb. 3.16 A Fluoreszenzmikroskopische Ansicht von *Trichoplax adhaerens*, auf dem Substrat auf sitzend und 24 Stunden nach der Transfektion mit Fluoreszein markierter dsRNA (Anregung: 488 nm, Emission: 525 nm). Die Zellen zeigen eine deutliche und weitestgehend homogene Signalantwort. **Abb. 3.16 B** zeigt denselben *Trichoplax* fünf Sekunden später, um die Vitalität des Tieres zu dokumentieren.

3.1.2.2 FUNKTIONALITÄTSNAHWEIS DES RNAi-MECHANISMUS MITTELS RT-PCR

Die Reverse Transkriptase-PCR (RT-PCR) wurde benutzt, um einen quantitativen Nachweis der zellulären *Trox-2*-mRNAs nach der Transfektion der *Trox-2*-dsRNAs

zu erbringen. Hierbei wurden 48 Stunden nach der Transfektion von jeweils 30 Individuen die RNAs isoliert, diese nachfolgend mittels RT-PCR in cDNAs transkribiert und eine PCR mit genspezifischen *Primern* durchgeführt. Gleiches wurde analog bei den unbehandelten Meerwasser-Kontroll-Tieren (n= 30) sowie für die *Cnox-1*-Kontroll-Individuen (n=30) vollzogen. Als Mengen-Referenz zum *Trox-2*-Amplifikat (750bp) diente bei gleichen PCR-Bedingungen das *Trichoplax*- β -Aktin (489bp).

Die Aktin-Banden im Gel sind nach 25-PCR-Zyklen bei den drei Versuchsansätzen (Meerwasser-Kontroll-, *Cnox-1*-Kontroll- und *Trox-2-Knock-Down*-Tiere) einer Versuchsreihe gleich intensiv repräsentiert (Spur 1, 3 und 5; vgl. Abb. 3.17). Die korrespondierenden *Trox-2*-Bandensignale der Kontrollen (Spur 2 und 4), sind hingegen ca. fünfmal intensiver als die *Trox-2*-Bande der "*Trox-2-Knock-Down*-PCR" (Spur 6).

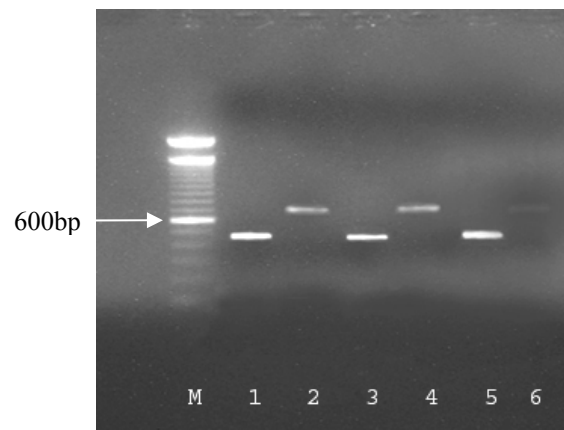


Abb. 3.17 Quantitative PCR von *Trichoplax*- β -Aktin (Spur 1, 3&5; 489bp) und *Trox-2* (Spur 2, 4&6; 750bp) mit cDNA von a) Meerwasser-Kontroll-Tieren (Spur 1&2), b) *Cnox-1*-dsRNA-transfizierten-Kontroll-Tieren (Spur 3&4) und c) *Trox-2*-dsRNA-transfizierten Tieren (Spur 5&6). Die *Trox-2*-mRNA-Menge der Kontrollen ist ca. fünfmal höher als die der *Trox-2*-defizitären Individuen. Spur M = 100bp-Standardlängen-Marker.

3.1.2.3 ERGEBNISSE DES RNAi-KNOCK-DOWNS

Es wurde für das Homöoboxgen *Trox-2* ein Gen-*Knock-Down* mittels dsRNA herbeigeführt. Die Dauer der Studie betrug pro Versuchsreihe (insgesamt vier) jeweils 21 Tage. Als erste Kontrolle fungierten in den *Trox-2*-Versuchsreihen 10 Tiere, die mit dsRNA des *Cnox-1*-Gens transfiziert wurden. Als zweite Kontrolle diente ein Meerwasser-Ansatz mit 10 Individuen, bei denen keine Transfektion mit dsRNA vorgenommen wurde.

Die vier *Trox-2*-Versuchsreihen zeigten vom Ergebnis die gleichen Tendenzen. In allen vier Reihen unterschieden sich spätestens 14 Tage nach Versuchsbeginn die Werte der beiden Kontrollansätze signifikant vom Experimentalansatz (χ^2 -Anpassungstest, $p < 0,05$; vgl. Tab. 3.10 und Abb. 3.18).

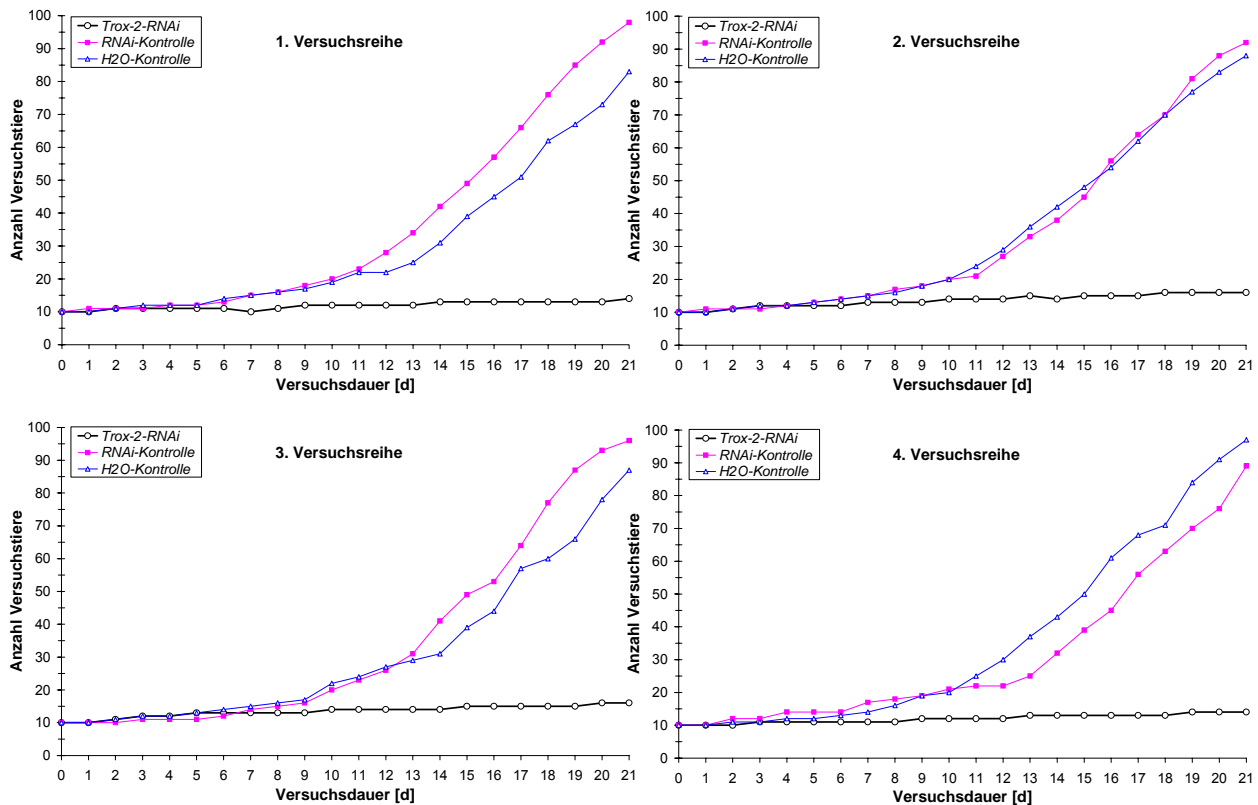


Abb. 3.18 Einfluss der *Trox-2*-Inhibition via RNA-Interferenz (RNAi) auf die Vermehrungsrate von *T. adhaerens*. Aufgetragen ist die absolute Anzahl an Versuchstieren gegen die Versuchsdauer.

Die vier *Trox-2*-RNAi-Experimentalansätze wiesen nach Beendigung der Studie nie mehr als 16, im Mittel sogar nur 15 Tiere auf. Der Mittelwert der RNAi-Kontrollen lag mit über 93 Individuen pro Ansatz mehr als sechsmal höher als der der *Trox-2*-RNAi-Experimentalansätze. Die niedrigste Anzahl an Tieren (89) in den RNAi-Kontrollen wies nach 21 Tagen Versuchsdauer die 4. Versuchsreihe auf, die höchste Zahl die 1. Versuchsreihe (98).

Die Anzahl der Meerwasser-Kontroll-Tiere lag nach Beendigung der Studie im Mittel bei fast 89, mindestens bei 83 und maximal bei 97. Der Mittelwert der Meerwasserkontrollen ist, ähnlich den RNAi-Kontrollen, fast sechsmal höher als der der Experimentalansätze. Im zeitlichen Verlauf der Studie beschrieb die Versuchstierzahl der Kontrollansätze eine fast exponentielle Zunahme, währenddessen stieg die Anzahl der Experimentalansätze lediglich annähernd linear um den Faktor 1,5 an (vgl. Abb. 3.18).

In der Zusammenfassung der vier Versuchsreihen werden die gleichen Tendenzen wie in den Einzelversuchsreihen deutlich (vgl. Abb. 3.19). Bei einem Stichprobenumfang von $n=40$ Tieren zu Beginn der Studie, stieg die Anzahl der Tiere beider Kontrollen bis zum Ende um mehr als das Neunfache an. Die Experimentalansätze vermehrten sich hingegen lediglich um 50%. Die Abbildung 3.19 zeigt in gleicher Weise den Mittelwert-Kurvenverlauf beider Kontrollen und des Experimentalansatzes aller vier Versuchsreihen.

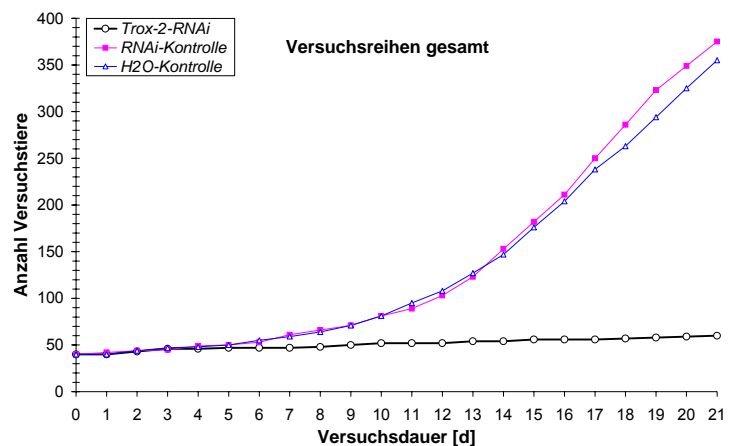


Abb. 3.19 Einfluss der *Trox-2*-Inhibition via RNA-Interferenz (RNAi) auf die Vermehrungsrate von *T. adhaerens* (Versuchsreihen gesamt). Aufgetragen ist die absolute Anzahl an Versuchstieren gegen die Versuchsdauer.

Tag	1. Versuchsreihe			2. Versuchsreihe			3. Versuchsreihe			4. Versuchsreihe		
	<i>Trox-2</i>	<i>Trox-2</i>	RNA-K.	<i>Trox-2</i>	<i>Trox-2</i>	RNA-K.	<i>Trox-2</i>	<i>Trox-2</i>	RNA-K.	<i>Trox-2</i>	<i>Trox-2</i>	RNA-K.
	vs. RNA-K.	vs. H ₂ O-K.	vs. H ₂ O-K.	vs. RNA-K.	vs. H ₂ O-K.	vs. H ₂ O-K.	vs. RNA-K.	vs. H ₂ O-K.	vs. H ₂ O-K.	vs. RNA-K.	vs. H ₂ O-K.	vs. H ₂ O-K.
0	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
1	0,8273	1,0000	0,8273	0,8273	1,0000	0,8273	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
2	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	0,8273	1,0000	0,8273	0,6698	0,8273	0,8348
3	1,0000	0,8348	0,8348	0,8348	1,0000	0,8348	0,8348	1,0000	0,8348	0,8348	1,0000	0,8348
4	0,8348	0,8348	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	0,8348	1,0000	0,8348	0,5485	0,8348	0,6949
5	0,8348	0,8348	1,0000	0,8415	0,8415	1,0000	0,6831	1,0000	0,6831	0,5485	0,8348	0,6949
6	0,6831	0,5485	0,8474	0,6949	0,6949	1,0000	0,8415	0,8474	0,6949	0,5485	0,6831	0,8474
7	0,3173	0,3173	1,0000	0,7055	0,7055	1,0000	0,8474	0,7055	0,8527	0,2568	0,5485	0,5900
8	0,3359	0,3359	1,0000	0,4652	0,5775	0,8618	0,7055	0,5775	0,8575	0,1936	0,3359	0,7316
9	0,2733	0,3532	0,8658	0,3692	0,3692	1,0000	0,5775	0,4652	0,8618	0,2087	0,2087	1,0000
10	0,1573	0,2087	0,8728	0,3035	0,3035	1,0000	0,3035	0,1824	0,7576	0,1172	0,1573	0,8759
11	0,0630	0,0863	0,8815	0,2367	0,1048	0,6547	0,1390	0,1048	0,8840	0,0863	0,0326	0,6617
12	0,0114	0,0863	0,3961	0,0423	0,0222	0,7893	0,0578	0,0423	0,8907	0,0863	0,0055	0,2673
13	0,0012	0,0326	0,2413	0,0094	0,0033	0,7180	0,0113	0,0222	0,7963	0,0516	0,0007	0,1275
14	0,0001	0,0067	0,1979	0,0009	0,0002	0,6547	0,0003	0,0113	0,2386	0,0046	0,0001	0,2040
15	0,0000	0,0003	0,2864	0,0001	0,0000	0,7557	0,0000	0,0011	0,2864	0,0003	0,0000	0,2436
16	0,0000	0,0000	0,2348	0,0000	0,0000	0,8488	0,0000	0,0002	0,3608	0,0000	0,0000	0,1202
17	0,0000	0,0000	0,1655	0,0000	0,0000	0,8586	0,0000	0,0000	0,5245	0,0000	0,0000	0,2812
18	0,0000	0,0000	0,2334	0,0000	0,0000	1,0000	0,0000	0,0000	0,1464	0,0000	0,0000	0,4895
19	0,0000	0,0000	0,1443	0,0000	0,0000	0,7503	0,0000	0,0000	0,0896	0,0000	0,0000	0,2593
20	0,0000	0,0000	0,1391	0,0000	0,0000	0,7022	0,0000	0,0000	0,2513	0,0000	0,0000	0,2457
21	0,0000	0,0000	0,2649	0,0000	0,0000	0,7656	0,0000	0,0000	0,5059	0,0000	0,0000	0,5575

Tab. 3.10 Irrtumswahrscheinlichkeiten für Unterschiede zwischen den Experimentalansätzen (*Trox-2*) und den Kontrollen (RNA-K. bzw. H₂O-K.) der vier dsRNA-Versuchsreihen. Signifikante Unterschiede ($p < 0.05$) sind farblich hervorgehoben.

3.1.3 *Trox-2*-INHIBITION MITTELS MORPHOLINO-ANTISENSE-OLIGOS

3.1.3.1 TRANSFEKTIONS-NACHWEIS DER MORPHOLINO-ANTISENSE-OLIGOS

Die in der Inhibitionsstudie verwendeten Morpholino-Antisense-Oligonukleotide (Gene Tools, LLC; 25 Basen) waren, um eine intrazelluläre, posttransfektionale Detektion zu ermöglichen, 3'-Carboxyfluoreszein markiert (Anregung: 488 nm, Emission: 525 nm).

Bei jedem der transfizierten Individuen konnte ein deutliches und weitestgehend homogenes Fluoreszenzsignal in allen Zellen detektiert werden (vgl. Abb. 3.20). Das Signal war jedoch schwächer als das der dsRNA-transfizierten Tiere. Die *Trox-2*-Antisense- und die Kontroll-Morpholino-Tiere zeigten keinerlei Unterschied in ihren Signalantworten. Die Intensität des Signals dieser Tiere war jedoch deutlich von der geringen Eigenfluoreszenz der nicht-transfizierten Meerwasser-Kontroll-Tiere unterscheidbar. Im Vergleich zu den dsRNA-transfizierten Tieren konnte noch eine sehr lange Zeit nach der Transfektion (vier Wochen) eine Signalantwort in den Versuchstieren detektiert werden. Erst nach ca. fünf Wochen unterschieden sich transfizierte und nicht-transfizierte Tiere bei der vergleichenden Analyse mit dem Fluoreszenz-Mikroskop nicht mehr.

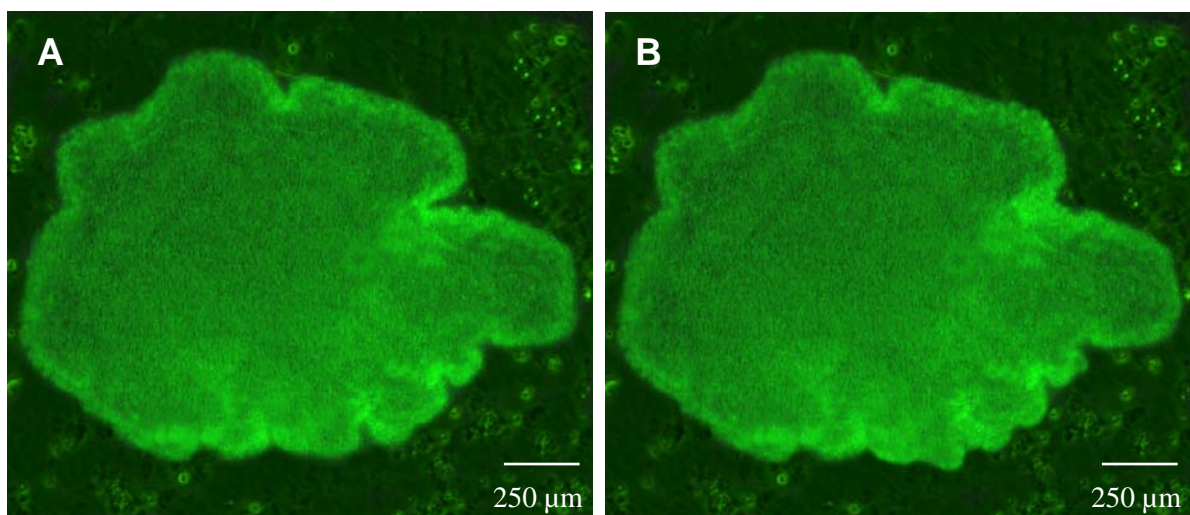


Abb. 3.20 A Fluoreszenzmikroskopische Ansicht von *Trichoplax adhaerens*, auf dem Substrat aufsitzend und 24 Stunden nach der Transfektion mit 3'-Carboxyfluoreszein markierten Morpholino-Antisense-Oligonukleotiden (Anregung: 488 nm, Emission: 525 nm). Die Zellen zeigen eine deutliche und weitestgehend homogene Signalantwort. **Abb. 3.20 B** zeigt denselben *Trichoplax* fünf Sekunden später, um die Vitalität des Tieres zu dokumentieren.

3.1.3.2 ERGEBNISSE DER MORPHOLINO-ANTISENSE-GEN-INHIBITION

Es wurde für das Homöoboxgen *Trox-2* eine Gen-Inhibition mittels Morpholino-Antisense-Oligos herbeigeführt. Die Dauer der Studie betrug pro Versuchsreihe (insgesamt sechs) jeweils 21 Tage. Als erste Kontrolle fungierten in den *Trox-2*-Versuchsreihen 10 Tiere, die mit einem Morpholino-Kontroll-Oligo transfiziert wurden. Als zweite Kontrolle diente ein Meerwasser-Ansatz mit 10 Individuen, bei denen keine Transfektion mit Morpholino-Oligonukleotiden vorgenommen wurde.

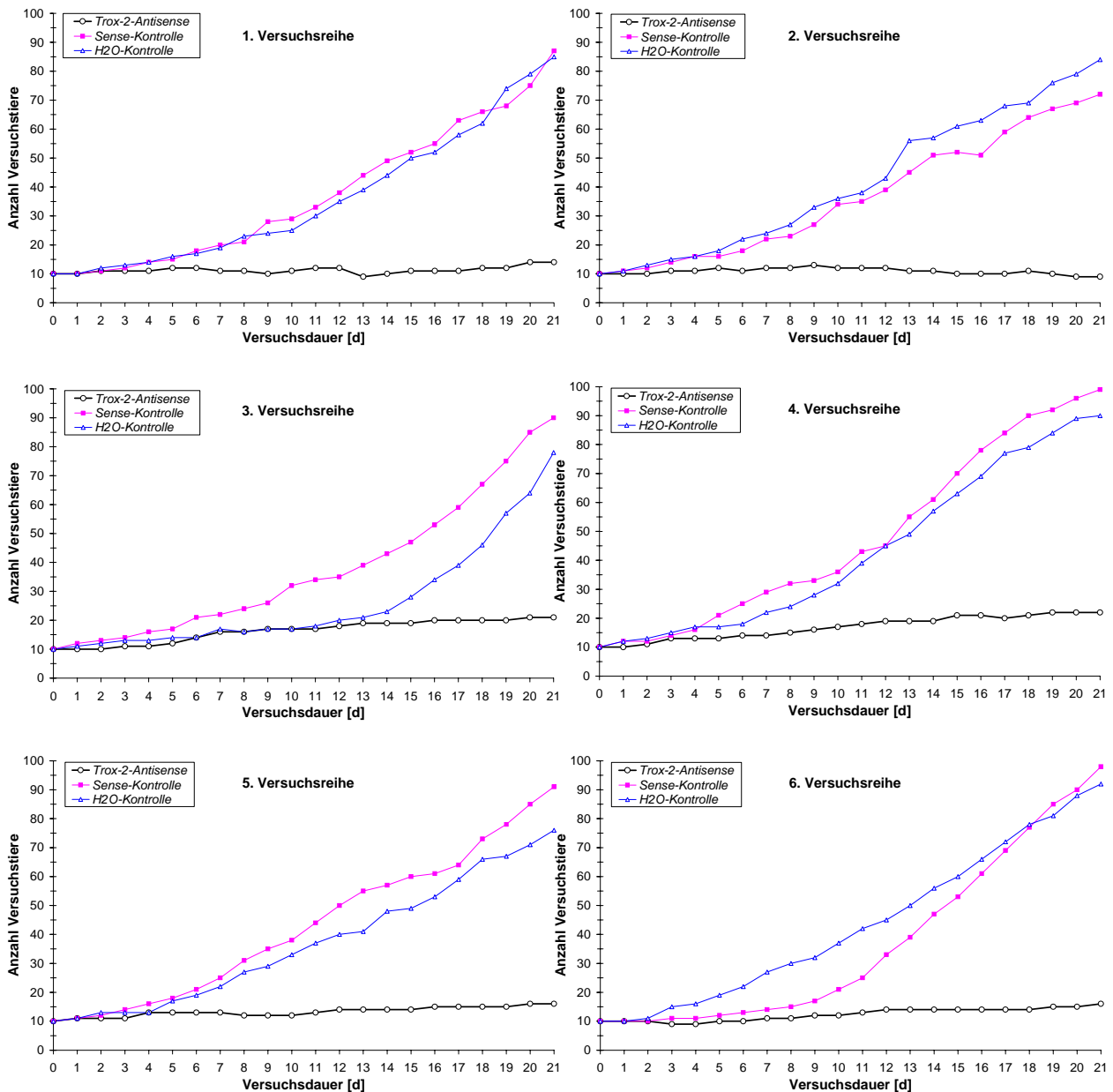


Abb. 3.21 Einfluss der *Trox-2*-Inhibition via Morpholino-Antisense-Oligos auf die Vermehrungsrate von *T. adhaerens*. Aufgetragen ist die absolute Anzahl an Versuchstieren gegen die Versuchsdauer.

Die sechs *Trox-2*-Versuchsreihen zeigten vom Ergebnis her die gleichen Tendenzen, sowohl untereinander als auch im Vergleich zu denen der dsRNA-

Studie. In allen sechs Reihen unterschieden sich die beiden Kontrollansätze signifikant vom Experimentalansatz (χ^2 -Anpassungstest, $p < 0,05$; vgl. Tab. 3.11 und Abb. 3.21). Die sechs *Trox-2*-Experimentalansätze wiesen nach Beendigung der Studie nie mehr als 22, im Mittel nur 16,3 Tiere auf. Der Mittelwert der Morpholino-Kontrollen lag mit über 89 Tieren pro Ansatz knapp fünfeinhalbmal höher als der der *Trox-2*-Experimentalansätze. Die niedrigste Anzahl an Individuen (72) der Morpholino-Kontrollen wies nach 21 Tagen Versuchsdauer die 2. Versuchsreihe auf, die höchste Zahl die 4. Versuchsreihe (99).

Bei den Meerwasserkontrollen lag die Zahl der Tiere nach Beendigung der Studie im Mittel bei über 84, mindestens bei 76 und maximal bei 97. Der Mittelwert war, ähnlich den Oligo-Kontrollen, mehr als fünfmal höher als der der Experimentalansätze. Im zeitlichen Verlauf der Untersuchung beschrieb die Versuchstierzahl der Kontrollansätze, gleich der RNAi-*Knock-Down*-Studie, einen annähernd exponentiellen Anstieg, die der Experimentalansätze hingegen stieg linear und war nach Beendigung der Versuche nur etwa um den Faktor 1,63 erhöht (vgl. Abb. 3.22).

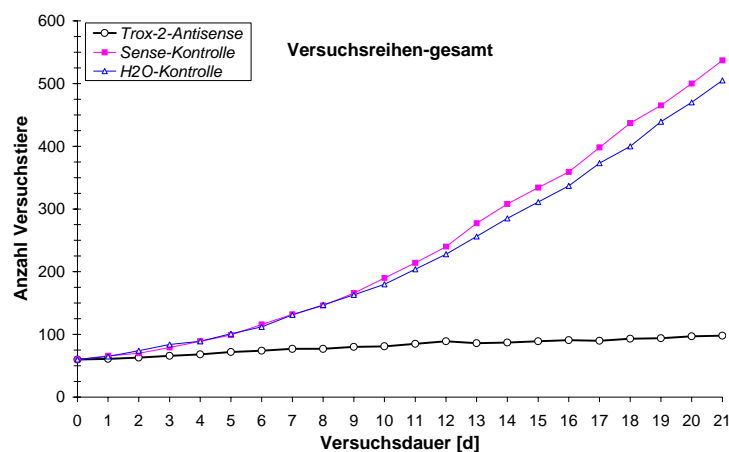


Abb. 3.22 Einfluss der *Trox-2*-Inhibition via Morpholino-Antisense-Oligos auf die Vermehrungsrate von *T. adhaerens* (Versuchsreihen gesamt). Aufgetragen ist die absolute Anzahl an Versuchstieren gegen die Versuchsdauer.

In der Zusammenfassung der sechs Versuchsreihen werden die gleichen Tendenzen wie in den Einzelversuchsreihen und der RNAi-*Knock-Down*-Studie offensichtlich (vgl. Abb. 3.22). Bei einem Stichprobenumfang von insgesamt $n = 60$ Tieren zu Beginn der Studie, stieg die Anzahl der Tiere beider Kontrollen bis zum Ende um mehr als das Achtfache an. Die Experimentalansätze vermehrten sich hingegen lediglich um ca. 63%. Die Abbildung 3.22 zeigt in gleicher Weise den Mittelwert-Kurvenverlauf beider Kontrollen und des Experimentalansatzes aller sechs Versuchsreihen.

Tag	1. Versuchsreihe			2. Versuchsreihe			3. Versuchsreihe			4. Versuchsreihe			5. Versuchsreihe			6. Versuchsreihe			
	Trox-2	Trox-2	Sense	Trox-2	Trox-2	Sense	Trox-2	Trox-2	Sense	Trox-2	Trox-2	Sense	Trox-2	Trox-2	Sense	Trox-2	Trox-2	Sense	
	VS	VS	VS	VS	VS	VS	VS	VS	VS	VS	VS	VS	VS	VS	VS	VS	VS	VS	
	Sense	H2O-K.	H2O-K.	Sense	H2O-K.	H2O-K.	Sense	H2O-K.	H2O-K.	Sense	H2O-K.	H2O-K.	Sense	H2O-K.	H2O-K.	Sense	H2O-K.	H2O-K.	
0	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
1	1,0000	1,0000	1,0000	0,8273	0,8273	1,0000	0,6698	0,8273	0,8348	0,6698	0,6698	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
2	1,0000	0,8348	0,8348	0,6698	0,5316	0,8415	0,5316	0,6698	0,8415	0,8348	0,6831	0,8415	0,8348	0,6831	0,8415	1,0000	0,8273	0,8273	0,8273
3	0,8348	0,6831	0,8415	0,5485	0,4328	0,8527	0,5485	0,6831	0,8474	0,8474	0,7055	0,8527	0,5485	0,6831	0,8474	0,6547	0,2207	0,4328	0,4328
4	0,5485	0,5485	1,0000	0,3359	0,3359	1,0000	0,3359	0,6831	0,5775	0,5775	0,4652	0,8618	0,5775	1,0000	0,5775	0,6547	0,1615	0,3359	0,3359
5	0,5637	0,4497	0,8575	0,4497	0,2733	0,7316	0,3532	0,6949	0,5900	0,1701	0,4652	0,5164	0,3692	0,4652	0,8658	0,6698	0,0947	0,2087	0,2087
6	0,2733	0,3532	0,8658	0,1936	0,0555	0,5271	0,2367	1,0000	0,2367	0,0782	0,4795	0,2858	0,1701	0,2888	0,7518	0,5316	0,0339	0,1282	0,1282
7	0,1060	0,1441	0,8728	0,0863	0,0455	0,7681	0,3304	0,8618	0,4233	0,0222	0,1824	0,3270	0,0516	0,1282	0,6617	0,5485	0,0094	0,0423	0,0423
8	0,0771	0,0396	0,7630	0,0630	0,0163	0,5716	0,2059	1,0000	0,2059	0,0131	0,1495	0,2850	0,0038	0,0163	0,5994	0,4328	0,0030	0,0253	0,0253
9	0,0035	0,0164	0,5791	0,0269	0,0032	0,4386	0,1699	1,0000	0,1699	0,0152	0,0704	0,5221	0,0008	0,0079	0,4533	0,3532	0,0026	0,0321	0,0321
10	0,0044	0,0196	0,5862	0,0012	0,0005	0,8111	0,0321	1,0000	0,0321	0,0091	0,0321	0,6276	0,0002	0,0017	0,5529	0,1172	0,0004	0,0356	0,0356
11	0,0017	0,0055	0,7055	0,0008	0,0002	0,7255	0,0173	0,8658	0,0265	0,0014	0,0054	0,6587	0,0000	0,0007	0,4367	0,0516	0,0001	0,0378	0,0378
12	0,0002	0,0008	0,7255	0,0002	0,0000	0,6587	0,0195	0,7456	0,0431	0,0012	0,0012	1,0000	0,0000	0,0004	0,2918	0,0056	0,0001	0,1742	0,1742
13	0,0000	0,0000	0,5831	0,0000	0,0000	0,2737	0,0086	0,7518	0,0201	0,0000	0,0003	0,5563	0,0000	0,0003	0,1530	0,0006	0,0000	0,2436	0,2436
14	0,0000	0,0000	0,6041	0,0000	0,0000	0,5637	0,0023	0,5371	0,0138	0,0000	0,0000	0,7127	0,0000	0,0000	0,3798	0,0000	0,0000	0,3752	0,3752
15	0,0000	0,0000	0,8430	0,0000	0,0000	0,3972	0,0006	0,1893	0,0282	0,0000	0,0000	0,5439	0,0000	0,0000	0,2921	0,0000	0,0000	0,5102	0,5102
16	0,0000	0,0000	0,7718	0,0000	0,0000	0,2611	0,0001	0,0568	0,0416	0,0000	0,0000	0,4579	0,0000	0,0000	0,4537	0,0000	0,0000	0,6573	0,6573
17	0,0000	0,0000	0,6494	0,0000	0,0000	0,4245	0,0000	0,0134	0,0434	0,0000	0,0000	0,5812	0,0000	0,0000	0,6521	0,0000	0,0000	0,8005	0,8005
18	0,0000	0,0000	0,7237	0,0000	0,0000	0,6646	0,0000	0,0014	0,0482	0,0000	0,0000	0,3975	0,0000	0,0000	0,5527	0,0000	0,0000	0,9360	0,9360
19	0,0000	0,0000	0,6146	0,0000	0,0000	0,4517	0,0000	0,0000	0,1172	0,0000	0,0000	0,5465	0,0000	0,0000	0,3610	0,0000	0,0000	0,7562	0,7562
20	0,0000	0,0000	0,7472	0,0000	0,0000	0,4111	0,0000	0,0000	0,0854	0,0000	0,0000	0,6068	0,0000	0,0000	0,2623	0,0000	0,0000	0,8808	0,8808
21	0,0000	0,0000	0,8788	0,0000	0,0000	0,3367	0,0000	0,0000	0,3545	0,0000	0,0000	0,5127	0,0000	0,0000	0,2457	0,0000	0,0000	0,6634	0,6634

Tab. 3.11 Irrtumswahrscheinlichkeiten für Unterschiede zwischen den Experimentalansätzen (Trox-2) und den Kontrollen (Sense bzw. H₂O-K.) der sechs Morpholino-Versuchsreihen. Signifikante Unterschiede (p < 0.05) sind farblich hervorgehoben.

3.1.4 *Trox-2*-INHIBITION MITTELS ANTISENSE-DNA-OLIGOS

Abweichend von der dsRNA- bzw. Morpholino-Studie wurden die Antisense-Oligodesoxyribonukleotide täglich dem Meerwassermedium hinzugegeben, und es wurde die Wirkung verschiedener Oligo-Endkonzentrationen im Medium untersucht (1 μ M, 2 μ M, 5 μ M, 10 μ M und 20 μ M). Als Kontrollen dienten Oligonukleotide mit zufälliger Sequenz. Zusätzlich wurde, gleich den dsRNA- bzw. den Morpholino-Untersuchungen, eine Meerwasser-Kontrolle als Referenz benutzt. Die Dauer einer Versuchsreihe (insgesamt 8) betrug 21 Tage; jeder Versuchsansatz (3 pro Versuchsreihe) umfasste zu Beginn 10 Tiere.

3.1.4.1 ERGEBNISSE DER ANTISENSE-GEN-INHIBITION

Sowohl in der ersten als auch in der zweiten *Trox-2*-Versuchsreihe (Oligo-Konzentration: 1 μ M bzw. 2 μ M) zeigten die Experimentalansätze keine signifikanten Unterschiede zu den jeweiligen Kontrollen (vgl. Tab. 3.13). Die Anzahl der Tiere stieg in allen Ansätzen stetig und gleichförmig an. Nach Beendigung der Studie zeigten die drei Versuchsansätze beider Versuchsreihen eine vergleichbare Tierzahl (vgl. Abb. 3.23). In der ersten Versuchsreihe lag die Tierzahl des Experimentalansatzes (66) sogar höher als die der Kontrollen (54 bzw. 57).

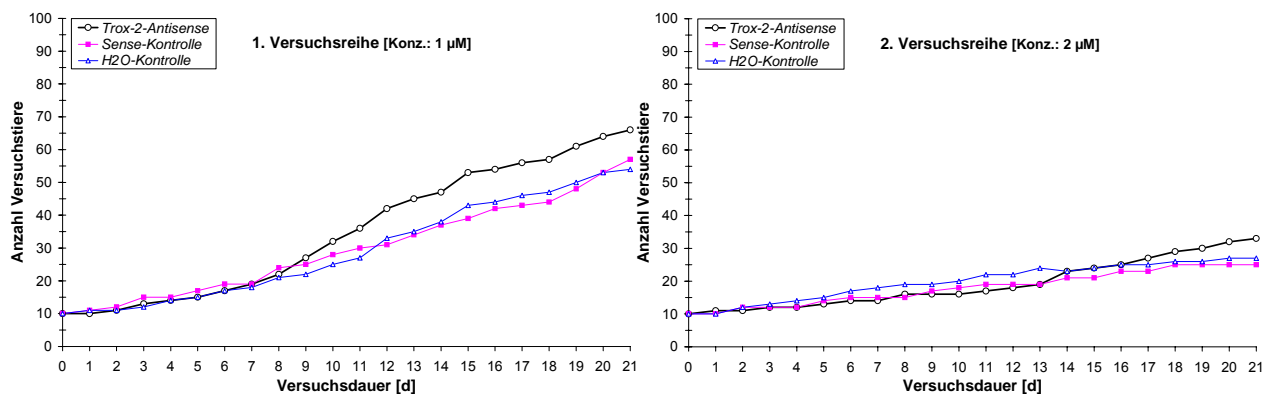


Abb. 3.23 Einfluss der *Trox-2*-Inhibition via Antisense-DNA-Oligos auf die Vermehrungsrate von *T. adhaerens*. Aufgetragen ist die absolute Anzahl an Versuchstieren gegen die Versuchsdauer.

In der dritten Versuchsreihe wurde die Wirkung einer fünf mikromolaren Oligo-Konzentration untersucht. Hierbei lag die Anzahl der *Trox-2*-geninhibierten Tiere (32) nach Beendigung der Studie deutlich unter der der Sense-Kontrolle (47) bzw. der Meerwasserkontrolle (53; vgl. Abb. 3.24). Der *Trox-2*-Experimentalansatz unterschied sich nach 21 Tagen Versuchsdauer signifikant von der Seewasserkontrolle, nicht aber von der Sense-Kontrolle (χ^2 -Anpassungstest; vgl. Tab. 3.13).

Weiteren Aufschluss über den Zusammenhang von Konzentration und Inhibitions-Effizienz der DNA-Oligos ergab sich aus den folgenden Untersuchungen. In der vierten und fünften Versuchsreihe wurde die Oligo-Konzentration auf 10 µM erhöht. In diesen beiden Versuchsreihen unterschieden sich die Kontrollansätze spätestens am zwölften Tag der Untersuchungen signifikant vom Experimentalansatz (vgl. Tab. 3.13). Vergleicht man die Ergebnisse dieser Studie mit denen der dsRNA- bzw. der Morpholino-Untersuchungen werden erhebliche Korrelationen deutlich. In den Experimentalansätzen lag die Anzahl der Individuen nach 21 Tagen Versuchsdauer, gleich der dsRNA- bzw. Morpholino-Studie, um nur ca. 60% erhöht. Die Versuchstierzahl der Kontrollen hingegen hatte sich im Mittel ($\bar{x} = 53$) mehr als verfünffacht (vgl. Abb. 3.25). Sie lag aber trotzdem noch mehr als $\frac{1}{3}$ unter den Werten der dsRNA- bzw. Morpholino-Studien.

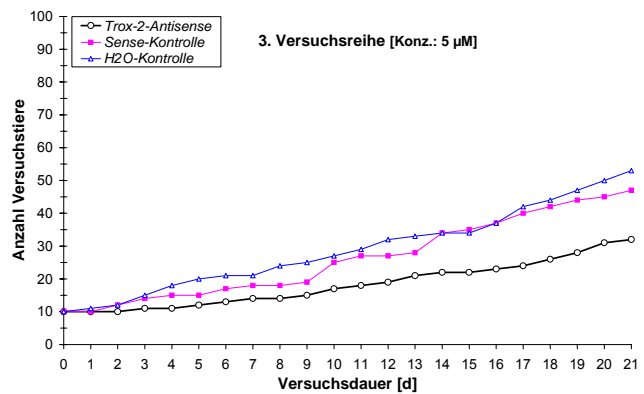


Abb. 3.24 Einfluss der *Trox-2*-Inhibition via Antisense-DNA-Oligos auf die Vermehrungsrate von *T. adhaerens* (dritte Versuchsreihe). Aufgetragen ist die absolute Anzahl an Versuchstieren gegen die Versuchsdauer.

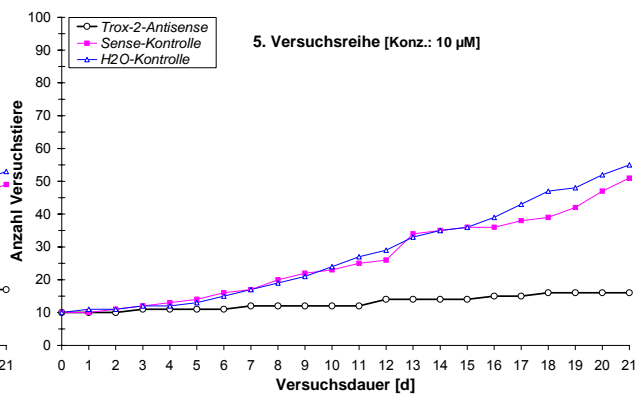
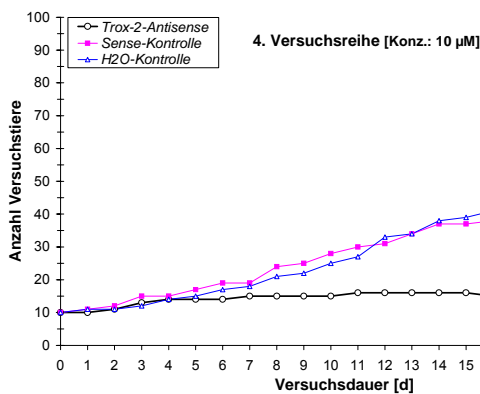


Abb. 3.25 Einfluss der *Trox-2*-Inhibition via Antisense-DNA-Oligos auf die Vermehrungsrate von *T. adhaerens* in der vierten und fünften Versuchsreihe. Aufgetragen ist die absolute Anzahl an Versuchstieren gegen die Versuchsdauer.

In drei weiteren Versuchsreihen wurde untersucht, welche Wirkung eine 20 mikromolare Endkonzentration an *Trox-2*-Antisense-Oligonukleotiden auf die Entwicklung von *Trichoplax adhaerens* nimmt. Eine möglicherweise zu erwartende weitere Reduktion der Fortpflanzungsrate konnte nicht bestätigt werden, stattdessen verendeten alle Tiere der drei Experimentalansätze innerhalb von maximal zehn Tagen. In allen Versuchsreihen unterschieden sich Experimentalansatz und Kontrollen spätestens am dritten Tag nach Versuchsbeginn signifikant

voneinander (vgl. Tab. 3.13). Die Annahme, dass eine mögliche Toxizität des höher konzentrierten Oligonukleotids für das Absterben der Tiere verantwortlich wäre, kann aufgrund der Kontrollergebnisse ausgeschlossen werden. Beide, sowohl die Sense- als auch die Meerwasserkontrolle aller drei Versuchsreihen, beschrieben einen normalen Anstieg der Versuchstierzahl.

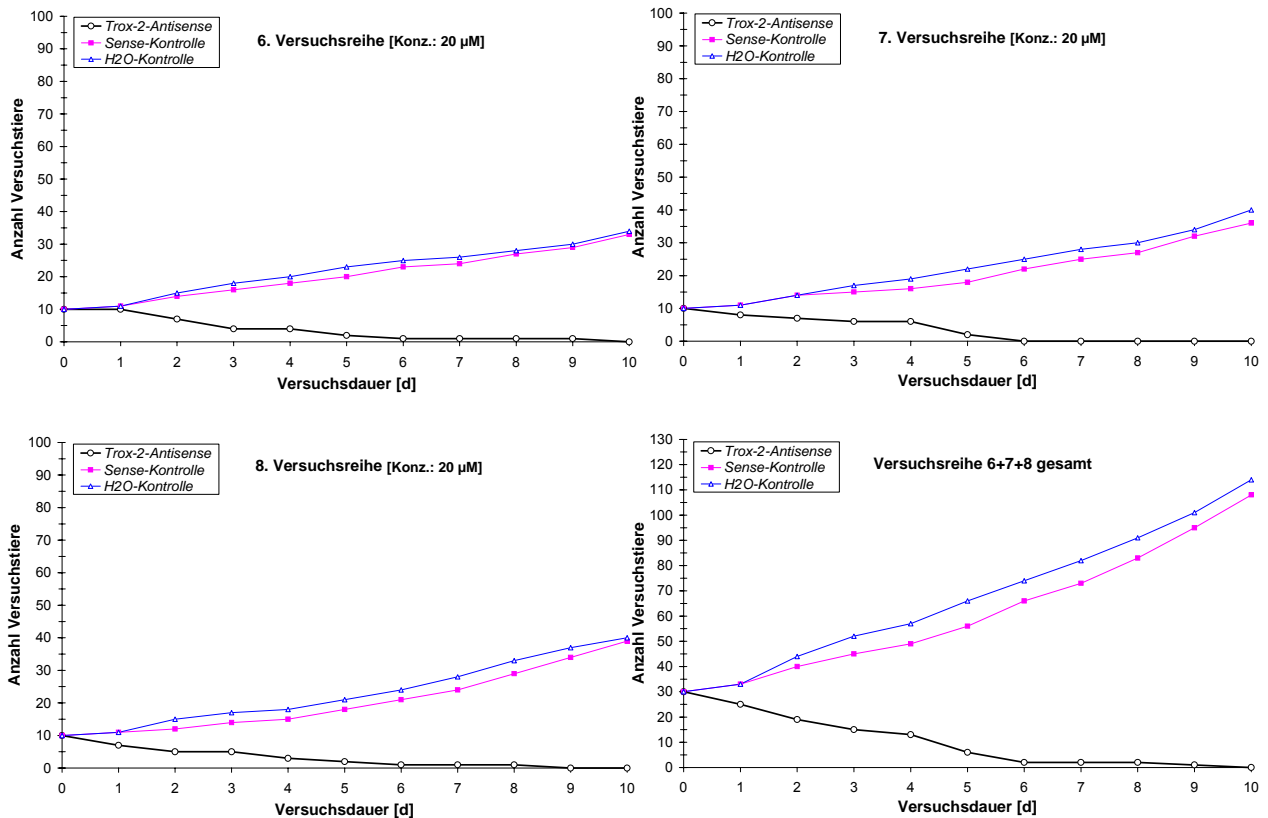


Abb. 3.26 Einfluss der *Trox-2*-Inhibition via Antisense-DNA-Oligos auf die Vermehrungsrate von *T. adhaerens* in der sechsten, siebten und achten Versuchsreihe sowie eine Zusammenfassung der drei Versuchsreihen. Aufgetragen ist die absolute Anzahl an Versuchstieren gegen die Versuchsdauer.

Bei den Sense-Kontrollen lag die Anzahl der Tiere nach zehn Tagen im Mittel bei 36, bei den Meerwasserkontrollen bei 38 (vgl. Abb. 3.26). Diese Werte entsprachen den analogen Kontrollwerten der dsRNA- bzw. der Morpholino-Studie zum gleichen Zeitpunkt der Untersuchungen.

Tag	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
rS	-0,671	-0,872	-0,821	-0,7	-0,9	-1	-0,975	-1	-1	-0,9	-0,9
p	0,215	0,054	0,089	0,188	0,037	0,000	0,005	0,000	0,000	0,037	0,037
Tag	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	
rS	-0,9	-0,9	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	
p	0,037	0,037	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	

Tab. 3.12 Korrelationen zwischen den 5 Konzentrationen (1 μ M, 2 μ M, 5 μ M, 10 μ M und 20 μ M) der *Trox-2*-antisense-Experimentalansätze und der Anzahl der Versuchstiere am jeweiligen Versuchstag (Wertepaare= 5). Die Konzentration der Antisense-Oligonukleotide und die Anzahl der Tiere in den Experimentalansätzen waren ab dem achten Versuchstag signifikant negativ korreliert. Abkürzungen: rS= Rangkorrelationskoeffizient von SPEARMAN, p= Irrtumswahrscheinlichkeit.

Zwischen der Konzentration der Antisense-Oligonukleotide und der Anzahl der Tiere in den Experimentalansätzen bestand ab dem achten Versuchstag eine signifikant negative Korrelation (Korrelationsanalyse von SPEARMAN; vgl. Tab. 3.12).

	1. Versuchsreihe: 1 µM			2. Versuchsreihe: 2 µM			3. Versuchsreihe: 5 µM			4. Versuchsreihe: 10 µM		
Tag	Trox-2-as vs Sense	Trox-2-as vs H2O-K.	Sense vs H2O-K.	Trox-2-as vs Sense	Trox-2-as vs H2O-K.	Sense vs H2O-K.	Trox-2-as vs Sense	Trox-2-as vs H2O-K.	Sense vs H2O-K.	Trox-2-as vs Sense	Trox-2-as vs H2O-K.	Sense vs H2O-K.
0	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
1	0,8273	0,8273	1,0000	0,8273	0,8273	1,0000	1,0000	0,8273	0,8273	0,8273	0,8273	1,0000
2	0,8348	1,0000	0,8348	0,8348	0,8348	1,0000	0,6698	0,6698	1,0000	0,8348	1,0000	0,8348
3	0,7055	0,8415	0,5637	1,0000	0,8415	0,8415	0,5485	0,4328	0,8527	0,7055	0,8415	0,5637
4	0,8527	1,0000	0,8527	1,0000	0,6949	0,6949	0,4328	0,1936	0,6015	0,8527	1,0000	0,8527
5	0,7237	1,0000	0,7237	0,8474	0,7055	0,8527	0,5637	0,1573	0,3980	0,5900	0,8527	0,7237
6	0,7389	1,0000	0,7389	0,8527	0,5900	0,7237	0,4652	0,1701	0,5164	0,3841	0,5900	0,7389
7	1,0000	0,8694	0,8694	0,8527	0,4795	0,6015	0,4795	0,2367	0,6310	0,4927	0,6015	0,8694
8	0,7681	0,8788	0,6547	0,8575	0,6121	0,4927	0,4795	0,1048	0,3545	0,1495	0,3173	0,6547
9	0,7815	0,4751	0,6617	0,8618	0,6121	0,7389	0,4927	0,1138	0,3657	0,1138	0,2498	0,6617
10	0,6056	0,3538	0,6803	0,7316	0,5050	0,7456	0,2170	0,1317	0,7815	0,0474	0,1138	0,6803
11	0,4602	0,2568	0,6911	0,7389	0,4233	0,6394	0,1797	0,1086	0,7893	0,0390	0,0934	0,6911
12	0,1979	0,2987	0,8026	0,8694	0,5271	0,6394	0,2382	0,0687	0,5151	0,0287	0,0152	0,8026
13	0,2159	0,2636	0,9042	1,0000	0,4458	0,4458	0,3173	0,1025	0,5221	0,0109	0,0109	1,0000
14	0,2752	0,3290	0,9081	0,7630	1,0000	0,7630	0,1088	0,1088	1,0000	0,0039	0,0028	0,9081
15	0,1444	0,3074	0,6587	0,6547	1,0000	0,6547	0,0851	0,1088	0,9042	0,0039	0,0019	0,8185
16	0,2207	0,3124	0,8292	0,7728	1,0000	0,7728	0,0707	0,0707	1,0000	0,0016	0,0005	0,7357
17	0,1914	0,3221	0,7505	0,5716	0,7815	0,7728	0,0455	0,0267	0,8252	0,0005	0,0001	0,5919
18	0,1958	0,3268	0,7532	0,5862	0,6858	0,8886	0,0523	0,0314	0,8292	0,0003	0,0001	0,7532
19	0,2131	0,2965	0,8399	0,5002	0,5930	0,8886	0,0593	0,0282	0,7532	0,0004	0,0001	0,7557
20	0,3092	0,3092	1,0000	0,3538	0,5151	0,7815	0,1083	0,0348	0,6080	0,0003	0,0001	0,6831
21	0,4171	0,2733	0,7758	0,2935	0,4386	0,7815	0,0915	0,0227	0,5485	0,0001	0,0000	0,6921
	5. Versuchsreihe: 10 µM			6. Versuchsreihe: 20 µM			7. Versuchsreihe: 20 µM			8. Versuchsreihe: 20 µM		
Tag	Trox-2-as vs Sense	Trox-2-as vs H2O-K.	Sense vs H2O-K.	Trox-2-as vs Sense	Trox-2-as vs H2O-K.	Sense vs H2O-K.	Trox-2-as vs Sense	Trox-2-as vs H2O-K.	Sense vs H2O-K.	Trox-2-as vs Sense	Trox-2-as vs H2O-K.	Sense vs H2O-K.
0	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
1	1,0000	0,8273	0,8273	0,8273	0,8273	1,0000	0,4913	0,4913	1,0000	0,3458	0,3458	1,0000
2	0,8273	0,8273	1,0000	0,1266	0,0881	0,8527	0,1266	0,1266	1,0000	0,0896	0,0253	0,5637
3	0,8348	0,8348	1,0000	0,0073	0,0028	0,7316	0,0495	0,0218	0,7237	0,0389	0,0105	0,5900
4	0,6831	0,8348	0,8415	0,0028	0,0011	0,7456	0,0330	0,0093	0,6121	0,0047	0,0011	0,6015
5	0,5485	0,6831	0,8474	0,0001	0,0000	0,6473	0,0003	0,0000	0,5271	0,0003	0,0001	0,6310
6	0,3359	0,4328	0,8575	0,0000	0,0000	0,7728	0,0000	0,0000	0,6617	0,0000	0,0000	0,6547
7	0,3532	0,3532	1,0000	0,0000	0,0000	0,7773	0,0000	0,0000	0,6803	0,0000	0,0000	0,5791
8	0,1573	0,2087	0,8728	0,0000	0,0000	0,8927	0,0000	0,0000	0,6911	0,0000	0,0000	0,6115
9	0,0863	0,1172	0,8788	0,0000	0,0000	0,8964	0,0000	0,0000	0,8055	0,0000	0,0000	0,7218
10	0,0630	0,0455	0,8840	0,0000	0,0000	0,9028	0,0000	0,0000	0,6464	0,0000	0,0000	0,9104
11	0,0326	0,0163	0,7815									
12	0,0578	0,0222	0,6858									
13	0,0039	0,0056	0,9028									
14	0,0027	0,0027	1,0000									
15	0,0019	0,0019	1,0000									
16	0,0033	0,0011	0,7290									
17	0,0016	0,0002	0,5785									
18	0,0019	0,0001	0,3883									
19	0,0006	0,0001	0,5271									
20	0,0001	0,0000	0,6153									
21	0,0000	0,0000	0,6976									

Tab. 3.13 Irrtumswahrscheinlichkeiten für Unterschiede zwischen den Experimentalansätzen (Trox-2-as) und den Kontrollen (Sense bzw. H₂O-K.) der acht Antisense-DNA-Oligo-Versuchsreihen. Signifikante Unterschiede (p < 0.05) sind farblich hervorgehoben.

3.2 *ELEUTHERIA DICHOTOMA*

Für *Eleutheria dichotoma* wurde die Expression von fünf Hox-Genen (*Cnox-1* – *Cnox-5*) mittels *whole mount in situ* Hybridisierung untersucht. Die Signalanalyse erfolgte alternativ durch NBT/X-Phosphat- oder Fluoreszenz-Detektion. Es wurden für alle fünf Gene Nachweise in Medusen, adulten Polypen, Primärpolypen und in Planularlarven geführt. Des Weiteren wurden diese Gene 1.) mittels dsRNA und 2.) mittels Morpholino-Antisense-Oligonukleotiden inhibiert.

3.2.1 UNTERSUCHUNGEN AM *CNOX-1*-GEN

3.2.1.1 EXPRESSIONSSTUDIEN

Distinkte Signale wurden für beide Detektions-Methoden nur mit der Antisense-Sonde, nicht jedoch mit der Sense-Sonde (Kontrolle) gefunden. Es zeigten sich genspezifisch und interindividuell gleiche Färbe-Ergebnisse, die Hintergrundfärbung war gering und immer gut von der Signalantwort unterscheidbar. Der Expressionsnachweis für das *Cnox-1*-Gen war problemlos reproduzierbar und in ca. 80% der untersuchten Tiere vorhanden (n> 100). Positive Signale des *Cnox-1*-Gens konnten nur in der Medusengeneration detektiert werden. Intensive Bemühungen diese auch in den anderen morphologischen Stadien des Lebenszyklus von *E. dichotoma* nachzuweisen, blieben ohne Erfolg. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass das *Cnox-1*-Gen nur in der Medusengeneration exprimiert wird.

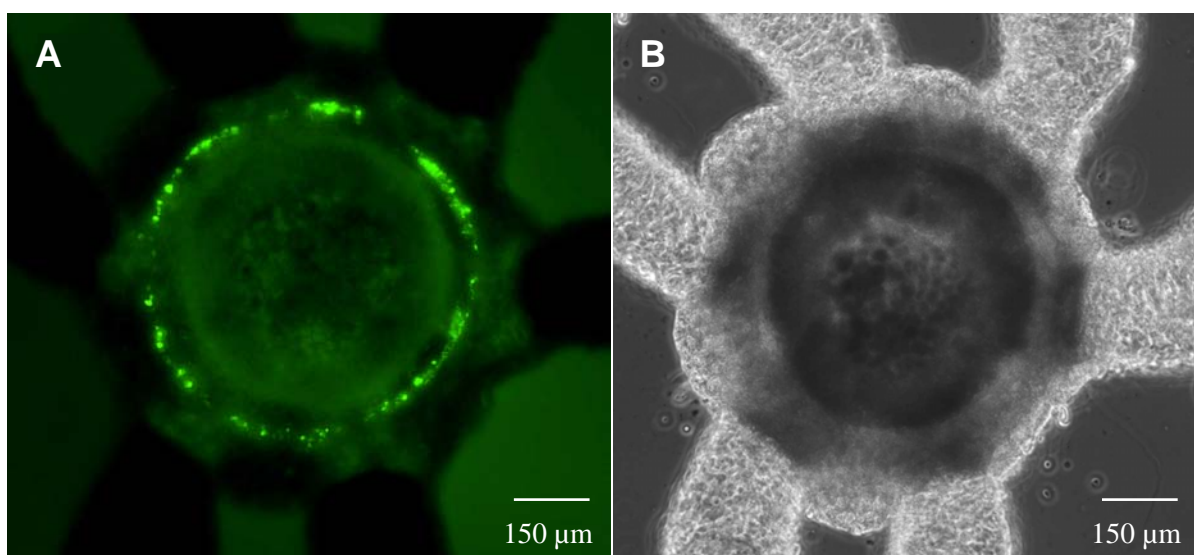


Abb. 3.27 Expression des *Cnox-1*-Gens bei *Eleutheria dichotoma* detektiert mittels Fluoreszein markierter Sonden. Die Expression des Gens beschreibt eine sehr distinkte Ringform an der oralen Unterseite der Meduse (A). In der Durchlichtaufnahme des gleichen Tieres (B), lassen sich die Zellen mit positiver Signalantwort im Hinblick auf die gesamte Körperorganisation besser einordnen; Oral-Ansichten.

Das *Cnox-1*-Gen wird in ektodermalen Zellen in einer sehr distinkten Ringform am Velumrand exprimiert. Dieser Expressionsring ist nur 4-6 Zellen breit und relativ peripher an der oralen Unterseite der Meduse positioniert (vgl. Abb. 3.27 und Abb. 3.28). Die Zellen mit positiver Signalantwort sind im Vergleich zu den anderen Zellen des Tieres, vor allem denen des Entoderms, von relativ kleiner Natur. Sektionales Fokussieren und die Analyse von histologischen Schnitten ergab, dass es sich bei diesen Zellen höchstwahrscheinlich um interstitielle Zellen und unterschiedlich weit entwickelte Reserve-Cnidoblasten handelt, welche im oralen Nesselring lokalisiert liegen (vgl. Abb. 3.29 und Abb. 3.30).

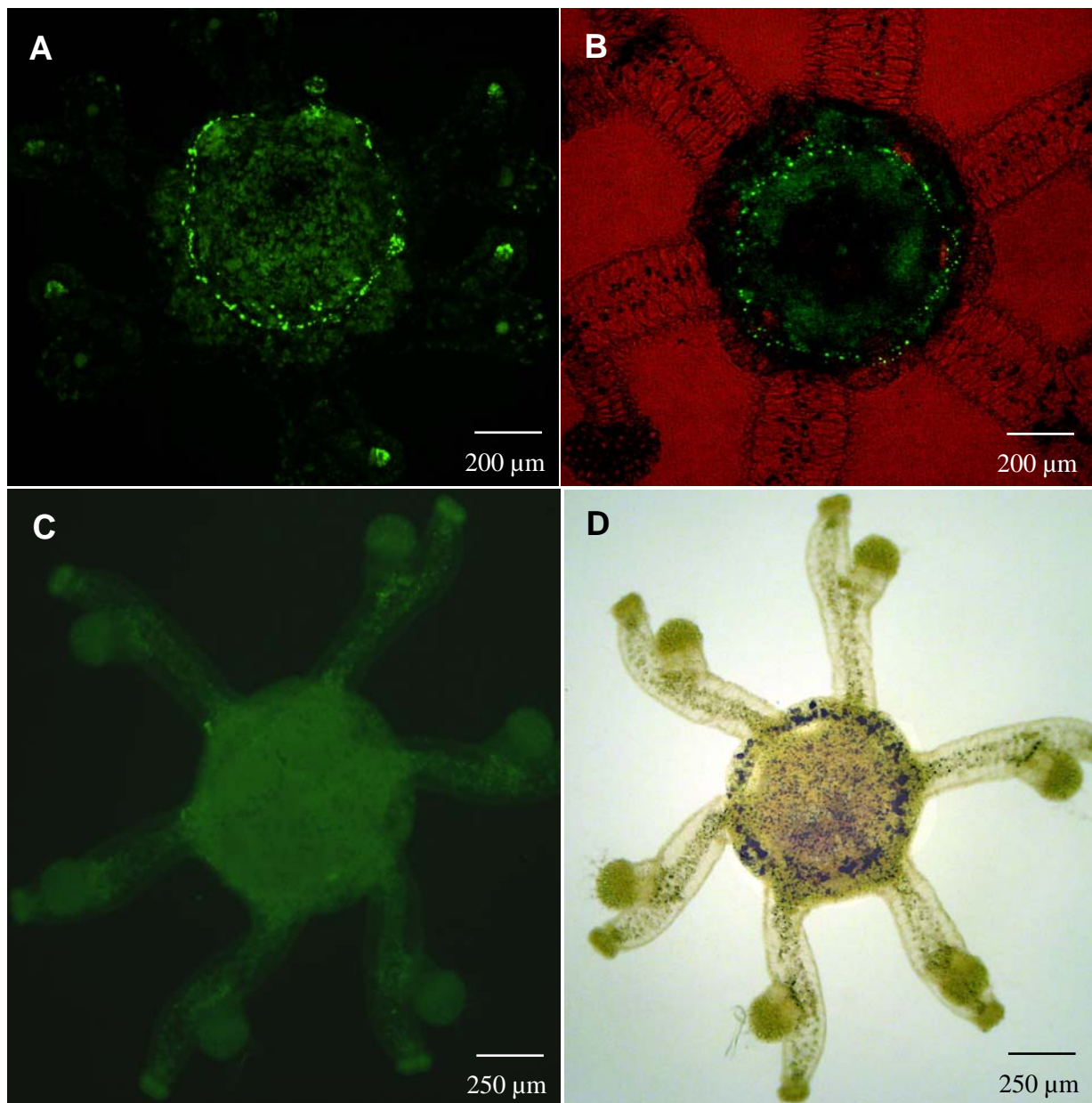


Abb. 3.28 Expression des *Cnox-1*-Gens bei *Eleutheria dichotoma* detektiert mittels Fluoreszein markierter Sonden (**A+B**) bzw. NBT-X-Phosphat-Färbung (**D**). Die Sense-Kontrolle der Fluoreszein *in situ* Hybridisierung zeigt keinerlei Signal (**C**); Alle Ansichten von oral.

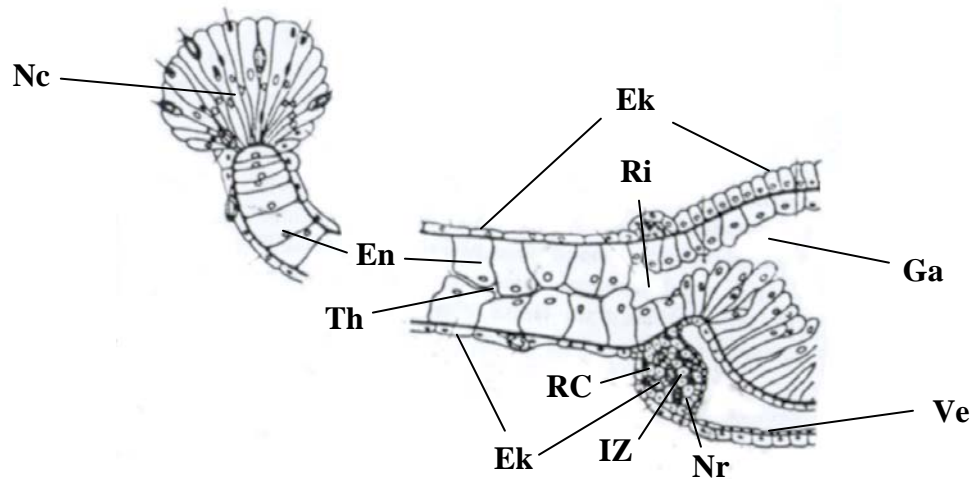


Abb. 3.29 Schematischer Längsschnitt durch den Radius einer *Eleutheria*-Meduse (Mittelstück und Schreitast des Tentakels fehlen). Abkürzungen betreffen: Ek= Ektoderm; En= Entoderm; Ga= Gastralraum; IZ= Interstitielle Zellen; Nc= Nesselzellencluster; Nr= Nesselring; RC= Reserve Cnidoblasten; Ri= Ringkanal; Th= Tentakelhohlraum; Ve= Velum. Modifiziert nach HAUENSCHILD (1957).

Der ektodermale Nesselring befindet sich am proximalen Tentakelansatz und ist kreisförmig um die Körperbasis, radial und interradial am Velumrand angeordnet (LENGERICH, 1923; NAUMOV, 1967). Er wird gegen das Entoderm des Ringkanals durch die sich vom Tentakel zum Manubrium ziehende Stützlamelle begrenzt (HAUENSCHILD, 1957b; vgl. Abb. 3.29). Die Zellen des Nesselrings sind omnipotent und differenzieren sich in erster Linie zu Penetranten und Volventen (Nesselzellen). Diese wandern entlang des Tentakektoderms zu den distalen Nesselzellenclustern, wo sie die verbrauchten Vorgängerzellen ersetzen. Die I-Zellen vermögen es aber auch, sich in jedweden anderen Zelltyp zu differenzieren, wenn dies im Zuge von reoperativen Regenerations- und Neubildungsprozessen erforderlich ist.

Neben den undifferenzierten Interstitiellen-Zellen und den Cnidoblasten liegen im Nesselring eine große Anzahl noch unreifer Nematocyten in allen möglichen Entwicklungsstadien lokalisiert (vgl. Abb. 3.29). Die histologischen Längsschnitte zeigen, dass die Signalantwort keineswegs aus allen Zellen des Nesselrings

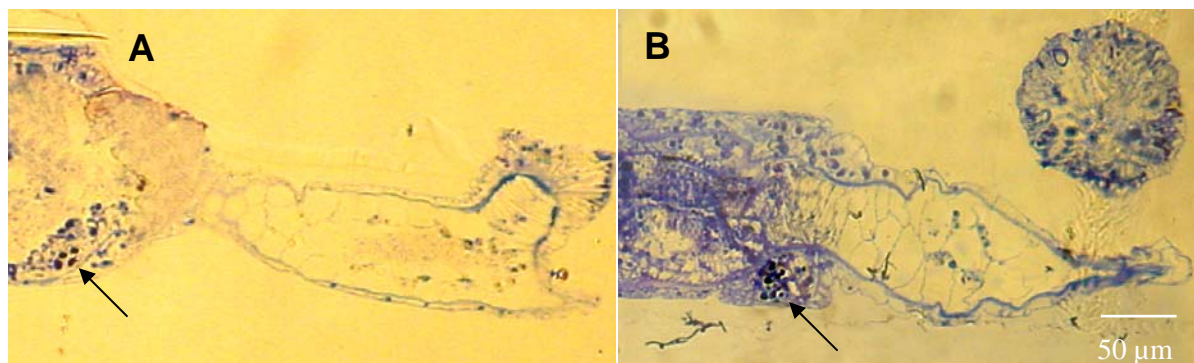


Abb. 3.30 Histologische Längsschnitte durch den Radius einer Meduse von *Eleutheria dichotoma* (vgl. auch Abb. 3.28 und Abb. 3.29). *Cnox-1* exprimierende Zellen im Nesselring an der Basis der Tentakel (siehe Pfeilmarkierungen).

resultiert, sondern sich vielmehr auf eine relativ geringe Anzahl beschränkt. Aus dem Vergleich mit den Ekto- bzw. Entodermzellen der Tentakel, ersieht man, dass diese Signalzellen sehr klein und deshalb wahrscheinlich undifferenzierte I-Zellen sind (vgl. Abb. 3.30).

3.2.1.2 *CNOX-1*-INHIBITION MITTELS dsRNA

3.2.1.2.1 TRANSFEKTIONSNACHWEIS DER dsRNA

Bei jeder transfizierten *Eleutheria*-Meduse konnte ein deutliches und weitestgehend gleichförmiges Fluoreszenzsignal in allen Zellen detektiert werden (vgl. Abb. 3.31). Die *Cnox-1*-Versuchs- und die *Trox-2*-Kontroll-Tiere zeigten keinerlei Signalunterschiede. Die Intensität der Signalantwort dieser Tiere war aber sehr deutlich von der sehr geringen Eigenfluoreszenz der nicht-transfizierten Meerwasser-Kontroll-Tiere zu unterscheiden. Drei Tage nach der Transfektion ist, insbesondere im Tentakelbereich, nur noch ein schwächeres Fluoreszenzsignal in den Zellen der Untersuchungsobjekte feststellbar. Nach weiteren 18 Tagen war kein Fluoreszenzsignal mehr in den *Cnox-1*-Versuchstieren zu detektieren.

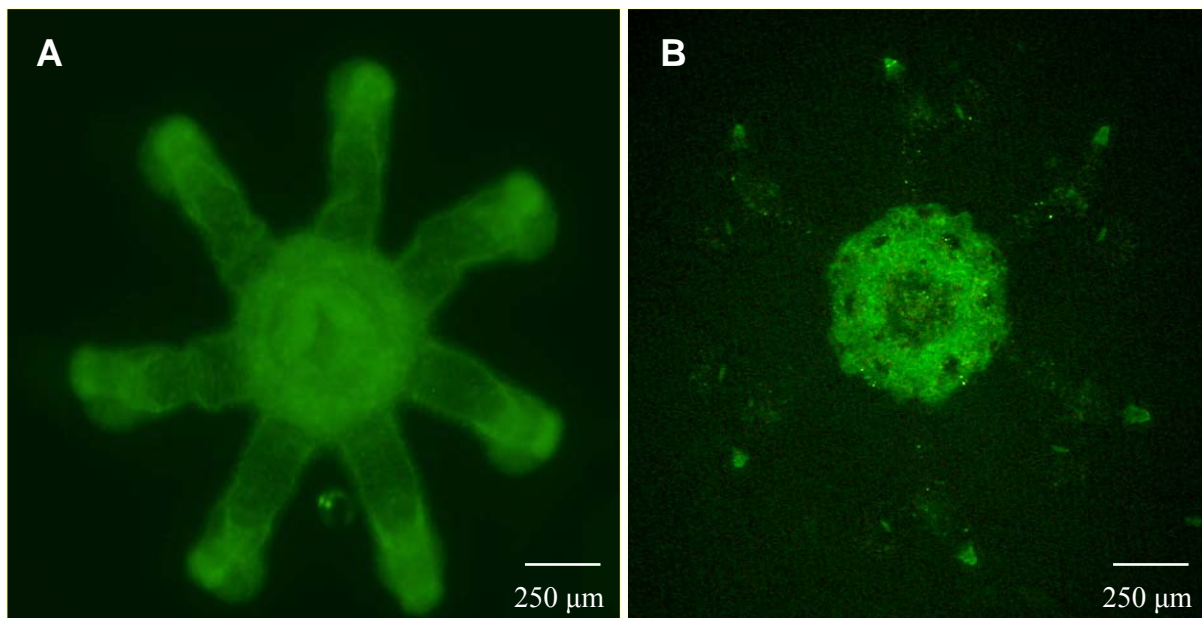


Abb. 3.31 Oral-Ansicht einer Meduse von *Eleutheria dichotoma*, 24 Stunden nach der Transfektion mit Fluoreszein markierter dsRNA (Anregung: 488 nm, Emission: 525 nm). Die Zellen zeigen eine deutliche und weitestgehend homogene Signalantwort (**A**). Drei Tage nach der Transfektion ist, insbesondere im Tentakelbereich der Medusen, die Fluoreszenz-Signalantwort weniger intensiv geworden (**B**).

3.2.1.2.2 FUNKTIONALITÄTSNACHWEIS DES RNAi-MECHANISMUS MITTELS RT-PCR

Die Reverse Transkriptase-PCR (RT-PCR) wurde benutzt, um einen quantitativen Nachweis der zellulären *Cnox-1*-mRNAs nach der Transfektion mit *Cnox-1*-dsRNAs zu erbringen. Hierbei wurde analog zur *Trox-2*-RT-PCR verfahren (vgl. Kap. 3.1.2.2). In Abänderung wurden von nur 25 Medusen der jeweiligen Versuchsansätze die RNAs isoliert. Als Mengen-Referenz zum *Cnox-1*-Amplifikat (401bp) diente bei gleichen PCR-Bedingungen das *Eleutheria*- β -Aktin (152bp).

Die Aktin-Banden im Gel sind nach 22-PCR-Zyklen bei den drei Versuchsansätzen (Meerwasser-Kontroll-, *Trox-2*-Kontroll- und *Cnox-1-Knock-Down*-Tiere) einer Versuchsreihe identisch intensiv repräsentiert (Spur 1, 3 und 5; vgl. Abb. 3.32). Die *Cnox-1*-Bandensignale der Kontrollen (Spur 2 und 4) hingegen, sind etwa sechsmal intensiver als die *Cnox-1*-Bande der "*Cnox-1-Knock-Down*-PCR" (Spur 6).

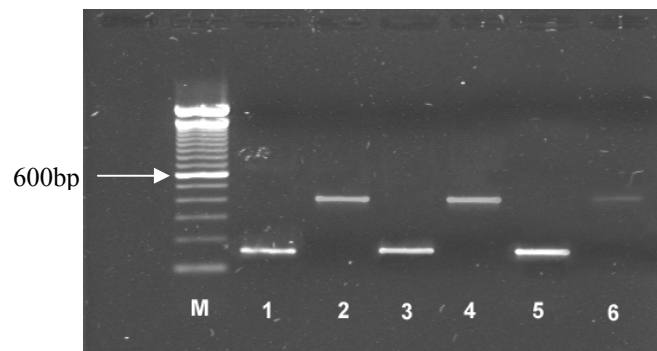


Abb. 3.32 Quantitative PCR von *Eleutheria*- β -Aktin (Spur 1, 3&5; 152bp) und *Cnox-1* (Spur 2, 4&6; 401bp) mit cDNA von a) Meerwasser-Kontroll-Tieren (Spur 1&2), b) *Trox-2*-dsRNA-transfizierten-Kontroll-Tieren (Spur 3&4) und c) *Cnox-1*-dsRNA-transfizierten Tieren (Spur 5&6). Die *Cnox-1*-mRNA-Menge der Kontrollen ist etwa sechsmal höher als die der *Cnox-1*-defizitären Individuen. Spur M = 100bp-Standardlängen-Marker.

3.2.1.2.3 QUANTITATIVE ANALYSE DES *CNOX-1*-RNAi-KNOCK-DOWNS

Es wurde für das Homöoboxgen *Cnox-1* ein Gen-*Knock-Down* mittels dsRNA herbeigeführt. Die Dauer der Studie betrug pro Versuchsreihe (insgesamt drei) 18 Wochen. Als erste Kontrolle fungierten in den Versuchsreihen 10 Tiere die mit dsRNA des *Trox-2*-Gens transfiziert wurden. Als zweite Kontrolle diente ein Meerwasser-Ansatz mit 10 Individuen, bei denen keine Transfektion mit dsRNA vorgenommen wurde.

Die drei *Cnox-1*-Versuchsreihen zeigten vom Ergebnis sehr ähnliche Tendenzen. In allen drei Reihen unterschieden sich die beiden Kontrollansätze signifikant vom Experimentalansatz ($n = 87$; Wilcoxon-Test für gepaarte Stichproben, $p < 0,05$). Die Versuchsdauer und die Anzahl der phänotypisch abnormalen Medusen (PAMs) sind signifikant positiv korreliert. Die drei *Cnox-1*-RNAi-Experimentalansätze wiesen nach Beendigung der Studie alle mehr als 68% PAMs auf. In der 2. Versuchsreihe lag der Anteil der Tiere mit abnormen Körperstrukturen mit 74,4% am höchsten (absolut: 29 PAMs), das Mittel der drei Reihen lag bei 71,3% (87 PAMs von 122

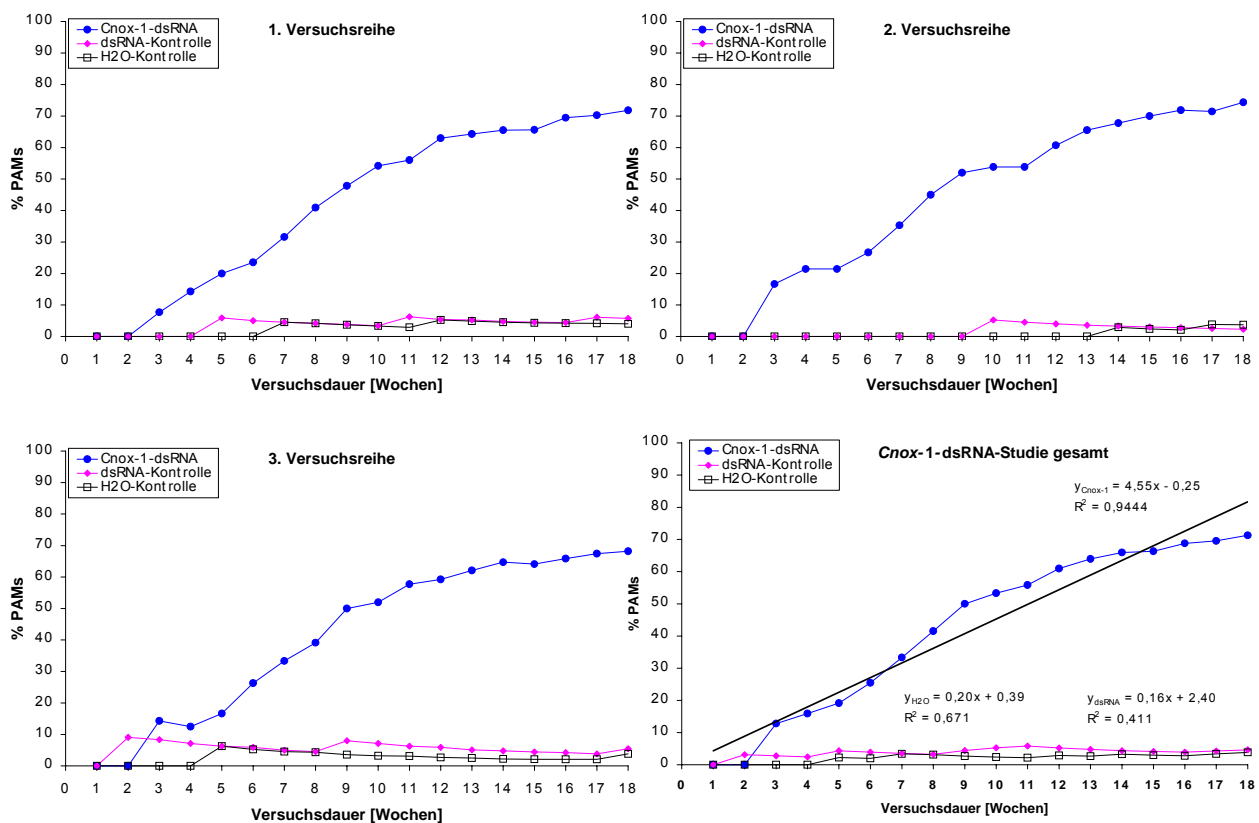


Abb. 3.33 Einfluss der *Cnox-1*-Inhibition via RNAi auf die Entstehungsrate von phänotypisch abnormalen Medusen (PAMs) bei *E. dichotoma*. Aufgetragen ist der prozentuale Anteil PAMs gegen die Versuchsdauer. Der Graph rechts unten zeigt eine Zusammenfassung der drei Versuchsreihen; die Steigungen (Regressionskoeffizienten) der Regressionsgeraden geben die prozentuale Zunahme an PAMs pro Zeiteinheit an. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurden bei den Kontrollen nur die Steigungsfunktionen und die Korrelationskoeffizienten (R) angegeben. Im Folgenden wird dies weiter so gehandhabt.

Tieren insgesamt). In keinem der drei Meerwasser-Kontrollansätze lag der prozentuale Anteil an PAMs am Ende der Versuchszeit über 4% (Mittelwert: 3,8%), in den drei dsRNA-Kontrollansätzen nicht über 6% (Mittelwert: 4,6%).

Der Faktor vor dem x in den Steigungsfunktionen (vgl. Abb. 3.33) wird als Regressionskoeffizient (Steigung) bezeichnet und gibt an, um wie viele Einheiten sich y (prozentuale Anteil PAMs) verändert, wenn sich die unabhängige Variable x (Zeit [*Wochen*]) um eine Einheit vergrößert. Aus den Steigungen der Regressionsgeraden der gesamten drei Versuchseihen (*Cnox-1*-Experimentalansatz: $y_{Cnox-1} = 4,55x$; Meerwasser-Kontrolle: $y_{H_2O} = 0,20x$; dsRNA-Kontrolle: $y_{dsRNA} = 0,16x$; vgl. Abb. 3.33) lässt sich daher ableiten, dass der prozentuale Anteil an PAMs in den Experimentalansätzen gegenüber den Kontrollen mehr als zwanzigmal schneller zunimmt; pro Zeiteinheit (Woche) steigt der Anteil der PAMs in den Experimentalansätzen also im Mittel um 4,55%, während der in den Kontrollen im gleichen Zeitintervall lediglich um 0,20% bzw. 0,16% zunimmt. Im zeitlichen Verlauf der Studie trat in den ersten beiden Wochen in keiner der drei Versuchsreihen eine phänotypisch sichtbare Veränderung auf Medusenebene auf. Jeweils in der dritten Woche aber konnten in jedem der drei Experimentalansätze PAMs dokumentiert werden. Die Anzahl der PAMs nahm nachfolgend in den drei Experimentalansätzen kontinuierlich zu.

3.2.1.2.4 QUALITATIVE ANALYSE DES *CNOX-1-RNAi-KNOCK-DOWNS*

Die Inhibition der fünf Hox/ParaHox-Gene bei *E. dichotoma* resultierte bei beiden Methoden (RNAi- und Morpholino-Inhibition) in unterschiedlichen, phänotypischen Veränderungen des Medusenhabitus. In der gesamten Studie wurden neun Varianten von PAMs unterschieden. Die Qualität der beobachteten Veränderungen beinhaltet:

- Doppelter Tentakel (dT): Es werden am distalen Ende eines Tentakels zusätzliche Haft- und/oder Wehräste ausgebildet, so dass die dichotome Organisation nicht mehr gegeben ist. Diese Fehlorganisation kann einen oder auch mehrere Tentakel eines Tieres betreffen. Hierbei wurden drei verschiedene Variationen von dT dokumentiert:
 1. Ausbildung zweier Haftäste und eines Wehrastes (dT2h1w)
 2. Ausbildung eines Haftastes und zweier Wehräste (dT1h2w)
 3. Ausbildung von jeweils zwei Haft- und Wehrästen (dT2h2w)
- Zwerg-Tentakel (ZT): Einzelne Tentakel sind stark verkleinert ($\leq \frac{1}{2}$ der normalen Länge) ausgebildet.
- Mehrfach-Tentakel (MT): Es werden am distalen Ende der Tentakel mehr als zwei zusätzliche Haft- und/oder Wehräste ausgebildet.

- Aboral-Oral-Achse “Körper“ deformiert (Kd): Fehlorganisation des Körperbauplans. Die Aboral-Oral-Achse ist vielfach nicht mehr zu erkennen. Tentakel entspringen nicht mehr lateral. Sowohl oral als auch aboral entstehen undefinierbare Gewebeauswüchse. Mit der Missbildung geht vielfach auch der Verlust der radialen Körpersymmetrie einher. Oftmals ist der Brutraum überdimensional erweitert.
- Körper verschmolzen (Kv): Tochtermedusen lösen sich nicht vom Elter ab. Es resultieren “Tieraggregate“ bestehend aus bis zu 15 Einzelmedusen. Körper verschmelzen, so dass eine individuelle Abgrenzung nicht mehr möglich ist. Die Knospung der Sekundärmedusen erfolgt oftmals nicht lateral.
- Doppeltes Manubrium (dM): Am oralen Pol des Tieres bilden sich zwei basal verbundene Manubrien aus. Gleichwohl sind beide Manubrien voll funktionsfähig.
- Kein Manubrium (kM): Die Meduse bildet kein Manubrium aus.

Die neun Merkmalskategorien wurden im Zuge der Ergebnisauswertung zuweilen in zwei Gruppierungen zusammengefasst, nämlich 1.) Veränderungen an Tentakelmerkmalen (dT2h1w, dT1h2w, dT2h2w, ZT, MT) und 2.) Veränderungen an Achsenmerkmalen (Kv, Kd, dM, kM).

In den *Cnox-1*-Versuchsreihen der dsRNA-Studie war das Merkmal dT2h1w am häufigsten vertreten. Nach Versuchsende zeigten etwa $\frac{1}{3}$ aller PAMs (absolut: 28)

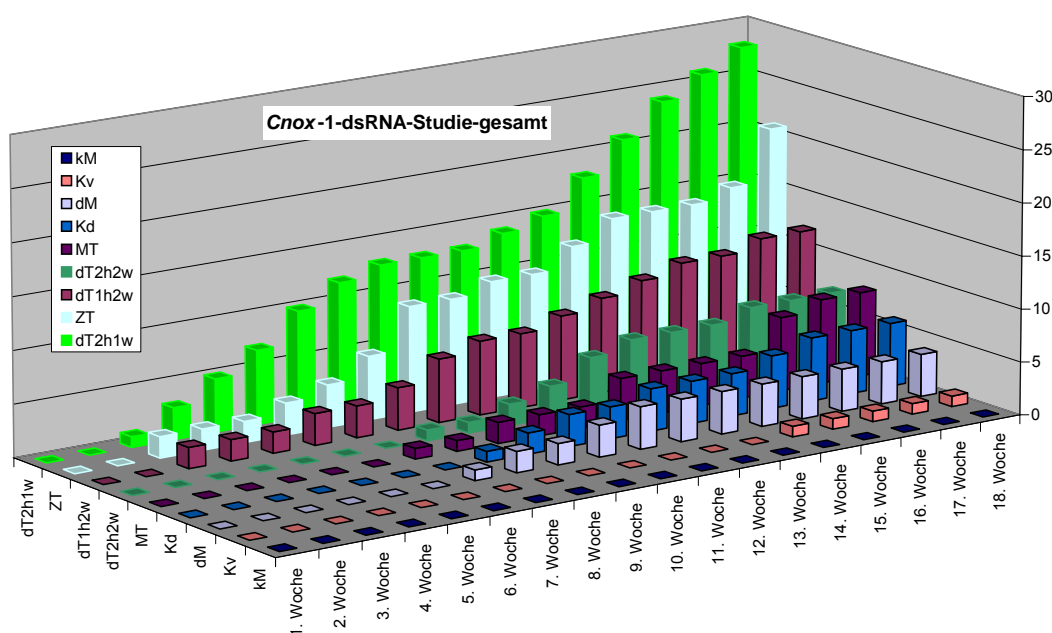


Abb. 3.34 Zeitlicher Verlauf der Zunahme an PAMs in allen neun Merkmalskategorien in den *Cnox-1*-RNAi-Versuchsreihen aufsummiert. Die Anzahl der PAMs ist in absoluten Zahlen aufgetragen.

diese abnorme Körperstruktur. Am zweithäufigsten war das Merkmal ZT zu beobachten, 24,1% der PAMs (absolut: 21) wiesen diese phänotypische Veränderung auf. Immerhin 13,8% der PAMs (absolut: 12) hatten einen doppelten Tentakel mit einem Haft- und zwei Wehrästen ausgebildet. 9,2% bzw. 8,0% der PAMs zeigten die Merkmale MT oder dT2h2w. Der Phänotyp kM war in keinem der drei Experimentalsätze vorhanden (vgl. Tab. 3.14). Auffällig erscheint die Dominanz der PAMs mit abnormen Tentakelmerkmalen (dT2h1w, dT1h2w, dT2h2w, ZT, MT). In den drei Versuchsreihen betrafen nach Beendigung der Studie 87,4% (absolut: 76) der phänotypischen Veränderungen diese Merkmalskategorien (vgl. Abb. 3.38 - Abb. 3.43). Nur 12,6% der PAMs wiesen abnorme Achsenstrukturen auf (Kv, Kd, dM, kM).

In der dritten Woche nach Versuchsbeginn traten die Merkmale dT2w1w, ZT und dT1h2w zeitgleich als erstes auf. Die Anzahl der PAMs dieser Merkmalskategorien nahm nachfolgend kontinuierlich zu. Erst in der siebten bzw. achten Woche konnten PAMs mit Achsenveränderungen (dM bzw. Kd) beobachtet werden. Der Phänotyp Kv wurde erst in der vierzehnten Woche detektiert (vgl. Abb. 3.34).

Versuchsreihe:	1.	2.	3.	ges.
dT2h1w:	9	9	10	28
dT1h2w:	3	4	5	12
dT2h2w:	5	2	0	7
ZT:	4	9	8	21
MT:	2	5	1	8
Kv:	0	0	1	1
Kd:	3	0	3	6
dM:	2	0	2	4
kM:	0	0	0	0
Normal:	11	10	14	35
M-gesamt:	39	39	44	122
PAMs:	28	29	30	87
% -PAMs:	71,8	74,4	68,2	71,3

Tab. 3.14 Anzahl phänotypisch veränderter Medusen der einzelnen Versuchsreihen nach Beendigung der Studie. Abkürzungen betreffen: PAMs = phänotypisch abnormale Medusen; dT2h1w = doppelter-Tentakel, 2 Haftäste und 1 Wehrast; dT1h2w = doppelter-Tentakel, 1 Haftast und 2 Wehräste; dT2h2w = doppelter-Tentakel, 2 Haftäste und 2 Wehräste; dM = doppeltes Manubrium; Kv = Körper verschmolzen; Kd = Körper deformiert; kM = kein Manubrium; ZT = Zwerg-Tentakel.

3.2.1.3 *CNOX-1*-INHIBITION MITTELS MORPHOLINO-ANTISENSE-OLIGOS

3.2.1.3.1 TRANSFEKTIONSNACHWEIS DER MORPHOLINO-ANTISENSE-OLIGOS

Jede der transfizierten *Eleutheria*-Medusen zeigte ein deutliches und homogenes Fluoreszenzsignal in allen Zellen (vgl. Abb. 3.35). Die *Cnox-1*-Versuchs- und die *Trox-2*-Kontroll-Tiere zeigten dabei keinerlei Signalunterschiede. Die Intensität der Signalantwort dieser Tiere war hingegen aber sehr deutlich von der geringen Eigenfluoreszenz der nicht-transfizierten Meerwasser-Kontroll-Tiere zu unterscheiden. Drei Tage nach der Transfektion war, ähnlich den dsRNA-transfizierten Tieren, insbesondere im Tentakelbereich, nur noch ein schwaches Fluoreszenzsignal in den Zellen der Medusen feststellbar. Nach weiteren 18 Tagen war kein Fluoreszenzsignal mehr in den *Cnox-1*-Versuchstieren zu detektieren.

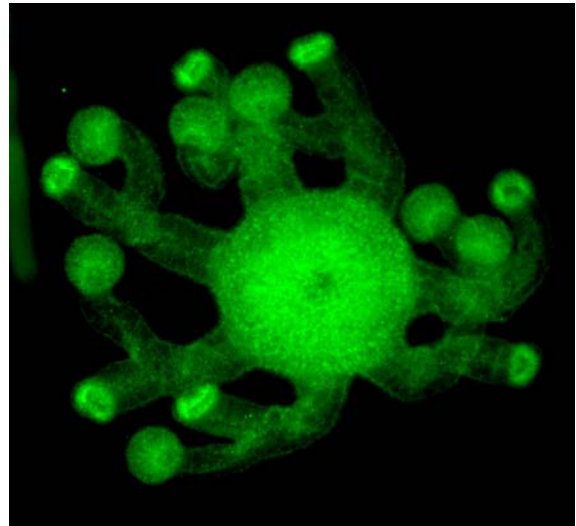


Abb. 3.35 Oral-Ansicht einer Meduse von *Eleutheria dichotoma*, 24 Stunden nach der Transfektion mit Fluoreszein markierten Morpholino-Antisense-Oligonukleotiden. Die Zellen zeigen eine deutliche und weitestgehend homogene Signalantwort.

3.2.1.3.2 QUANTITATIVE ANALYSE DER *CNOX-1*-MORPHOLINO-GEN-INHIBITION

Die drei *Cnox-1*-Versuchsreihen der Morpholino-Studie zeigten, sowohl untereinander als auch im Vergleich zu den Versuchsreihen der *Cnox-1*-dsRNA-Untersuchung, vom Ergebnis her sehr ähnliche Tendenzen. In allen drei Reihen unterschieden sich die beiden Kontrollansätze signifikant vom Experimentalansatz ($n = 84$; Wilcoxon-Test, $p < 0,05$). Die Versuchsdauer und die Anzahl der PAMs sind eindeutig signifikant positiv korreliert. Die drei *Cnox-1*-Morpholino-Experimentalansätze wiesen nach Beendigung der Studie alle mehr als 61,0% an PAMs auf. In der 2. Versuchsreihe lag der Anteil der Tiere mit abnormen Körperstrukturen mit 71,8% (absolut: 28 PAMs) am höchsten, das Mittel der drei Reihen lag bei über 66,0% (84 PAMs von 127 Tieren insgesamt). Aus den Steigungen der Regressionsgeraden der gesamten drei Versuchseihen (*Cnox-1*-Experimentalansatz: $y_{Cnox-1} = 4,23x$; Meerwasser-Kontrolle: $y_{H_2O} = 0,20x$; Sense-Kontrolle: $y_{sense} = 0,29x$; vgl. Abb. 3.36) lässt sich ableiten, dass der prozentuale Anteil an PAMs in den Experimentalansätzen gegenüber den Kontrollen fast zwanzigmal

schneller ansteigt. In keinem der Meerwasser-Kontrollansätze lag der prozentuale Anteil der PAMs am Ende der Versuchszeit über 5% (Mittelwert: 2,7%), in den Sense-Kontrollansätzen nicht über 7% (Mittelwert: 4,2%).

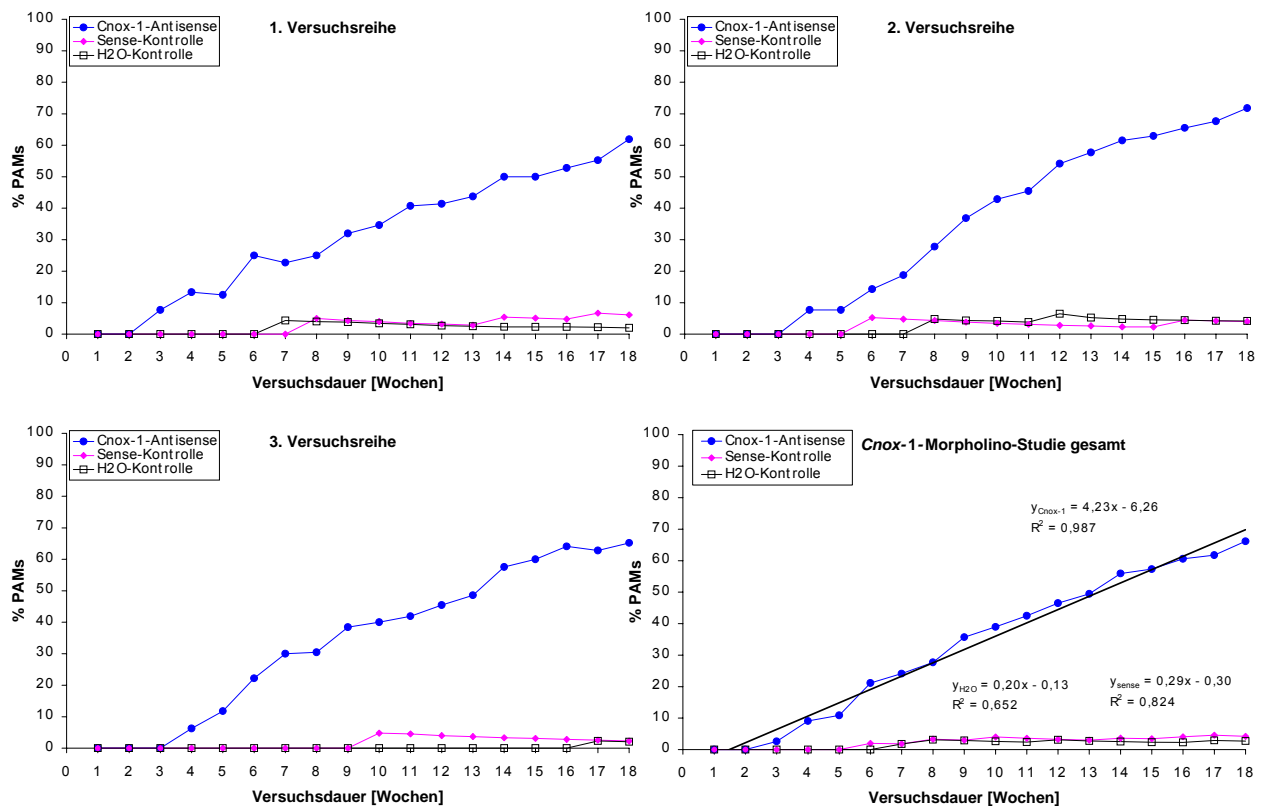


Abb. 3.36 Einfluss der *Cnox-1*-Inhibition via Morpholino-Antisense-Oligos auf die die Entstehungsrate von PAMs bei *E. dichotoma*. Aufgetragen ist der prozentuale Anteil an PAMs gegen die Versuchsdauer. Der Graph rechts unten zeigt eine Zusammenfassung von allen drei Versuchsreihen; die Steigungen (Regressionskoeffizienten) der Regressionsgeraden geben die prozentuale Zunahme an PAMs pro Zeiteinheit an.

Gleich der dsRNA-Studie trat in den ersten beiden Wochen in keiner der drei Versuchsreihen eine phänotypisch sichtbare Veränderung auf Medusenebene auf. In der dritten Woche konnte im Experimentalansatz der ersten Versuchsreihe die erste PAM dokumentiert werden. In der folgenden Woche verzeichneten auch die beiden anderen Versuchsansätze die ersten PAMs. Die Anzahl der PAMs aller drei Versuchsreihen nahm nachfolgend in den Experimentalansätzen kontinuierlich zu.

3.2.1.3.3 QUALITATIVE ANALYSE DER *CNOX-1*-MORPHOLINO-GEN-INHIBITION

In den *Cnox-1*-Versuchsreihen der Morpholino-Studie war das Merkmal dT2h1w am häufigsten vertreten (vgl. Abb. 3.40 und Abb. 3.41). Nach Versuchsende zeigten, gleich der *Cnox-1*-dsRNA-Studie, etwa $\frac{1}{3}$ aller PAMs (absolut: 24) diese Art abnormer Körperstrukturen. Fast genauso häufig war das Merkmal ZT zu beobachten, 26,2% der PAMs (absolut: 22) wiesen diese phänotypische

Veränderung auf. Mehrfachentakel (MT) hatten 13,1% der PAMs (absolut: 11) ausgebildet. Einen doppelten Tentakel mit einem Haft- und zwei Wehrästen (dT1h2w) zeigten 9,5% der PAMs. Der Phänotyp kM war in keinem der drei Experimentalansätze vorhanden (vgl. Tab. 3.15).

Versuchsreihe:	1.	2.	3.	ges.
dT2h1w:	8	8	8	24
dT1h2w:	3	2	3	8
dT2h2w:	4	1	1	6
ZT:	4	8	10	22
MT:	2	5	4	11
Kv:	0	0	2	2
Kd:	4	3	1	8
dM:	1	1	1	3
kM:	0	0	0	0
Normal:	16	11	16	43
M-gesamt:	42	39	46	127
PAMs:	26	28	30	84
% -PAMs:	61,9	71,8	65,2	66,1

Bemerkenswert erscheinen die deutlichen Ergebnis-Korrelationen zwischen dieser und der *Cnox-1*-dsRNA-Studie. In den Morpholino-Versuchsreihen betrafen nach Beendigung der Studie 84,5% (absolut: 71; vgl. dsRNA-Studie: 87,4%) der phänotypischen Veränderungen Tentakelmerkmale (vgl. Abb. 3.38 - Abb. 3.43). Nur 15,5% der PAMs wiesen abnorme Strukturen an Merkmalskategorien der Körperachse auf (absolut: 13; vgl. dsRNA-Studie: 12,6%). Gleich der dsRNA-Studie trat das Merkmal dT2h1w in der dritten Woche nach Versuchsbeginn als erstes auf.

Tab. 3.15 Anzahl phänotypisch abnormer Medusen der *Cnox-1*-Morpholino-Versuchsreihen am Ende der Studie.

Auch die Merkmale ZT und dT1h2w waren in etwa zeitgleich wie in der dsRNA-Studie zu detektieren. Die Anzahl der PAMs dieser Merkmalskategorien nahm nachfolgend kontinuierlich zu. Auch konnten PAMs mit Achsenveränderungen erst in der siebten bzw. in der achten Woche erstmals beobachtet werden (dM bzw. Kd). Der Phänotyp Kv wurde erst in der dreizehnten Woche detektiert (vgl. Abb. 3.37).

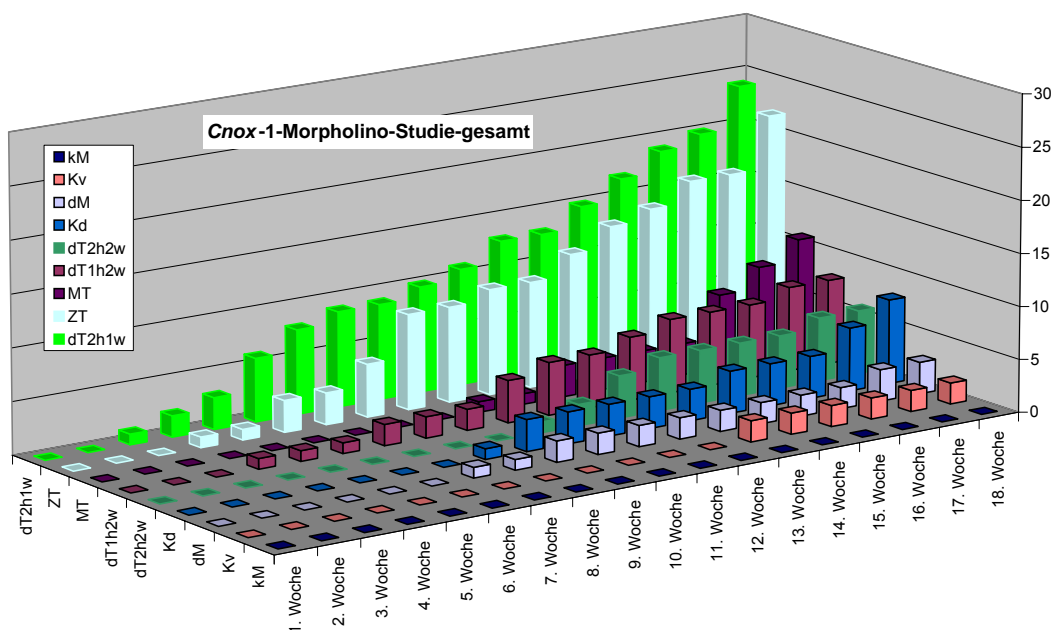


Abb. 3.37 Zeitlicher Verlauf der Zunahme an PAMs in allen neun Merkmalskategorien in den *Cnox-1*-Morpholino-Versuchsreihen aufsummiert. Die Anzahl der PAMs ist in absoluten Zahlen aufgetragen.

3.2.1.4 EXEMPLARISCHE DARSTELLUNG DER PAMs DER *CNOX-1*-STUDIEN

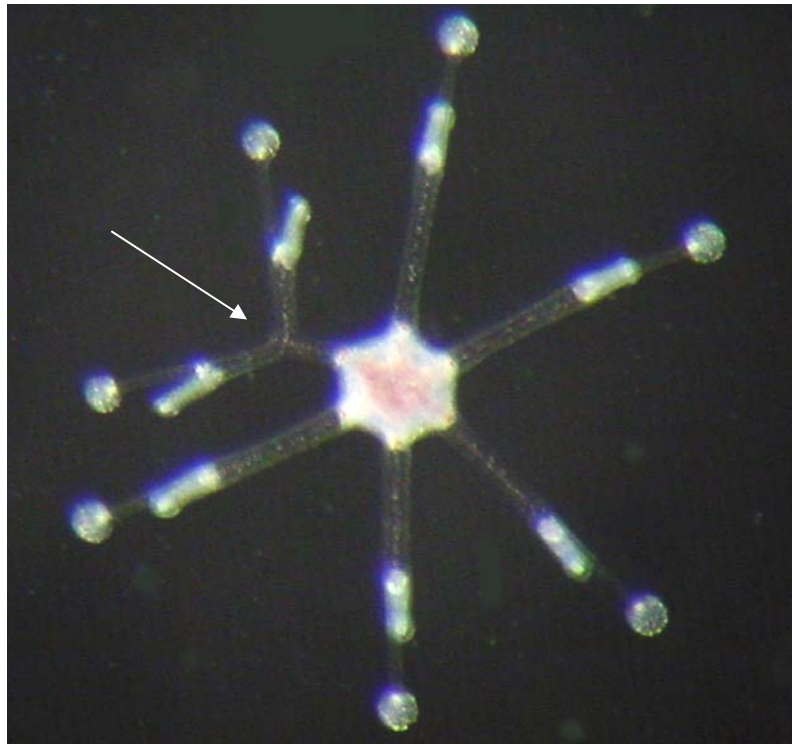


Abb. 3.38 Meduse von *E. dichotoma* aus den *Cnox-1*-Inhibitionsstudien. Man beachte die Ausbildung eines doppelten Tentakels mit zwei Haft- und zwei Wehrästen (dT2h2w, siehe Pfeilmarkierung). Das phänotypisch abnorme Merkmal wurde in der achten Woche nach Beginn des Experiments dokumentiert (Aboral-Ansicht bei 40-facher Vergrößerung).

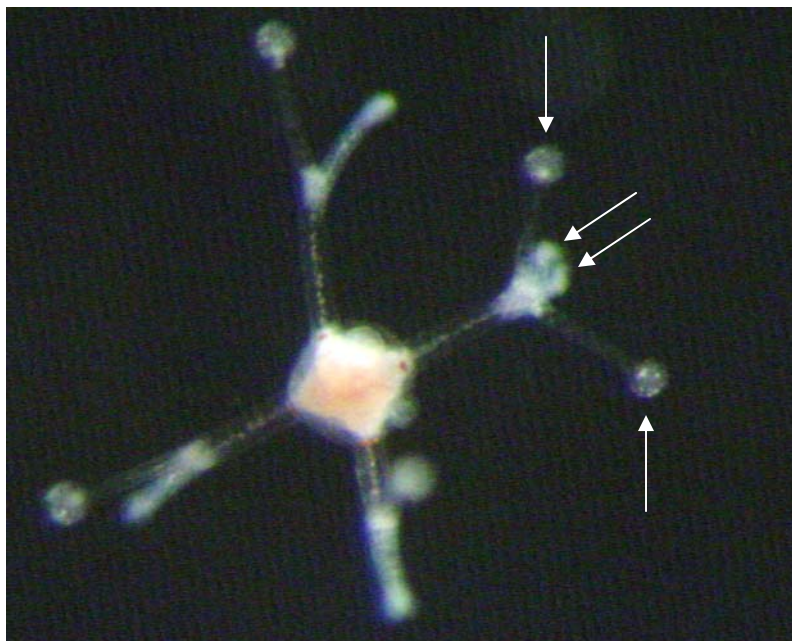


Abb. 3.39 Meduse von *E. dichotoma* aus den *Cnox-1*-Inhibitionsstudien. Ausbildung eines doppelten Tentakels mit zwei Haft- und zwei Wehrästen (dT2h2w, siehe Pfeilmarkierungen). Das phänotypisch abnorme Merkmal wurde in der neunten Woche nach Beginn des Experiments dokumentiert (Aboral-Ansicht bei 40-facher Vergrößerung).



Abb. 3.40 Meduse von *E. dichotoma* aus den *Cnox-1*-Inhibitionsstudien. Ausbildung eines doppelten Tentakels mit zwei Haftästen und einem Wehrast (dT2h1w, siehe Pfeilmarkierungen). Das phänotypisch abnorme Merkmal wurde in der dritten Woche nach Beginn des Experiments dokumentiert (Aboral-Ansicht bei 40-facher Vergrößerung).

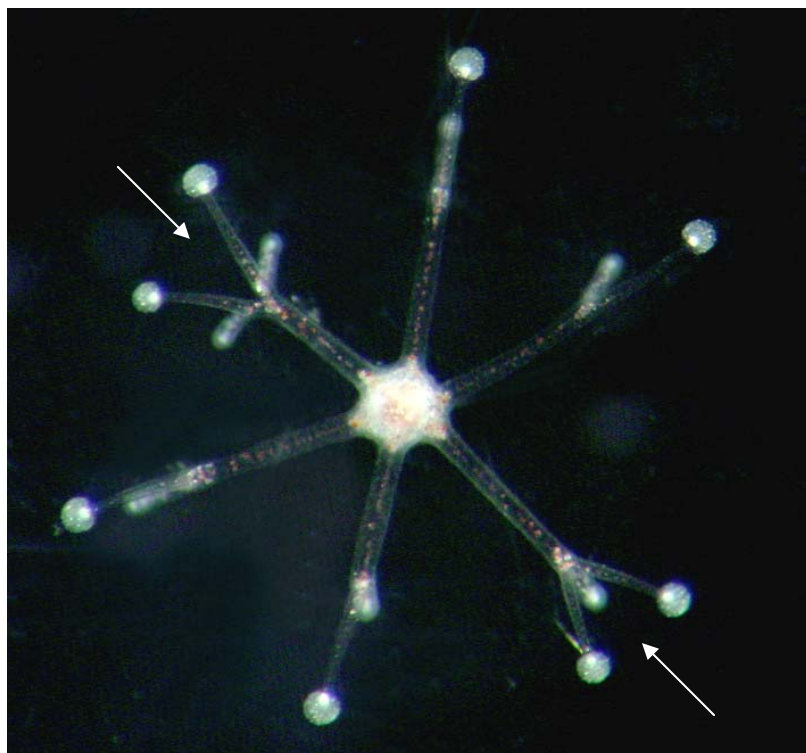


Abb. 3.41 Meduse von *E. dichotoma* aus den *Cnox-1*-Inhibitionsstudien. Ausbildung zweier doppelter Tentakel mit 1) einem Haftast und zwei Wehrästen (dT1h2w) und 2) mit zwei Haft- und zwei Wehrästen (dT2h2w, siehe Pfeilmarkierungen). Das phänotypisch abnorme Merkmal wurde in der vierten Woche nach Beginn des Experiments dokumentiert (Aboral-Ansicht bei 40-facher Vergrößerung).

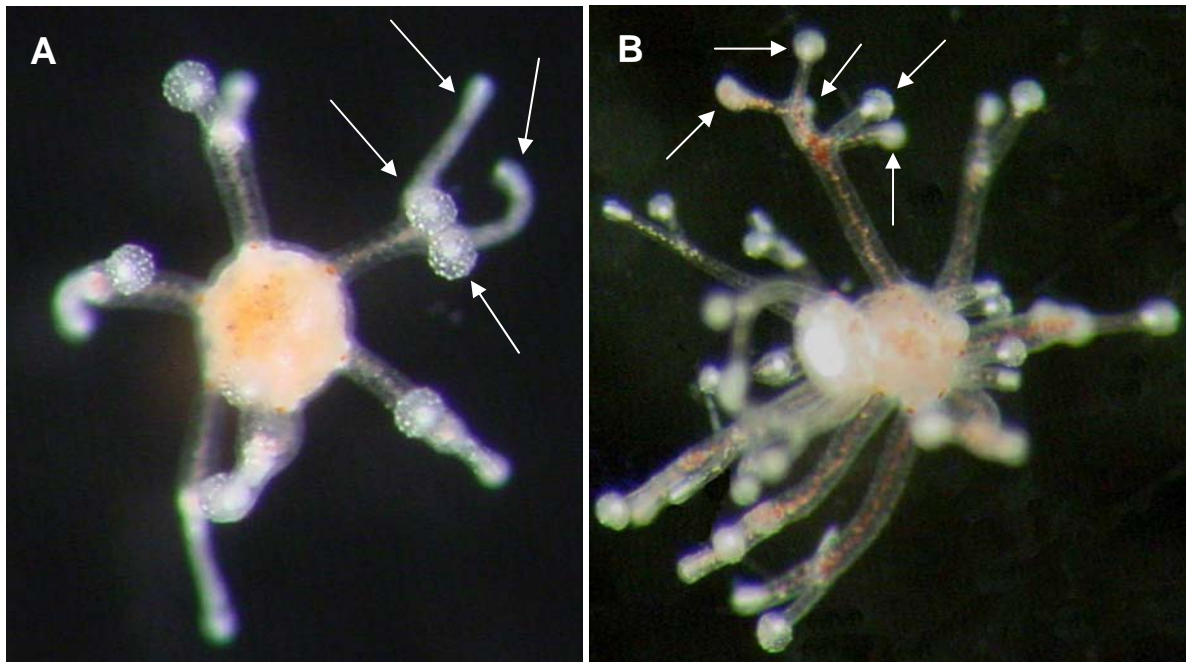


Abb. 3.42 Medusen von *E. dichotoma* aus den *Cnox-1*-Inhibitionsstudien. Ausbildung eines doppelten Tentakels mit zwei Haft- und zwei Wehrästen (dT2h2w; **A**) und Ausbildung eines Mehrfach-Tentakels mit zwei Haftästen und drei Wehrästen (MT; **B**; siehe Pfeilmarkierungen). Die phänotypisch abnormen Merkmale wurden in der fünfzehnten bzw. achten Woche nach Beginn des Experiments dokumentiert (Aboral-Ansicht bei 40-facher Vergrößerung).

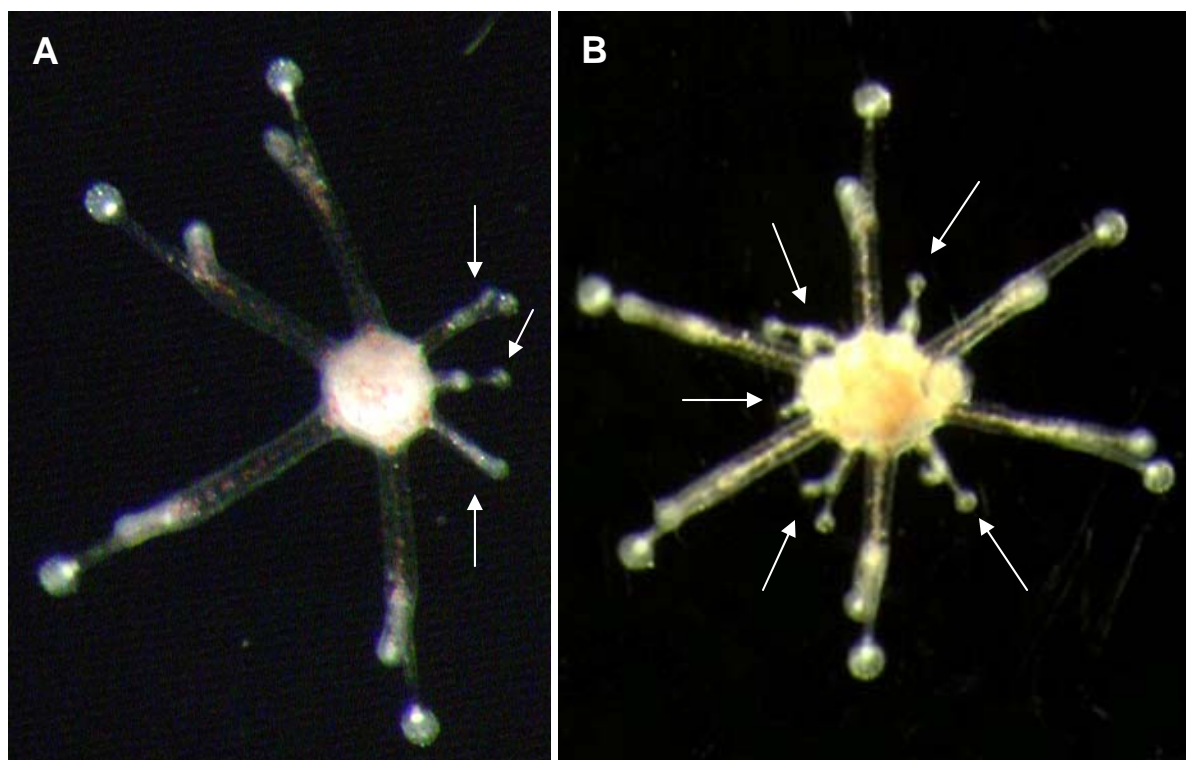


Abb. 3.43 Medusen von *E. dichotoma* aus den *Cnox-1*-Inhibitionsstudien. Ausbildung von drei Zwerg-Tentakeln (ZT; **A**) und Ausbildung von fünf zusätzlichen Zwerg-Tentakeln (**B**; siehe Pfeilmarkierungen). Die phänotypisch abnormen Merkmale wurden in der fünfzehnten bzw. achten Woche nach Beginn des Experiments dokumentiert (Aboral-Ansicht bei 40-facher Vergrößerung).

3.2.2 UNTERSUCHUNGEN AM *CNOX-2*-GEN

3.2.2.1 EXPRESSIONSSTUDIEN

In allen Stadien des Lebenszyklus von *E. dichotoma* konnten positive Expressions-signale des *Cnox-2*-Gens detektiert werden. Das *Cnox-2*-Gen wird in Planularlarven, Primärpolypen, adulten Polypen und auch in der Medusengeneration exprimiert. Es wurden für beide Detektions-Methoden distinkte und problemlos reproduzierbare Signale mit der Antisense-Sonde, nicht aber mit der Sense-Sonde (Kontrolle) gefunden. Die Signalantwort war genspezifisch und in jedem Tier immer gleich, die Hintergrundfärbung in allen Fällen gering und eindeutig von der Signalantwort unterscheidbar.

In ca. zwei Tage alten Planularlarven wird das *Cnox-2*-Gen in ektodermalen Zellen am vegetativen (oralen) Pol exprimiert. Vergleicht man die Lageposition der Zellen innerhalb der Larve im Phasenkontrast mit den beiden fluoreszenzmikroskopischen Ansichten (vgl. Abb. 3.44), so erlaubt dies eine genaue lokale Einordnung der Signale. Die Signalantwort beschränkt sich auf das äußerste, vegetative Ende der Larve und ist, dort wo vorhanden, gleich intensiv ausgeprägt. Dieses Expressionsmuster konnte bei ca. 75% der untersuchten Planularlarven gefunden werden (n> 25). Die DAPI-Färbung ergab eine einheitlich-homogene Signalstruktur verteilt über den gesamten Larvenhabitus. Die blauen DAPI-Signale sind punktförmig, den Zellen bzw. Zellkernen entsprechend angeordnet und belegen die Unversehrtheit der intrazellulären Nukleinsäuren.

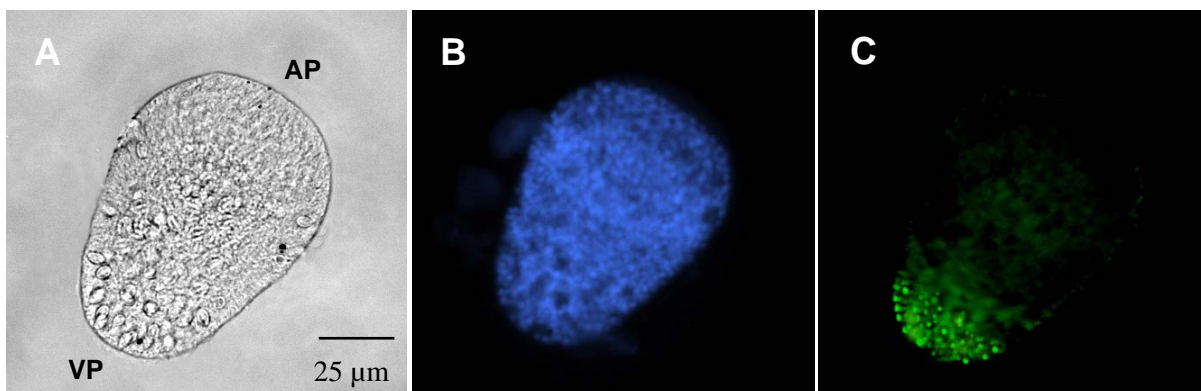


Abb. 3.44 Planularlarve von *Eleutheria dichotoma*. Durchlichtmikroskopische Aufnahme im Phasenkontrast (A), DAPI-Färbung (B) und *Cnox-2*-Expression detektiert mittels Fluoreszein markierter Sonden (C). Abkürzungen: AP= animaler Pol, VP= vegetativer Pol.

In ca. drei Tage alten Primärpolypen wird das *Cnox-2*-Gen, gleich den Planularlarven, in ektodermalen Zellen am vegetativen Pol exprimiert (vgl. Abb. 3.45 C). Die Signalantwort ist am oralen Ende des Tieres deutlich ausgeprägt und nimmt ca. ein

Viertel des gesamten Primärpolypen ein. Positive *Cnox-2*-Signale dieser Art konnten in allen untersuchten Primärpolypen ($n > 10$) gefunden werden. In sechs Tage alten Polypen ist das Gen ebenfalls am oralen Pol exprimiert, das Signal nimmt aber etwa gut ein Drittel des gesamten Körpers ein und ist darüber hinaus auch in den distalen Tentakelenden detektierbar (vgl. Abb. 3.45 F). Alle untersuchten Tiere ($n > 10$) wiesen ein solches Expressionsmuster auf.

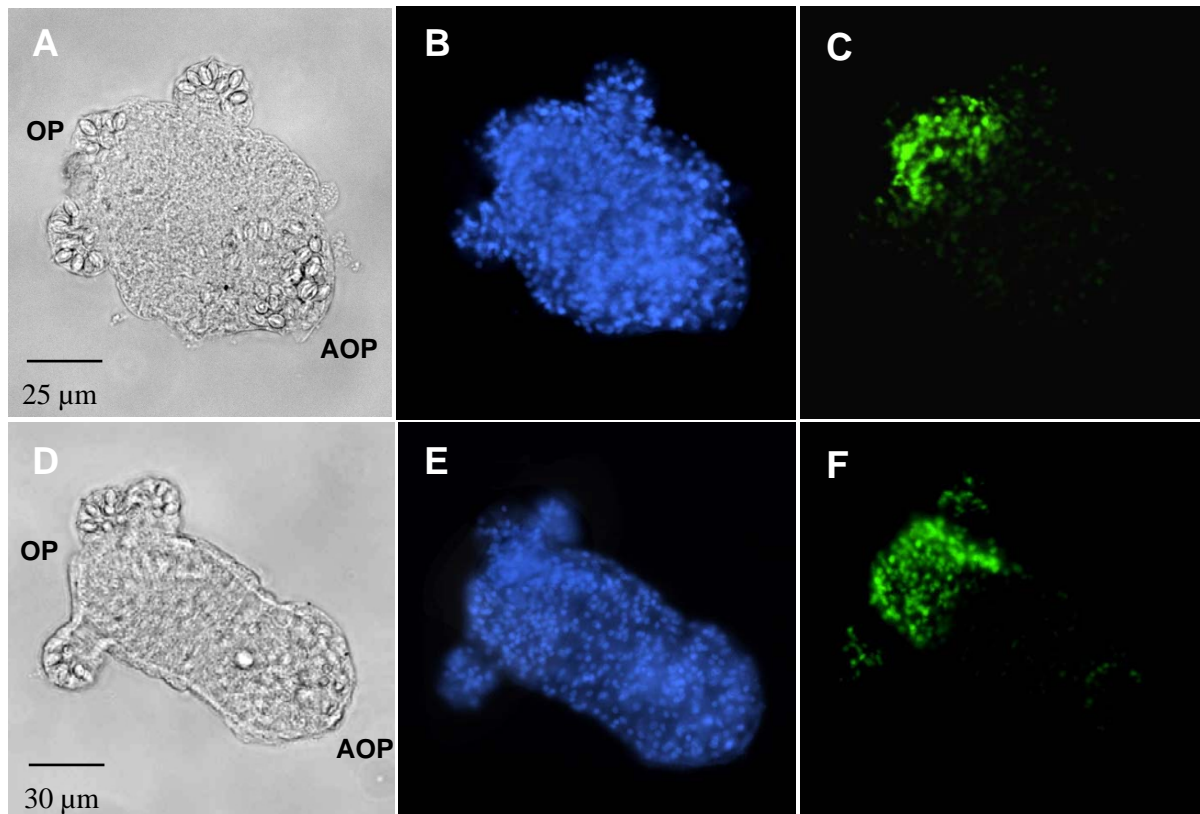


Abb. 3.45 Primärpolypen von *Eleutheria dichotoma*. Durchlichtmikroskopische Aufnahme im Phasenkontrast (**A+D**), DAPI-Färbung (**B+E**) und *Cnox-2*-Expression detektiert mittels Fluoreszein markierter Sonden (**C+F**). Jeweils das gleiche Tier zeigt **A, B** und **C** (drei Tage alt) bzw. **D, E** und **F** (sechs Tage alt). Abkürzungen betreffen: AOP= aboraler Pol, OP= oraler Pol.

In adulten Polypen wird das *Cnox-2*-Gen gleichsam im oralen "Kopfbereich" exprimiert. Die Signalantwort beschränkt sich allerdings, im Vergleich zu den Primärpolypen, auf die Spitze des Hypostoms (Mundkegel). Zudem ist in den Tentakeln der Tiere eine sehr intensiv ausgeprägt Expression zu finden (vgl. Abb. 3.46). Ein Expressionsmuster dieser Art konnte in etwa 50% der untersuchten Polypen detektiert werden ($n > 10$). Die Expression war in diesen Tieren überaus stark ausgeprägt.

In der Medusengeneration wird das *Cnox-2*-Gen entodermal in jungen, embryonalen Knospenanlagen exprimiert. Die Expression war nur in Knospen dieser Größe und Entwicklungsstufe zu finden. Waren die untersuchten Anlagen älter oder jünger, war es nicht möglich eine Signalantwort nachzuweisen. In einem solchen



Abb. 3.46 Adulte Polypen von *Eleutheria dichotoma*. Durchlichtmikroskopische Aufnahme im Phasenkontrast. Expression des *Cnox-2*-Gens detektiert mittels NBT/X-Phosphat-Färbung (A+B). Das Gen ist am Hypostom und in den Tentakeln der Tiere exprimiert (siehe Pfeilmarkierungen). Die Sense-Kontrolle (C) zeigt keinerlei Farbsignale.

Stadium hatten die Knospen noch keine Tentakel angelegt. Die Tochtermeduse erscheint in dieser Stufe der Entwicklung als ein abgerundeter Auswuchs an der Lateralseite des Muttertiers in einem der Interradien. Die Knospenanlage versteht man in einem solchen embryonalen Stadium als eine Aussackung des Ringgefäßes (Entoderm) das das Ektoderm nach aussen wölbt. Die Knospe besteht folglich aus Ento- und Ektodermzellen und einer winzigen mit dem Gastrovaskularsystem des Elters kommunizierenden Höhle. Das Expressionssignal resultiert eindeutig aus dem Kernbereich der Knospe und stammt demnach von Gewebezellen, die sich aus den ausgestülpten, ursprünglichen Ringkanalzellen des Muttertiers ableiten (vgl. Abb. 3.47). Ein solches Muster konnte nur in ca. 20% der examinieren Tiere detektiert werden (n> 50).

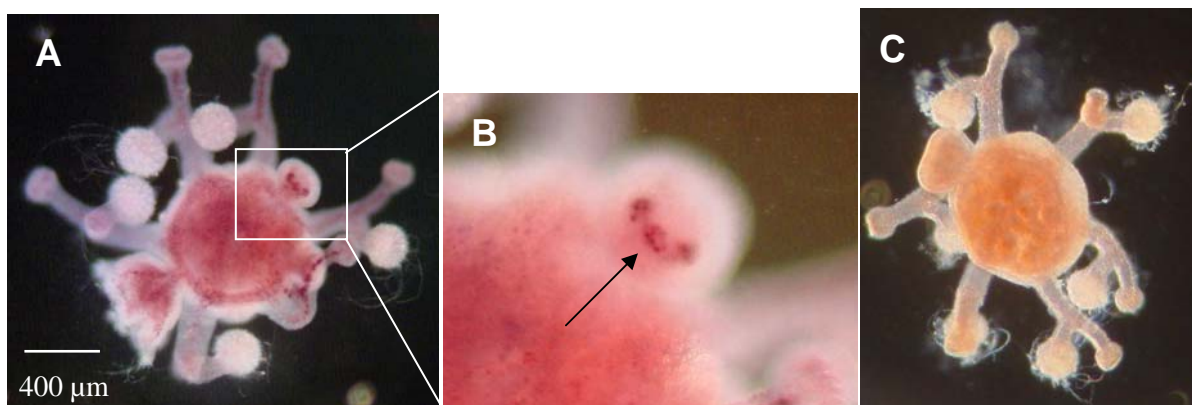


Abb. 3.47 Expression des *Cnox-2*-Gens in der Medusengeneration von *Eleutheria dichotoma*, detektiert mittels NBT/X-Phosphat-Färbung; Totalansicht (A) und Detailansicht (B). Das Gen ist in jungen, embryonalen Knospen exprimiert (siehe Pfeilmarkierung). Die Sense-Kontrolle (C) zeigt keinerlei Farbsignale.

3.2.2.2 *CNOX-2*-INHIBITION MITTELS dsRNA

3.2.2.2.1 QUANTITATIVE ANALYSE DES *CNOX-2*-RNAi-KNOCK-DOWNS

In allen drei *Cnox-2*-Versuchsreihen unterschieden sich nach 18 Wochen Versuchsdauer die beiden Kontrollansätze signifikant vom Experimentalansatz (n= 83; Wilcoxon-Test, p< 0,05). Die Versuchsdauer und die Anzahl der PAMs zeigen eine signifikant positive Korrelation. Die drei *Cnox-2*-RNAi-Experimentalansätze wiesen nach Beendigung der Studie im Minimum fast 58% phänotypisch abnormale Medusen auf (absolut: 22 PAMs; 2. Versuchsreihe). In der 1. Versuchsreihe hatten bei Versuchsschluss über 68% (absolut: 28 PAMs) abnorme Körperstrukturen ausgebildet, in der 3. Versuchsreihe lag der Anteil der Medusen mit abnormen Habitus mit 71,7% (absolut: 33 PAMs) am höchsten. Der Mittelwert an PAMs in den drei Reihen lag bei 66,4% (83 PAMs von 125 Tieren insgesamt). Aus den Steigungen der Regressionsgeraden der gesamten drei Versuchseihen (*Cnox-2*-Experimentalansatz: $y_{Cnox-2} = 3,92x$; Meerwasser-Kontrolle: $y_{H_2O} = 0,20x$; dsRNA-Kontrolle: $y_{dsRNA} = 0,16x$; vgl. Abb. 3.48) lässt sich folgern, dass der prozentuale Anteil an PAMs in den Experimentalansätzen gegenüber den Kontrollen fast zwanzigmal schneller ansteigt. In der ersten Woche der Studie trat

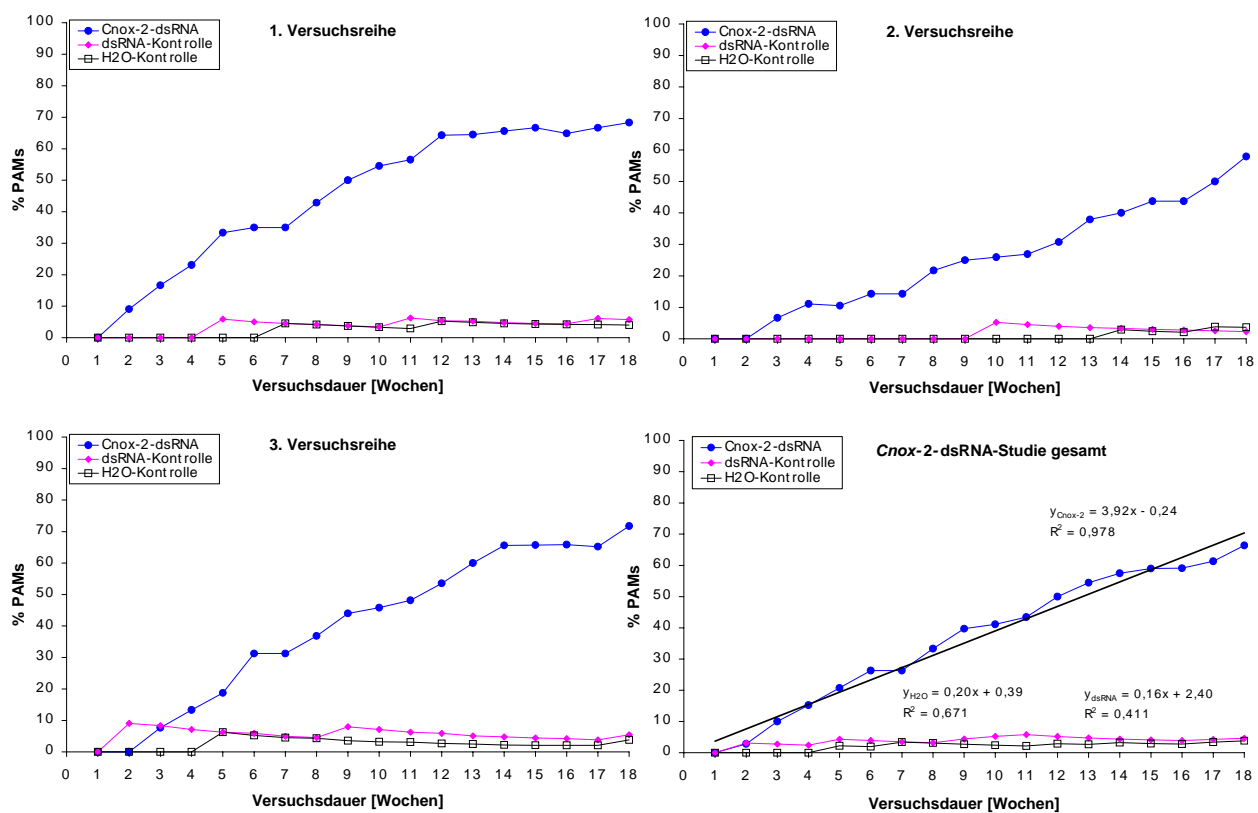


Abb. 3.48 Einfluss der *Cnox-2*-Inhibition via RNAi auf die Entstehungsrate von PAMs bei *E. dichotoma*. Aufgetragen ist der prozentuale Anteil an PAMs gegen die Versuchsdauer. Der Graph rechts unten zeigt eine Zusammenfassung von allen drei Versuchsreihen; die Steigungen (Regressionskoeffizienten) der Regressionsgeraden geben die prozentuale Zunahme an PAMs pro Zeiteinheit an; R= Korrelationskoeffizient.

in keiner der drei Versuchsreihen eine phänotypisch sichtbare Veränderung bei einer Meduse auf. Die 1. Versuchsreihe wies in der zweiten Woche bereits eine PAM auf, spätestens aber nach der dritten Woche konnte in jedem Experimentalansatz eine PAM dokumentiert werden. Die Anzahl der PAMs nahm nachfolgend in den drei Experimentalansätzen kontinuierlich zu.

3.2.2.2.2 QUALITATIVE ANALYSE DES *CNOX-2*-RNAi-KNOCK-DOWNS

In den *Cnox-2*-Versuchsreihen der RNAi-Studie trat das Merkmal Kd am häufigsten auf. Nach Versuchsende zeigten mehr als ¼ aller PAMs (absolut: 22) diese abnormen Körperstrukturen. Am zweithäufigsten war das Merkmal dT2h1w zu beobachten, 18,1% der PAMs (absolut: 15) wiesen diese phänotypische Veränderung auf. Fast genauso häufig war das Merkmal MT vertreten, 15,7% der PAMs hatten diese phänotypische Struktur ausgebildet. Immerhin 12,1% der PAMs wiesen Zwergtentakel auf (absolut: 10). Jeweils bei sechs Tieren konnte das Merkmal Kv bzw. dM dokumentiert werden. Das Merkmal kM kam nur einmal vor. Im Vergleich zu den *Cnox-1*-Versuchsreihen, waren alle neun Merkmalskategorien vertreten (vgl. Tab. 3.16).

Versuchsreihe:	1.	2.	3.	ges.
dT2h1w:	6	4	5	15
dT1h2w:	1	1	3	5
dT2h2w:	4	1	0	5
ZT:	1	3	6	10
MT:	5	1	7	13
Kv:	1	2	3	6
Kd:	9	7	6	22
dM:	1	2	3	6
kM:	0	1	0	1
Normal:	11	18	13	42
M-gesamt:	39	40	46	125
PAMs:	28	22	33	83
% -PAMs:	71,8	55	71,7	66,4

Tab. 3.16 Anzahl phänotypisch abnormer Medusen der *Cnox-2*-RNAi-Versuchsreihen am Ende der Studie.

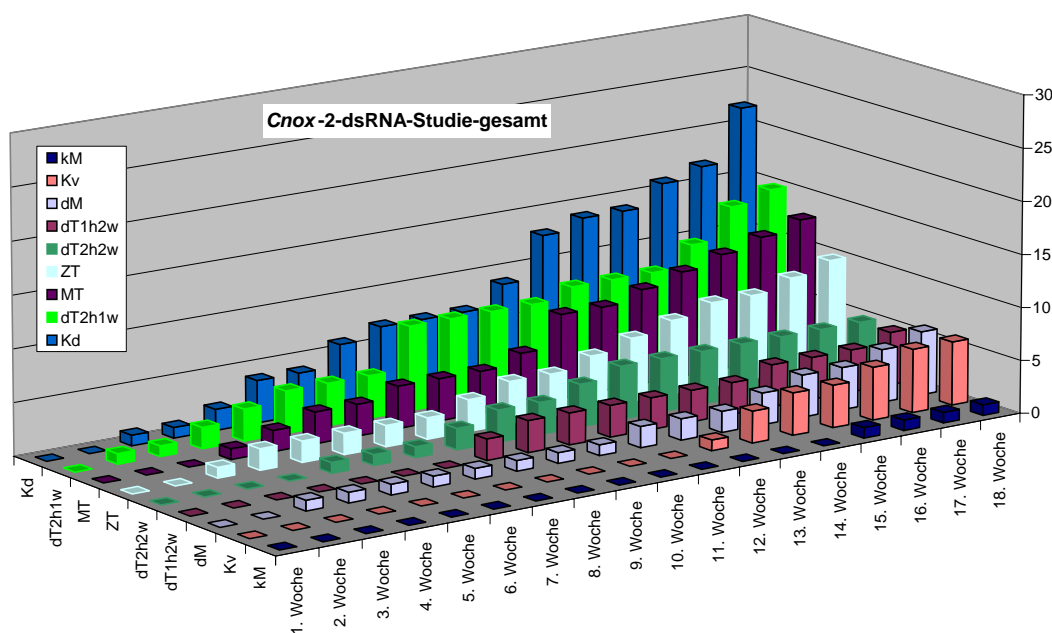


Abb. 3.49 Zeitlicher Verlauf der Zunahme an PAMs in allen neun Merkmalskategorien in den *Cnox-2*-RNAi-Versuchsreihen aufsummiert. Die Anzahl der PAMs ist in absoluten Zahlen aufgetragen.

In den *Cnox-2*-RNAi-Versuchsreihen betrafen nach Beendigung der Studie 57,8% (absolut: 48 PAMs; vgl. *Cnox-1*-Studien: ca. 87%) der phänotypischen Veränderungen Tentakelmerkmale. 42,2% der PAMs wiesen abnorme Strukturen an Merkmalskategorien der Körperachse auf (absolut: 35 PAMs; vgl. *Cnox-1*-Studien: 13,0%). Gleich den *Cnox-1*-Studien trat das Merkmal dT2h1w als erstes auf. Eine solche PAM konnte bereits in der zweiten Woche nach Versuchsbeginn detektiert werden. Die Merkmale ZT, dM und Kd waren zeitgleich schon in der dritten Woche zu beobachten. Die Anzahl der PAMs dieser Merkmalskategorien nahm nachfolgend kontinuierlich zu. Der Phänotyp kM wurde erst in der fünfzehnten Woche dokumentiert (vgl. Fig. 3.23). Bemerkenswerterweise gab es keinen signifikanten Zeitunterschied, wann Merkmalskategorien der beiden Gruppen (Tentakel- bzw. Achsenkategorien) erstmals auftraten.

3.2.2.3 *CNOX-2*-INHIBITION MITTELS MORPHOLINO-ANTISENSE-OLIGOS

3.2.2.3.1 QUANTITATIVE ANALYSE DER *CNOX-2*-MORPHOLINO-GEN-INHIBITION

In allen drei Versuchsreihen unterschieden sich nach 18 Wochen die beiden Kontrollansätze signifikant vom Experimentalansatz (n= 61; Wilcoxon-Test für gepaarte Stichproben, p< 0,05). Die Versuchsdauer und die Anzahl der PAMs sind, gleich den zuvor beschriebenen Studien, eindeutig signifikant positiv korreliert. Die Befunde der drei *Cnox-2*-Morpholino-Versuchsreihen wiesen sowohl im Vergleich mit der *Cnox-2*-dsRNA-Studie als auch im Vergleich untereinander deutliche Korrelationen auf. Mindestens 50% aller Medusen der *Cnox-2*-Morpholino-Experimentalansätze hatten nach Ende der Studie phänotypisch abnorme Körperstrukturen ausgebildet (2. Versuchsreihe; absolut: 16 PAMs). Die 3. Versuchsreihe wies am Ende 56,8% an PAMs auf (absolut: 21 PAMs); in der 1. Versuchsreihe lag der Anteil an PAMs mit 64,9% (absolut: 24 PAMs) am höchsten. Das statistische Mittel der drei Reihen lag mit über 57,5% (61 PAMs von 106 Medusen insgesamt) aber niedriger als bei der *Cnox-2*-dsRNA-Studie (66,4%). Aus den Steigungen der Regressionsgeraden der gesamten drei Versuchseihen

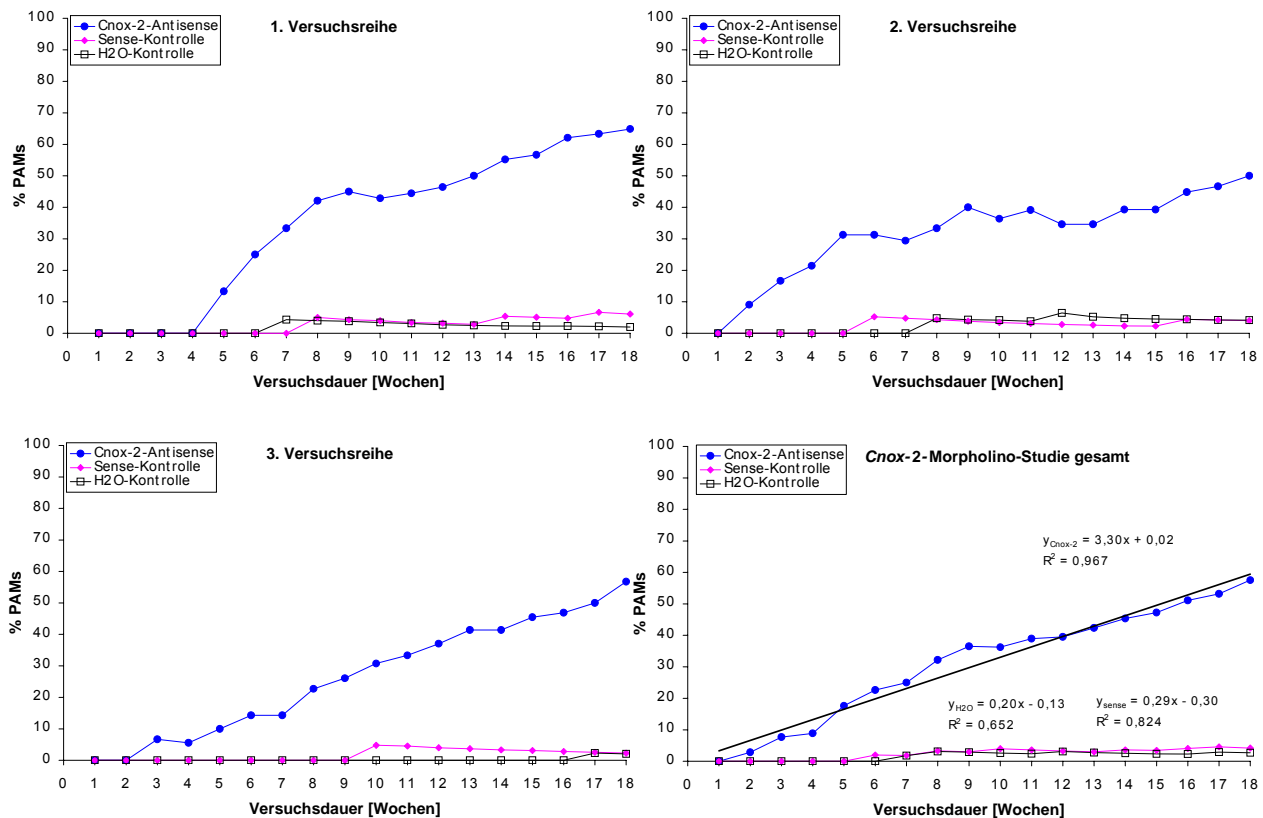


Abb. 3.50 Einfluss der *Cnox-2*-Inhibition via Morpholino-Antisense-Oligos auf die Entstehungsrate von PAMs bei *E. dichotoma*. Aufgetragen ist der prozentuale Anteil an PAMs gegen die Versuchsdauer. Der Graph rechts unten zeigt eine Zusammenfassung von allen drei Versuchsreihen; die Steigungen (Regressionskoeffizienten) der Regressionsgeraden geben die prozentuale Zunahme an PAMs pro Zeiteinheit an; R= Korrelationskoeffizient.

(*Cnox-2*-Experimentalansatz: $y_{Cnox-2} = 3,30x$; Meerwasser-Kontrolle: $y_{H_2O} = 0,20x$; Sense-Kontrolle: $y_{sense} = 0,29x$; vgl. Abb. 3.50) lässt sich ersehen, dass der prozentuale Anteil an PAMs in den Experimentalansätzen gegenüber den Kontrollen fast fünfzehnmal schneller ansteigt. In keinem der Meerwasser-Kontrollansätze lag der Anteil an PAMs am Ende der Versuchszeit über 5% (Mittelwert: 2,7%), in den Sense-Kontrollansätzen nicht über 7% (Mittelwert: 4,2%; vgl. Kap. 3.2.1.3.1). Gleich der *Cnox-2*-dsRNA-Studie trat in der ersten Woche in keiner der drei Versuchsreihen eine phänotypisch sichtbare Veränderung auf Medusenebene auf. In der zweiten Woche konnte im Experimentalansatz der 2. Versuchsreihe die erste PAM dokumentiert werden. In der dritten bzw. erst in der fünften Woche verzeichneten auch die beiden anderen Versuchsansätze die ersten PAMs. Die Anzahl der PAMs aller drei Versuchsreihen beschrieb nachfolgend in den Experimentalansätzen einen konstanten Anstieg.

3.2.2.3.2 QUALITATIVE ANALYSE DES *CNOX-2*-MORPHOLINO-GEN-INHIBITION

In den *Cnox-2*-Versuchsreihen der Morpholino-Studie war, gleich der *Cnox-2*-RNAi-Studie, das Merkmal Kd am häufigsten und das Merkmal dT2h1w am zweithäufigsten vertreten (vgl. Abb. 3.52 und Abb. 3.55). Die Adspektion der Tiere ergab, dass nach Versuchsende mehr als $\frac{1}{3}$ aller PAMs (absolut: 21) Deformationen der Körperachse und 18,0% der PAMs (absolut: 11) doppelte Tentakel mit zwei Haftästen und einem Wehrast aufwiesen. Neunmal (14,8%) konnte das Merkmal dM und jeweils sechsmal (9,8%) konnte das Merkmal ZT bzw. MT detektiert werden. Nur in einem Versuchsansatz wurde eine Meduse ohne Manubrium gefunden. Wie in der *Cnox-2*-RNAi-Studie waren alle neun Merkmalskategorien vertreten (vgl. Tab. 3.17)

Versuchsreihe:	1.	2.	3.	ges.
dT2h1w:	5	3	3	11
dT1h2w:	1	1	2	4
dT2h2w:	0	2	1	3
ZT:	3	1	2	6
MT:	4	1	1	6
Kv:	1	0	1	2
Kd:	6	7	8	21
dM:	4	1	2	7
kM:	0	0	1	1
Normal:	14	16	15	45
M-gesamt:	38	32	36	106
PAMs:	24	16	21	61
% -PAMs:	63,2	50	58,3	57,5

Tab. 3.17 Anzahl phänotypisch abnormer Medusen der *Cnox-2*-Morpholino-Versuchsreihen am Ende der Studie.

Interessanterweise betrafen die Veränderungen am Habitus nach Beendigung der Studie bei fast genau der Hälfte aller PAMs Tentakelmerkmale (49,2%; absolut: 30) bzw. Achsenmerkmale (absolut: 31). In der *Cnox-2*-RNAi-Studie überwog die Anzahl der PAMs mit tentakelabnormen Strukturen im Vergleich deutlich (57,8%; absolut: 48). Nicht wie in allen zuvor beschriebenen Studien war das Merkmal dT2h1w als erstes zu detektieren, sondern ein Tier mit Deformationen an der Körperachse (Kd). Schon in der zweiten Woche nach Beginn der Studie konnte ein

solches Merkmal dokumentiert werden. Die Merkmale dT2h1w und MT waren zeitgleich schon in der dritten, die Merkmale ZT und dM bereits in der fünften Woche zu beobachten. Die Anzahl der PAMs dieser Merkmalskategorien nahm nachfolgend stetig zu. Erst in der fünfzehnten Woche konnte ein Tier der Merkmalskategorie kM gefunden werden. Wie in der *Cnox-2*-RNAi-Studie gab es keinen signifikanten Zeitunterschied, wann Merkmalskategorien der beiden Gruppen (Tentakel- bzw. Achsenkategorien) erstmals auftraten (vgl. Abb. 3.51).

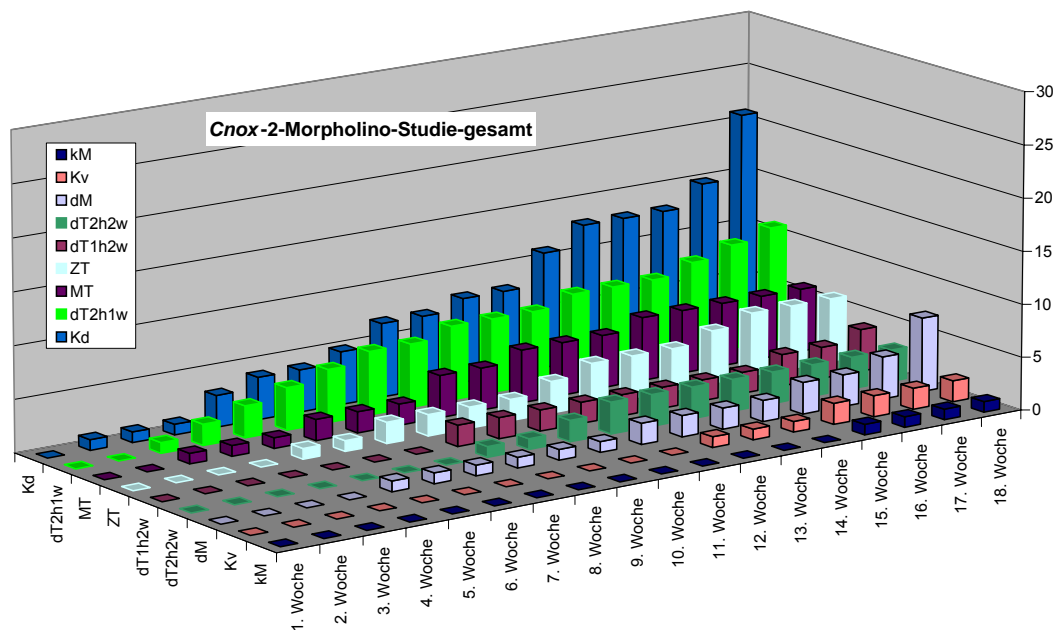


Abb. 3.51 Zeitlicher Verlauf der Zunahme an PAMs in allen neun Merkmalskategorien in den *Cnox-2*-Morpholino-Versuchsreihen aufsummiert. Die Anzahl der PAMs ist in absoluten Zahlen aufgetragen.

3.2.2.4 EXEMPLARISCHE DARSTELLUNG DER PAMS DER *CNOX-2*-STUDIEN



Abb. 3.52 Meduse von *E. dichotoma* aus den *Cnox-2*-Inhibitionsstudien. Deformation der Aboral-Oral-Achse (Kd) und die Radiärsymmetrie ist gestört. Das phänotypisch abnorme Merkmal wurde in der zweiten Woche nach Beginn des Experiments dokumentiert (Aboral-Ansicht bei 40-facher Vergrößerung).



Abb. 3.53 Meduse von *E. dichotoma* aus den *Cnox-2*-Inhibitionsstudien. Mehrere Tiere sind verwachsen (Kv) und es ist nicht mehr möglich die Grenze zwischen Tochtermeduse und Elter zu definieren (siehe Pfeilmarkierung). Das phänotypisch abnorme Merkmal wurde in der zwölften Woche nach Beginn des Experiments dokumentiert (Aboral-Ansicht bei 30-facher Vergrößerung).

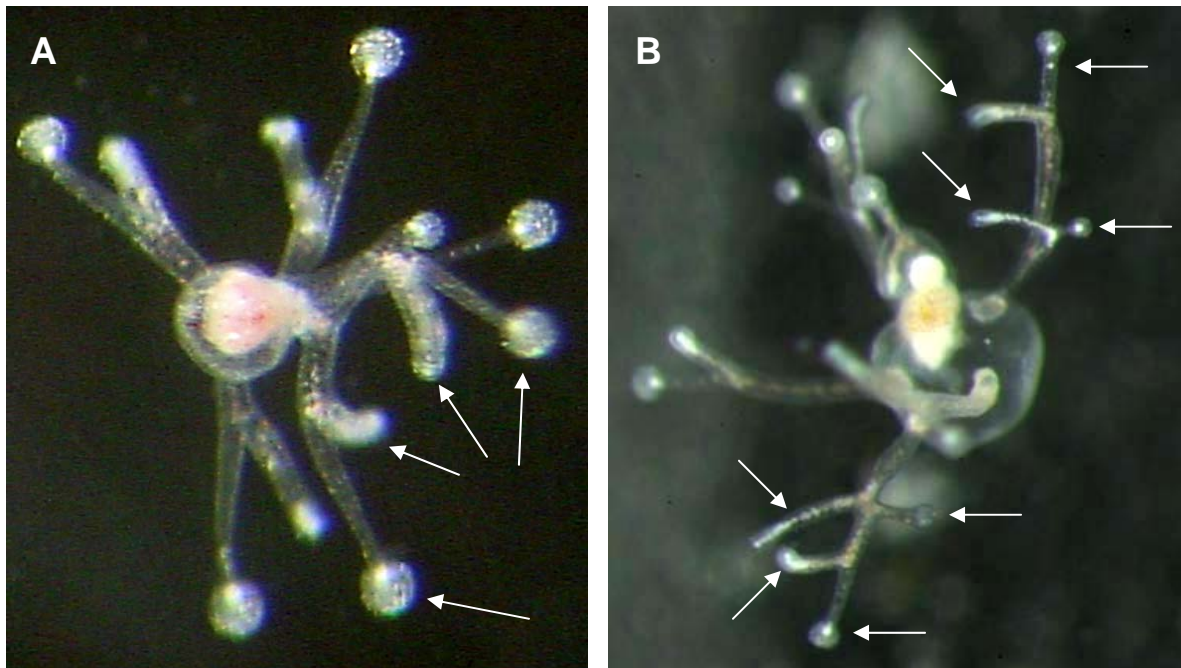


Abb. 3.54 Medusen von *E. dichotoma* aus den *Cnox-2*-Inhibitionsstudien. Ausbildung eines doppelten Tentakels mit zwei Haft- und zwei Wehrästen (A; dT2h2w) und Ausbildung von zwei doppelten Tentakeln mit jeweils zwei Haft- und zwei Wehrästen (B; siehe Pfeilmarkierungen). Bei beiden Tieren ist zudem der Brutraum überdimensioniert. Die phänotypisch abnormen Merkmale wurden in der siebten bzw. zehnten Woche nach Beginn des Experiments dokumentiert (Aboral-Ansicht bei 40-facher Vergrößerung).

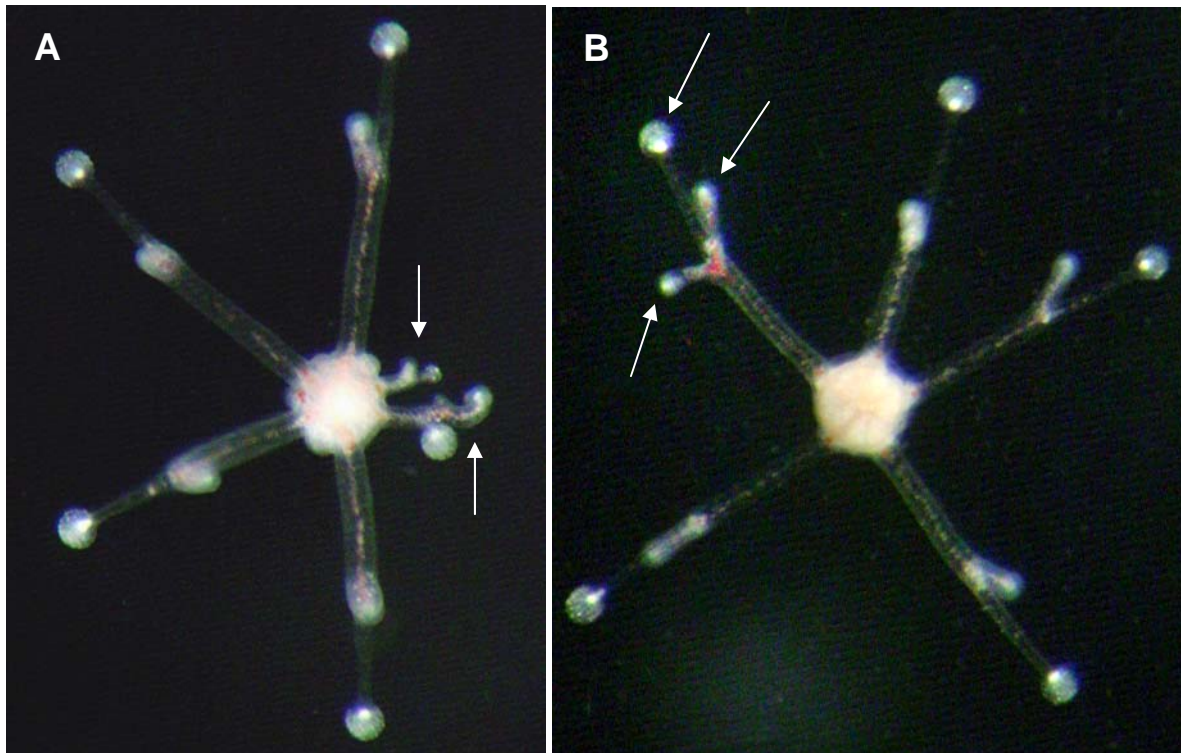


Abb. 3.55 Medusen von *E. dichotoma* aus den *Cnox-2*-Inhibitionsstudien. Ausbildung von zwei Zwerg-Tentakeln (A; ZT) und Ausbildung eines doppelten Tentakels mit zwei Haftästen und einem Wehrast (B; dT2h1w; siehe Pfeilmarkierungen). Die phänotypisch abnormen Merkmale wurden beide in der sechsten Woche nach Beginn des Experiments dokumentiert (Aboral-Ansicht bei 40-facher Vergrößerung).

3.2.3 UNTERSUCHUNGEN AM *CNOX-3*-GEN

3.2.3.1 EXPRESSIONSSTUDIEN

Die Untersuchungen zur *Cnox-3*-Expression in *E. dichotoma* ergaben, dass das Gen offensichtlich nur in der Medusengeneration exprimiert wird. In allen anderen Stadien des Lebenszyklus von *Eleutheria* konnte keine Expression nachgewiesen werden. Mit der Antisense-Sonde konnten für beide Detektions-Methoden distinkte und problemlos reproduzierbare Expressionsmuster gefunden werden. Alle mit der Sense-Sonde (Kontrolle) behandelten Tiere zeigten keine Expressionssignale. Die *Cnox-3*-Signalantwort war in jedem Tier immer gleich, die Hintergrundfärbung bei beiden Detektionsmethoden gering und zweifelsfrei von den Expressionssignalen differenzierbar.

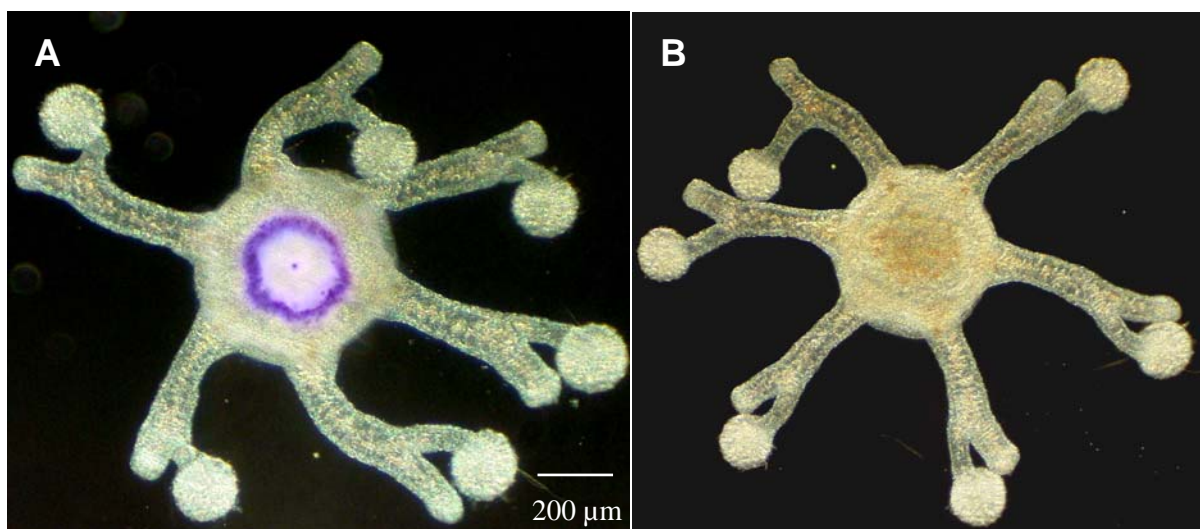


Abb. 3.56 Medusen von *Eleutheria dichotoma*. Durchlichtmikroskopische Aufnahmen im Phasenkontrast. Expression des *Cnox-3*-Gens detektiert mittels NBT/X-Phosphat-Färbung (A). Das Gen wird oral und ringförmig um das Manubrium des Tieres exprimiert. Die Sense-Kontrolle (B) zeigt keinerlei Farbsignale.

Die *Cnox-3*-Expression beschreibt ein regelmäßig-rundes Muster um das am oralen Pol lokalisiert liegende Manubrium. Die Breite des Expressionsrings beträgt im Maximum ca. 15 Zellen und ist damit deutlich ausgedehnter als die dünnere, kreisförmige Signalantwort des *Cnox-1*-Gens (4-6 Zellen breit; vgl. Kap. 3.2.1.1). Im Vergleich zum *Cnox-1*-Gen liegt das *Cnox-3*-Expressionsmuster zudem mit einem etwa halb so großen Durchmesser zentripetal ins Meduseninnere versetzt (vgl. Abb. 3.56 und 3.57). Die Auswertung histologischer Längsschnitte ergab, dass die *Cnox-3*-exprimierenden Zellen eindeutig dem Ektoderm zuzuordnen sind. Es handelt sich hierbei nicht um Zellen des Nesselkanals, sondern um Ektodermzellen, die den unteren Basisrand des Manubriums säumen (vgl. Abb. 3.58).

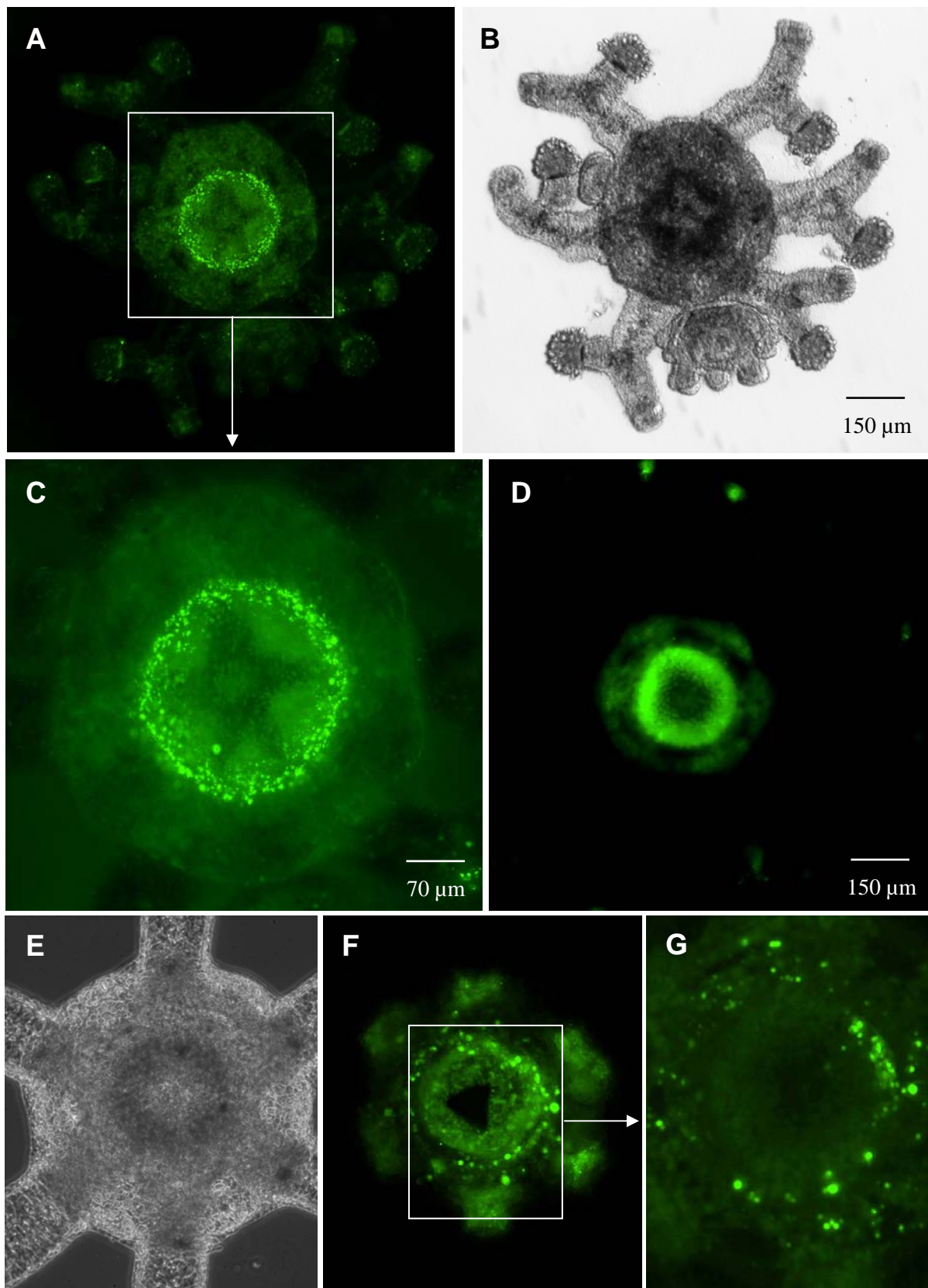


Abb. 3.57 Expression des *Cnox-3*-Gens bei drei Medusen von *Eleutheria dichotoma*, detektiert mittels Fluoreszein markierter Sonden (**A**, **C**, **D**, **F** & **G**). Die Expression des Gens beschreibt eine distinkte Ringform an der oralen Unterseite der Meduse um die Basis des Manubriums. Die Anzahl der Zellen mit Signal variiert von Tier zu Tier zuweilen stark (vgl. **A**, **D** & **F**). In den Durchlichtaufnahmen (**B** & **E**) lassen sich die Zellen mit positiver Signalantwort im Hinblick auf die gesamte Körperorganisation einordnen. **A**, **B** und **C**, **D** bzw. **E**, **F** und **G** zeigen das gleiche Tier; Oral-Ansichten.

Alle untersuchten Medusen ($n > 50$) zeigten das genannte *Cnox-3*-Expressionsmuster, zuweilen war aber die Anzahl der Zellen mit positiver Signalantwort im Expressionsring niedriger als auf den dargestellten Abbildungen 3.56 und 3.57 A, C und D (vgl. Abb. 3.57 F und G).

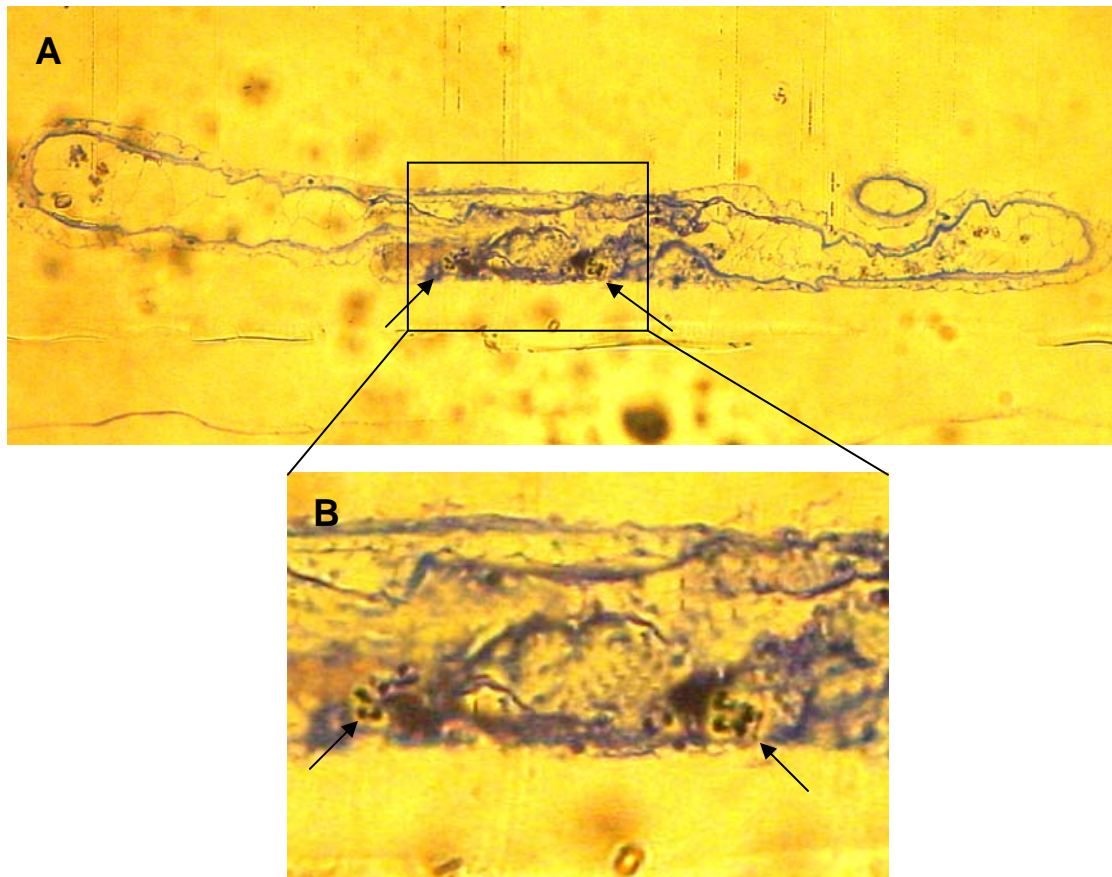


Abb. 3.58 A Histologischer Längsschnitt durch eine Meduse von *Eleutheria dichotoma*. *Cnox-3*-exprimierende Ektodermzellen am oralen Pol des Tieres (**A**; siehe Pfeilmarkierungen). **Abb. 3.58 B** zeigt eine Detailansicht des Schnittpräparats.

3.2.3.2 *CNOX-3*-INHIBITION MITTELS dsRNA

3.2.3.2.1 QUANTITATIVE ANALYSE DES *CNOX-3*-RNAi-KNOCK-DOWNS

Die drei *Cnox-3*-Versuchsreihen des RNAi-Gen-Knock-Downs zeigten sehr ähnliche Ergebnis-Tendenzen. In allen drei Reihen unterschieden sich die beiden Kontrollansätze signifikant vom Experimentalansatz ($n=64$; Wilcoxon-Test, $p < 0,05$). Die Versuchsdauer und die Anzahl an PAMs sind gleichsam signifikant positiv korreliert. Im Vergleich zu den Versuchsreihen der RNAi-Studien des *Cnox-1*- bzw. des *Cnox-2*-Gens lag der prozentuale Anteil an PAMs im Mittel deutlich niedriger ($\bar{x} = 50,8\%$; vgl. *Cnox-1*: $\bar{x} = 71,3\%$, *Cnox-2*: $\bar{x} = 66,4\%$). Die drei *Cnox-3*-RNAi-Experimentalansätze wiesen nach Beendigung der Studie jedoch alle mehr als 47% phänotypisch abnormale Medusen auf (minimal 47,7%; 2. Versuchsreihe). In der 1. Versuchsreihe lag der Anteil der Tiere mit abnormem Habitus bei 51,2% (absolut: 22), in der 3. Versuchsreihe mit 53,8% am höchsten (absolut: 21 PAMs). Die Steigungen der Regressionsgeraden der gesamten drei Versuchseihen (*Cnox-3*-Experimentalansatz: $y_{Cnox-3} = 3,39x$; Meerwasser-Kontrolle: $y_{H_2O} = 0,20x$; dsRNA-Kontrolle: $y_{dsRNA} = 0,16x$; vgl. Abb. 3.59) belegen, dass der prozentuale Anteil an PAMs in den Experimentalansätzen gegenüber den Kontrollen fast

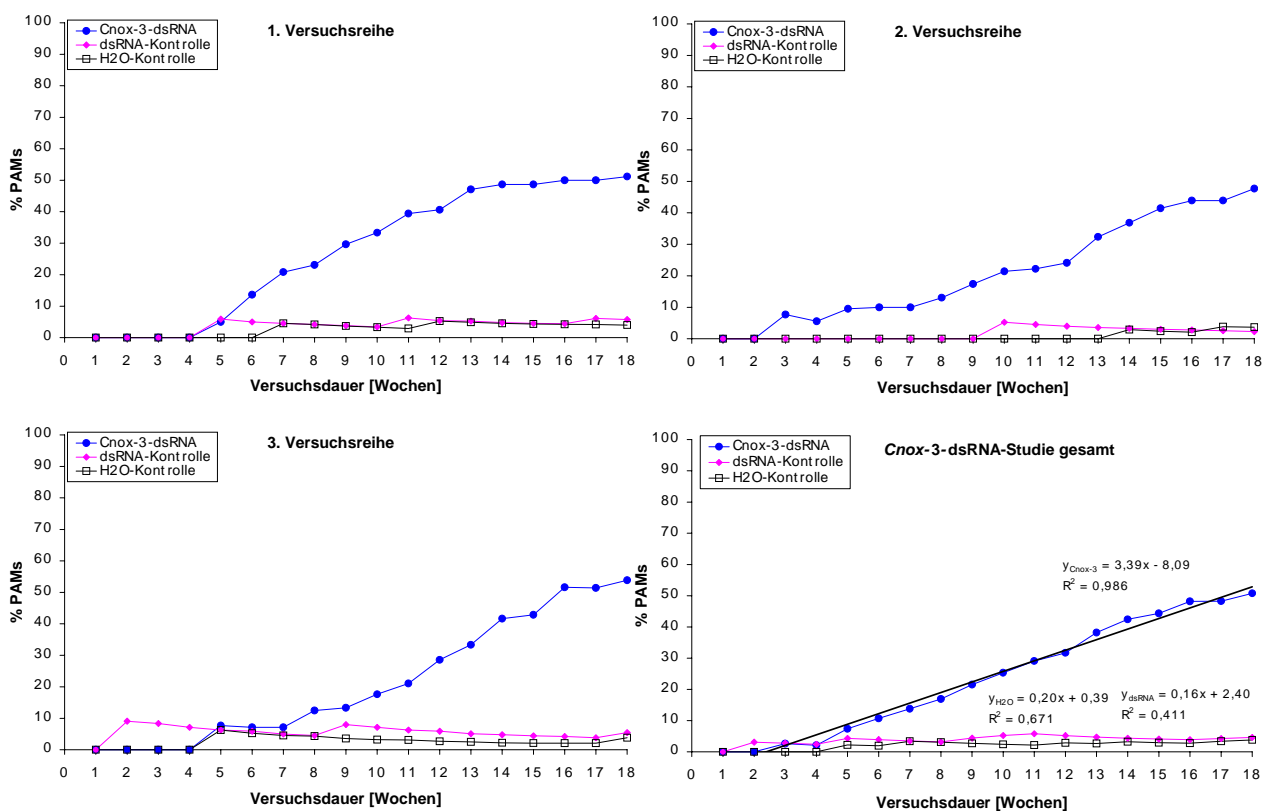


Abb. 3.59 Einfluss der *Cnox-3*-Inhibition via RNAi auf die Entstehungsrate von PAMs bei *E. dichotoma*. Aufgetragen ist der prozentuale Anteil an PAMs gegen die Versuchsdauer. Der Graph rechts unten zeigt eine Zusammenfassung von allen drei Versuchsreihen; die Steigungen (Regressionskoeffizienten) der Regressionsgeraden geben die prozentuale Zunahme an PAMs pro Zeiteinheit an; R= Korrelationskoeffizient.

zwanzigmal schneller zunimmt. In den ersten beiden Wochen der Studie trat in keiner der drei Versuchsreihen eine phänotypisch sichtbare Veränderung bei einer Meduse auf. In der dritten Woche konnte in der 2. Versuchsreihe eine PAM dokumentiert werden. In der fünften Woche verzeichneten auch die beiden anderen Versuchsreihen die ersten Medusen mit abnormem Habitus. Die Anzahl der PAMs nahm nachfolgend in den drei Experimentalansätzen kontinuierlich zu.

3.2.3.2.2 QUALITATIVE ANALYSE DES *CNOX-3*-RNAi-KNOCK-DOWNS

In den *Cnox-3*-Versuchsreihen der RNAi-Studie war das Merkmal dM am häufigsten vertreten. Nach Versuchsende zeigten knapp die Hälfte aller PAMs (absolut: 30) diese abnorme Körperstruktur. In jedem der drei Experimentalansätze waren zehn PAMs dieser Merkmalskategorie zu finden. Am zweithäufigsten war das Merkmal Kd zu beobachten, 27,4% der PAMs (absolut: 17) wiesen diese phänotypische Veränderung auf. Immerhin 10,9% der PAMs (absolut: 7) zeigten das Merkmal Kv, 9,4% der PAMs (absolut: 6) das Merkmal ZT. Nur jeweils zwei Tiere hatten einen doppelten Tentakel mit zwei Haft- und einem bzw. zwei Wehrästen ausgebildet. Die Merkmale dT1h2w, MT und kM waren in keiner der drei Versuchsreihen vertreten (vgl. Tab. 3.18). Darüber hinaus zeigte keine andere Studie eine derartige Dominanz einer einzelnen Merkmalskategorie (dM; 46,9%). In den drei Versuchsreihen betrafen nach Beendigung der Studie 84,4% (absolut: 54) abnorme Achsenstrukturen, nur 15,6% der PAMs wiesen phänotypische Veränderungen an Merkmalskategorien der Tentakel auf (vgl. Abb. 3.63 - Abb. 3.66).

Versuchsreihe:	1.	2.	3.	ges.
dT2h1w:	1	0	1	2
dT1h2w:	0	0	0	0
dT2h2w:	0	1	1	2
ZT:	6	0	0	6
MT:	0	0	0	0
Kv:	0	6	1	7
Kd:	5	4	8	17
dM:	10	10	10	30
kM:	0	0	0	0
Normal:	21	24	17	62
M-gesamt:	43	45	38	126
PAMs:	22	21	21	64
% -PAMs:	51,2	46,7	55,3	50,8

Tab. 3.18 Anzahl phänotypisch abnormer Medusen der *Cnox-3*-RNAi-Versuchsreihen am Ende der Studie.

In der dritten Woche nach Versuchsbeginn trat das Merkmal Kd als erstes auf. In der fünften Woche konnten die Merkmale dM und ZT zeitgleich als zweites dokumentiert werden. Erst in der achten Woche wurden PAMs der Merkmalskategorien Kv und dT2h1w beobachtet. Das Merkmal dT2h2w wurde in der dreizehnten Woche als letztes detektiert. Das zeitlich erstmalige auftreten von PAMs beider Gruppierungen (Achsen- und Tentakelkategorien) war nicht signifikant unterschiedlich (vgl. Abb. 3.60).

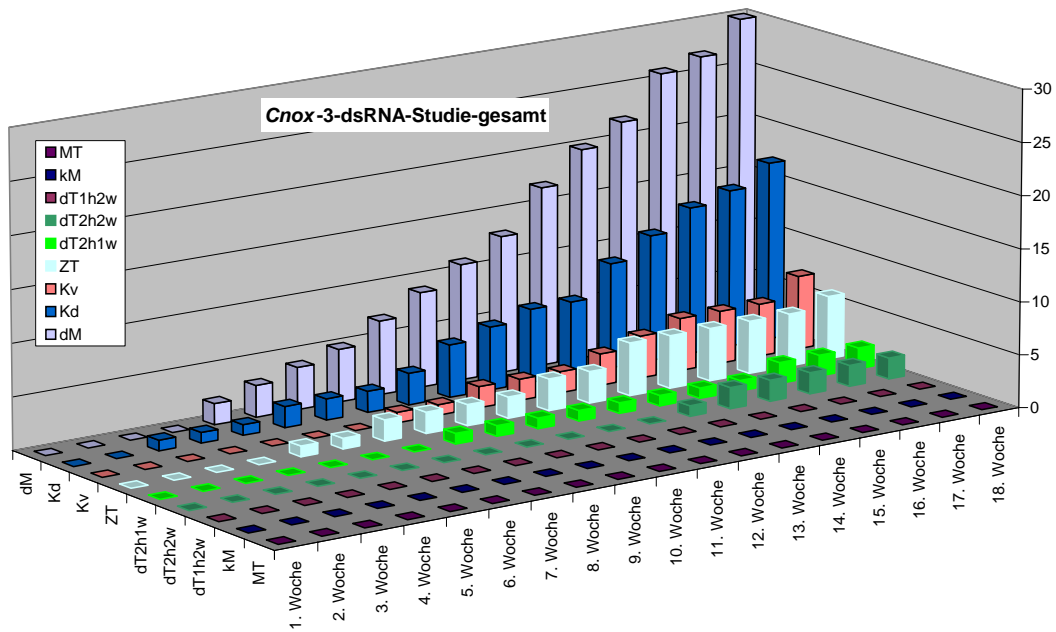


Abb. 3.60 Zeitlicher Verlauf der Zunahme an PAMs in allen neun Merkmalskategorien in den *Cnox-3*-RNAi-Versuchsreihen aufsummiert. Die Anzahl der PAMs ist in absoluten Zahlen aufgetragen.

3.2.3.3 *CNOX-3*-INHIBITION MITTELS MORPHOLINO-ANTISENSE-OLIGOS

3.2.3.3.1 QUANTITATIVE ANALYSE DER *CNOX-3*-MORPHOLINO-GEN-INHIBITION

Nach 18 Wochen Versuchsdauer unterschieden sich in allen drei *Cnox-3*-Versuchsreihen die beiden Kontrollansätze signifikant vom Experimentalansatz (n= 46; Wilcoxon-Test, p< 0,05). Die Versuchsdauer und die Anzahl der PAMs sind, gleich den zuvor beschriebenen Studien, eindeutig signifikant positiv korreliert. Die Befunde der Morpholino-Versuchsreihen zeigten, sowohl im Vergleich mit der *Cnox-3*-RNAi-Studie als auch im Vergleich untereinander ein ähnliches Ergebnismuster. Mit 42,6% PAMs wies die *Cnox-3*-Morpholino-Studie im Vergleich zur *Cnox-3*-RNAi-Studie ($\bar{x} = 50,8\%$) im Mittel einen niedrigeren Wert auf (46 PAMs von 108 Medusen insgesamt). In der 1. Versuchsreihe lag der Anteil phänotypisch abnormer Tiere mit 39,5% (absolut: 15 PAMs) am niedrigsten. In der 3. Versuchsreihe wurden am Ende 40,0% Tiere mit abnormen Habitus dokumentiert (absolut: 12 PAMs); in der 3. Versuchsreihe lag der Anteil an PAMs mit 47,5% (absolut: 19 PAMs) am höchsten. Aus den Steigungen der Regressionsgeraden der gesamten drei Versuchseihen (*Cnox-3*-Experimentalansatz:

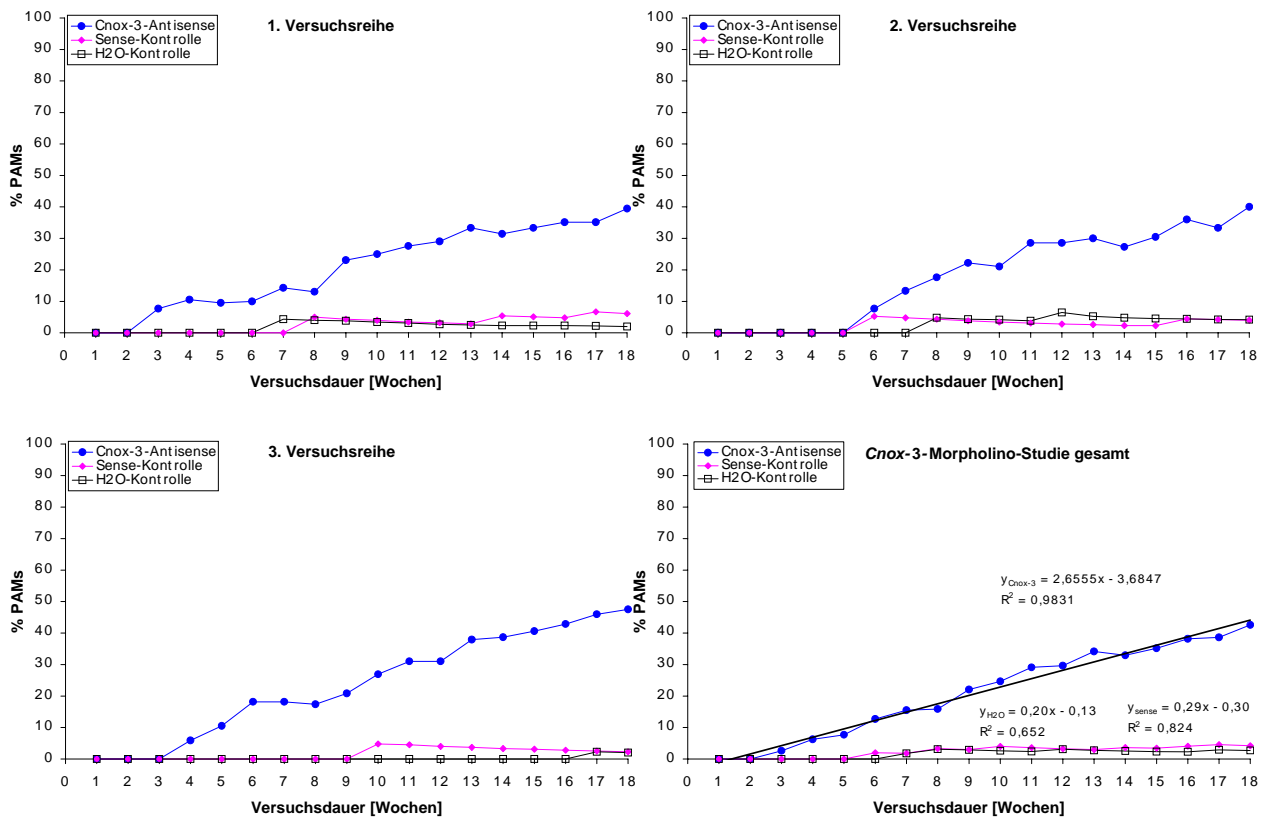


Abb. 3.61 Einfluss der *Cnox-3*-Inhibition via Morpholino-Antisense-Oligos auf die Entstehungsrate von PAMs bei *E. dichotoma*. Aufgetragen ist der prozentuale Anteil an PAMs gegen die Versuchsdauer. Der Graph rechts unten zeigt eine Zusammenfassung von allen drei Versuchsreihen; die Steigungen (Regressionskoeffizienten) der Regressionsgeraden geben die prozentuale Zunahme an PAMs pro Zeiteinheit an; R= Korrelationskoeffizient.

$y_{Cnox-3} = 2,66x$; Meerwasser-Kontrolle: $y_{H_2O} = 0,20x$; Sense-Kontrolle: $y_{sense} = 0,29x$; vgl. Abb. 3.50) lässt sich ableiten, dass der prozentuale Anteil an PAMs in den Experimentalansätzen gegenüber den Kontrollen etwa zehnmal schneller ansteigt. In keinem der Meerwasser-Kontrollansätze lag der Anteil an PAMs am Ende der Versuchszeit über 5% (Mittelwert: 2,7%), in den Sense-Kontrollansätzen nicht über 7% (Mittelwert: 4,2%; vgl. Kap. 3.2.1.3.1). Gleich der *Cnox-3*-RNAi-Studie trat in den ersten beiden Wochen in keiner der drei Versuchsreihen eine phänotypisch sichtbare Veränderung auf Medusenebene auf. In der dritten Woche konnte im Experimentalansatz der 1. Versuchsreihe die erste PAM dokumentiert werden. In der vierten bzw. erst in der sechsten Woche verzeichneten auch die beiden anderen Versuchsansätze die ersten PAMs. Die Anzahl der PAMs aller drei Versuchsreihen beschrieb nachfolgend in den Experimentalansätzen einen kontinuierlichen Anstieg (vgl. Abb. 3.61).

3.2.3.3.2 QUALITATIVE ANALYSE DER *CNOX-3*-MORPHOLINO-GEN-INHIBITION

Im Unterschied zur *Cnox-3*-RNAi-Studie traten in den Versuchsreihen der *Cnox-3*-Morpholino-Studie PAMs mit deformierter Achse (Kd) am häufigsten auf. Im Mittel zeigten 37,0% der PAMs (absolut: 17) dieses Merkmal. In Anlehnung an die RNAi-Studie waren mit 34,8% PAMs (absolut: 16) vergleichsweise wenige Tiere mit doppeltem Manubrium zu detektieren (vgl. Abb. 3.63 bis Abb. 3.65). Insgesamt sechsmal wurde das Merkmal Kv und jeweils dreimal das Merkmal ZT bzw. dT2h1w gefunden. Nur eine PAM bildete einen doppelten Tentakel mit zwei Haft- und zwei Wehrästen (dT2h2w) aus. Gleich der *Cnox-3*-RNAi-Studie konnten keine PAMs der Merkmalskategorien MT, dT1h2w und kM dokumentiert werden (vgl. Tab. 3.19). In den drei Versuchsreihen betrafen nach Beendigung der Untersuchungen 84,8% (absolut: 39) Veränderungen an Achsenmerkmalen und entsprechend nur 15,2% der PAMs wiesen tentakelabnorme Strukturen auf. Diese Befunde sind denen der *Cnox-3*-RNAi-Studie fast identisch.

Versuchsreihe:	1.	2.	3.	ges.
dT2h1w:	1	1	1	3
dT1h2w:	0	0	0	0
dT2h2w:	0	0	1	1
ZT:	1	0	2	3
MT:	0	0	0	0
Kv:	2	1	3	6
Kd:	5	5	7	17
dM:	6	5	5	16
kM:	0	0	0	0
Normal:	23	18	21	62
M-gesamt:	38	30	40	108
PAMs:	15	12	19	46
% -PAMs:	39,5	40	47,5	42,6

Tab. 3.19 Anzahl phänotypisch abnormer Medusen der *Cnox-3*-Morpholino-Versuchsreihen am Ende der Studie.

Wie die Abbildung 3.62 illustriert trat das Merkmal Kd in der dritten Woche zeitlich als erstes auf. PAMs der Merkmalskategorien dM und Kv waren zeitgleich bereits eine Woche später zu detektieren. Die Anzahl der PAMs dieser Merkmals-

kategorien nahm nachfolgend stetig zu. In der fünften Woche nach Beginn des Experiments konnte ein Tier mit Zwergtentakeln erstmals dokumentiert werden. Vernachlässigt man diese einzelne PAM gab es einen signifikanten Zeitunterschied, wann Merkmalskategorien der beiden Gruppen (Tentakel- bzw. Achsenkategorien) erstmals auftraten. Denn Tiere mit doppeltem Tentakel (dT2h1w bzw. dT2h2w) konnten frühestens in der neunten Woche gefunden werden (vgl. Abb. 3.62).

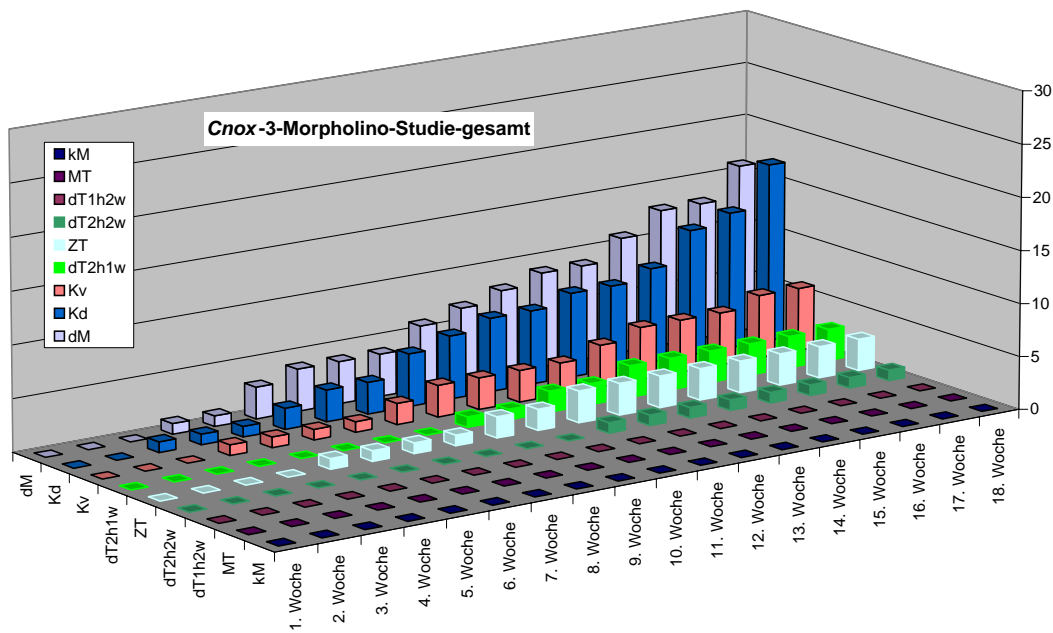


Abb. 3.62 Zeitlicher Verlauf der Zunahme an PAMs in allen neun Merkmalskategorien in den *Cnox-3*-Morpholino-Versuchsreihen aufsummiert. Die Anzahl der PAMs ist in absoluten Zahlen aufgetragen.

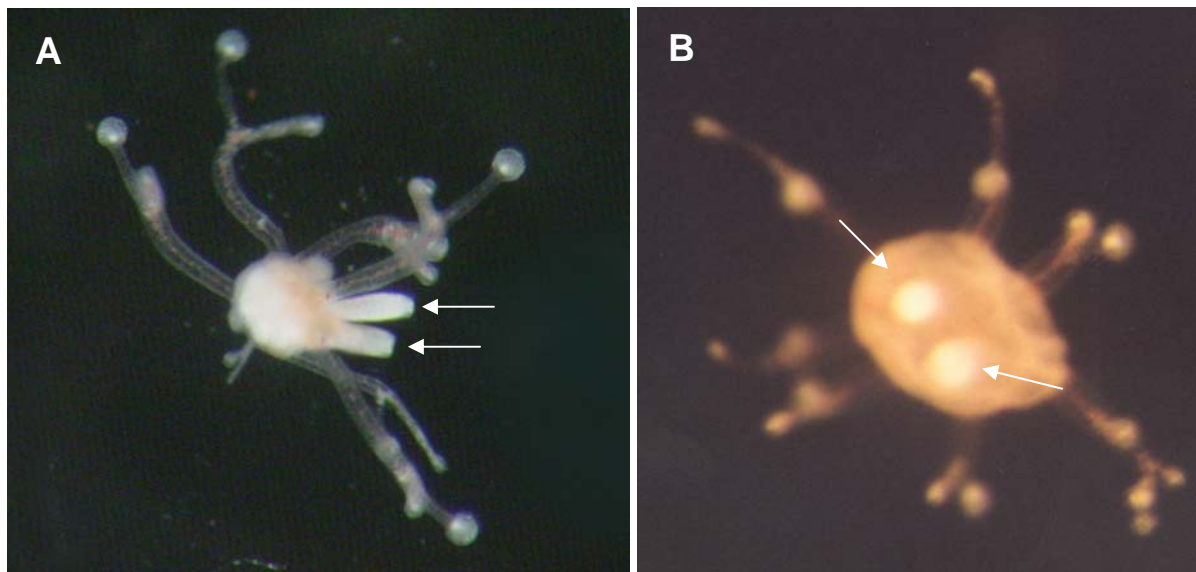
3.2.3.4 EXEMPLARISCHE DARSTELLUNG DER PAMS DER *CNOX-3*-STUDIEN

Abb. 3.63 Medusen von *E. dichotoma* aus den *Cnox-3*-Inhibitionsstudien. Ausbildung von zwei Manubrien (dM; siehe Pfeilmarkierungen). Beide Manubrien sind ausgestülpt und voll funktionsfähig (**A**; Lateral-Ansicht). **B** zeigt ein Tier direkt nach der Fütterung (Oral-Ansicht). Die phänotypisch abnormen Merkmale wurden in der vierten bzw. sechsten Woche nach Beginn des Experiments dokumentiert (30-fache Vergrößerung).

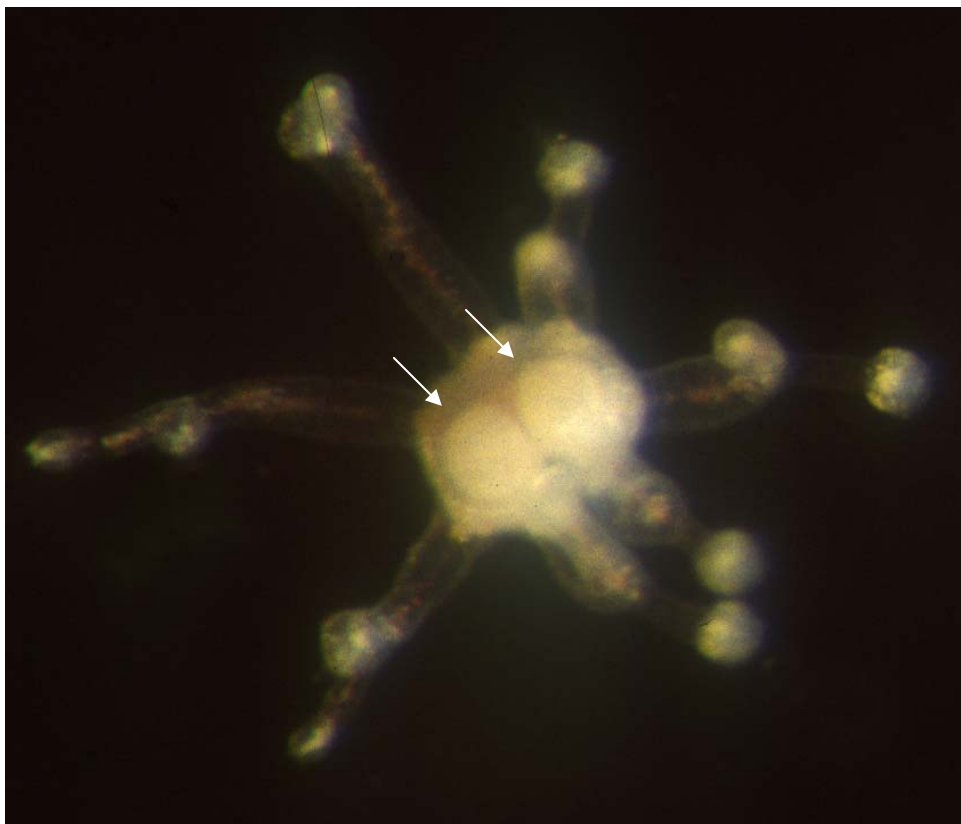


Abb. 3.64 Meduse von *E. dichotoma* aus den *Cnox-3*-Inhibitionsstudien. Ausbildung von zwei Manubrien (dM; siehe Pfeilmarkierungen). Beide Manubrien sind nicht ausgestülpt. Das phänotypisch abnorme Merkmal wurde in der zehnten Woche nach Beginn des Experiments dokumentiert (Oral-Ansicht bei 40-facher Vergrößerung).

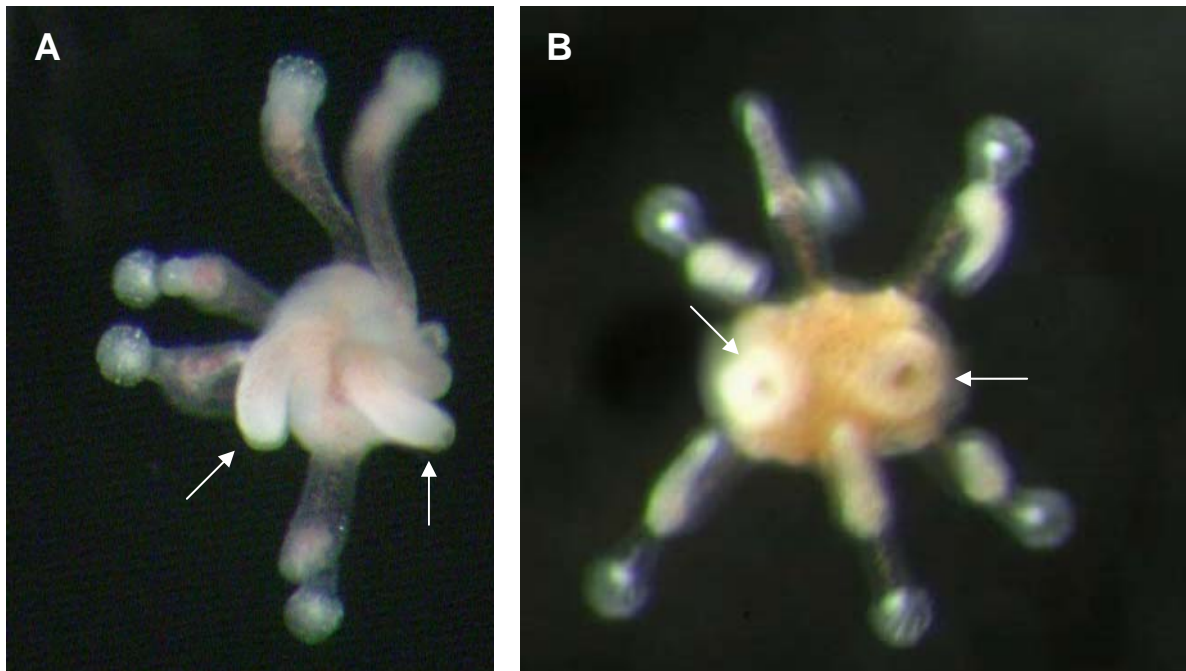


Abb. 3.65 Medusen von *E. dichotoma* aus den *Cnox-3*-Inhibitionsstudien. Ausbildung von zwei Manubrien (dM; siehe Pfeilmarkierungen). Beide Manubrien sind ausgestülpt (**A**) bzw. nicht ausgestülpt (**B**). Die phänotypisch abnormen Merkmale wurden in der siebten bzw. zehnten Woche nach Beginn des Experiments dokumentiert (Oral-Ansicht bei 40-facher Vergrößerung).

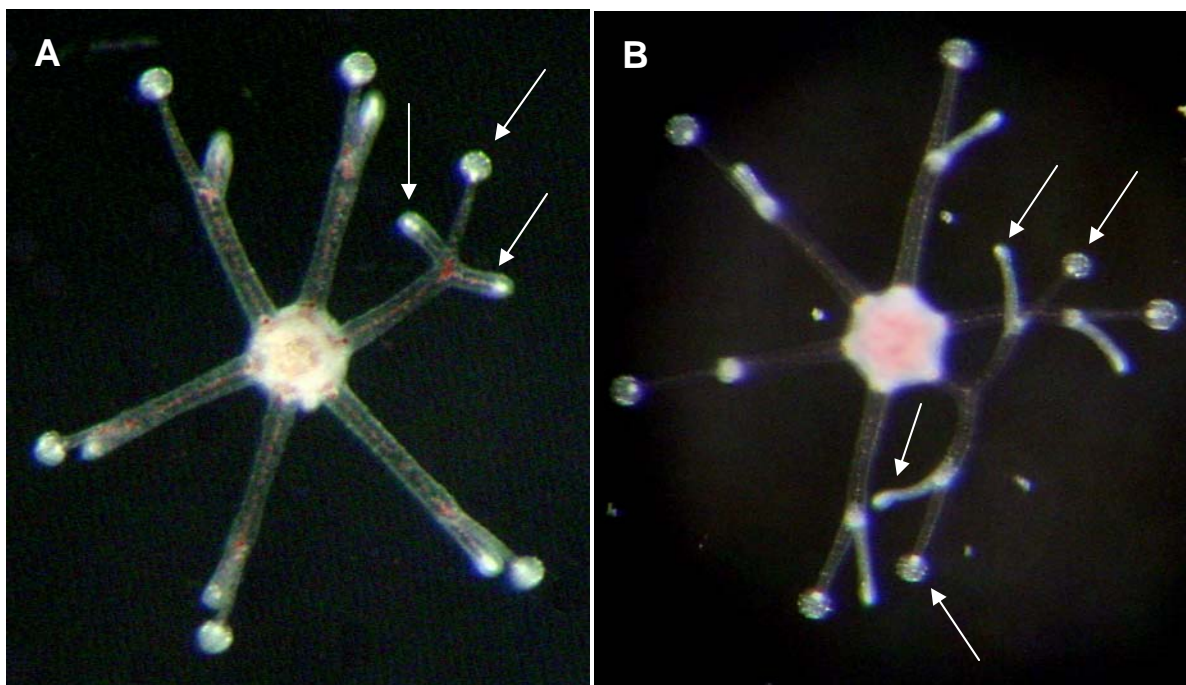


Abb. 3.66 Medusen von *E. dichotoma* aus den *Cnox-3*-Inhibitionsstudien. Ausbildung eines doppelten Tentakels mit zwei Haftästen und einem Wehrast (**A**) und Ausbildung eines doppelten Tentakels mit zwei Haft- und zwei Wehrästen (**B**; dT2h2w; siehe Pfeilmarkierungen). Die phänotypisch abnormen Merkmale wurden in der neunten bzw. elften Woche nach Beginn des Experiments dokumentiert (Aboral-Ansicht bei 30-facher Vergrößerung).

3.2.4 UNTERSUCHUNGEN AM *CNOX-4*-GEN

3.2.4.1 EXPRESSIONSSTUDIEN

Die Untersuchungen zur *Cnox-4*-Expression in *E. dichotoma* zeigten, dass das Gen nur in Primärpolypen exprimiert wird. In allen anderen Stadien des Lebenszyklus von *Eleutheria dichotoma* konnte keine Expression nachgewiesen werden. Besonders intensive Bemühungen ein Expressionsmuster in den Medusengenerationen zu finden blieben erfolglos (v.a. sich sexuell und vegetativ vermehrende Medusen). Dennoch zeigte eine RT-PCR mit aus Medusen isolierter cDNA als Templat ein sehr schwaches, aber vorhandenes Bandensignal des *Cnox-4*-Gens bei der elektrophoretischen Auftrennung auf dem Gel (vgl. Abb. 3.67).

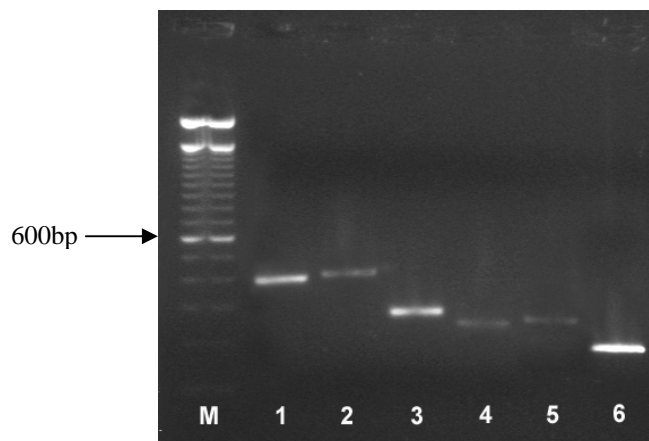


Abb. 3.67 Quantitative PCR von *Cnox-1* (Spur 1; 401bp), *Cnox-2* (Spur 2; 426bp), *Cnox-3* (Spur 3; 241bp), *Cnox-4* (Spur 4; 199bp), *Cnox-5* (Spur 5; 219bp) und *Eleutheria*- β -Aktin (Spur 6; 152bp) nach 22 PCR-Zyklen. Vergleich der Expressions-Intensitäten der verschiedenen *Cnox*-Gene untereinander und zu einem Referenz-Gen (β -Aktin). Das *Cnox-3*-Gen ist am höchsten exprimiert, die Gene *Cnox-2*, *Cnox-4* und *Cnox-5* hingegen nur relativ niedrig. Spur M = 100bp-Standardlängen-Marker.

Die *Cnox-4*-Signalantwort war in jedem der untersuchten Primärpolypen ($n > 20$) immer gleich und konnte bei beiden Detektions-Methoden eindeutig von der Hintergrundfärbung unterschieden werden. Keines der mit der Sense-Sonde (Kontrolle) behandelten Tiere zeigte Hintergrundsignale. In Primärpolypen unterschiedlichen Alters (3-6 Tage) wird das *Cnox-4*-Gen am animalen Pol exprimiert (vgl. Abb. 3.68 C und F). Die Signalantwort ist am aboralen Fuß des Tieres deutlich ausgeprägt und nimmt ca. ein Viertel des gesamten Primärpolypen ein. Positive *Cnox-4*-Signale konnten in allen untersuchten Primärpolypen ($n > 10$) gefunden werden. Eine genaue lokale Einordnung der zellulären Signale erlaubt der Vergleich der drei Aufnahmen (Durchlicht-Phasenkontrast, DAPI- und Fluoreszinfärbung; vgl. Abb. 3.68). Die DAPI-Färbung ergab eine einheitlich-homogene, den Zellkernen entsprechend gepunktete Signalstruktur verteilt über den gesamten

Larvenkörper. Die *Cnox-4*-Expressionssignale ließen sich mit denen der DAPI-Färbung *cum grano salis* in Deckung bringen (vgl. Abb. 3.68 E und F).

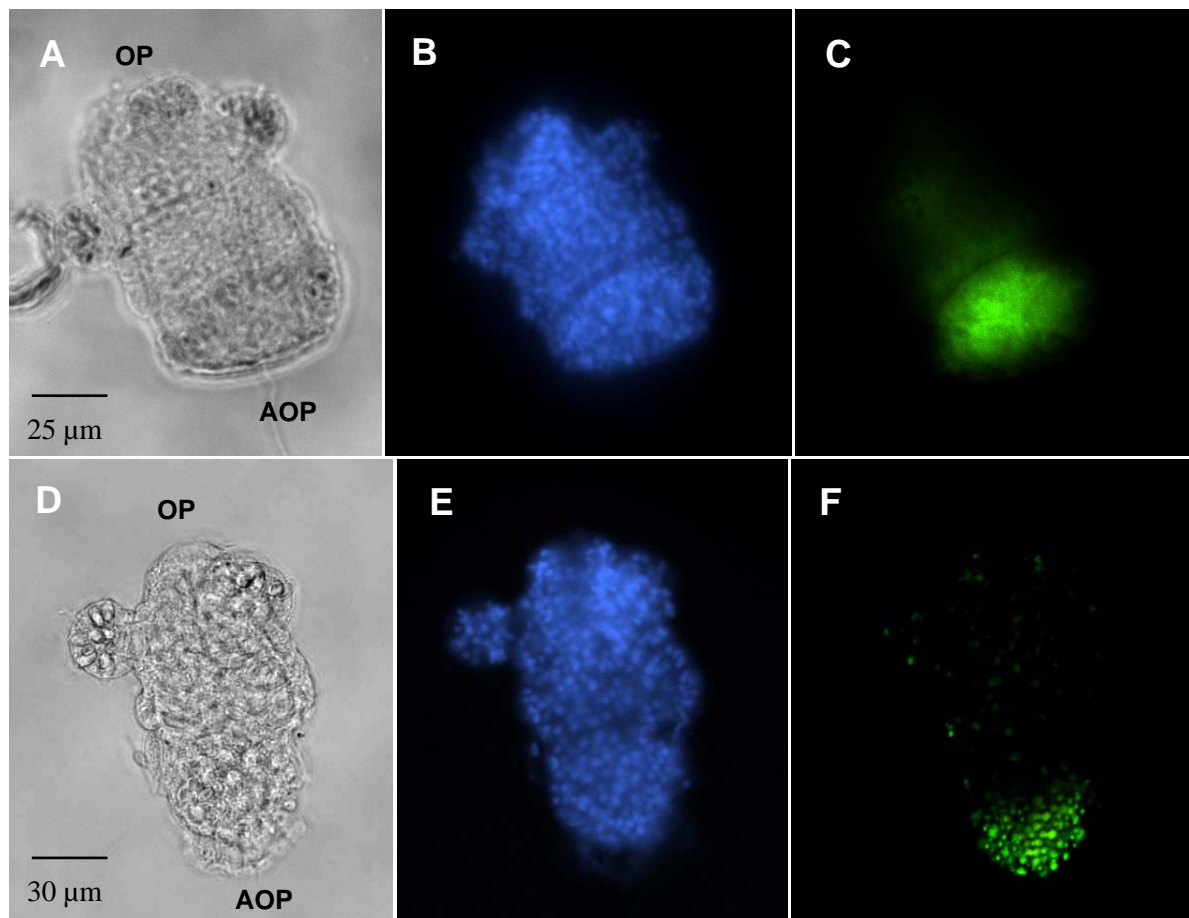


Abb. 3.68 Primärpolypen von *Eleutheria dichotoma*. Durchlichtmikroskopische Aufnahme im Phasenkontrast (**A+D**), DAPI-Färbung (**B+E**) und *Cnox-4*-Expression detektiert mittels Fluoreszein markierter Sonden (**C+F**). Jeweils das gleiche Tier zeigt **A, B** und **C** (drei Tage alt) bzw. **D, E** und **F** (sechs Tage alt). Abkürzungen betreffen: AOP= aboraler Pol, OP= oraler Pol.

3.2.4.2 *CNOX-4*-INHIBITION MITTELS dsRNA

3.2.4.2.1 QUANTITATIVE ANALYSE DES *CNOX-4*-RNAi-KNOCK-DOWNS

Die *Cnox-4*-Versuchsreihen des RNAi-Gen-*Knock-Downs* zeigten im gegenseitigen Vergleich ein ähnliches Ergebnis. In allen drei Reihen unterschieden sich die Experimentalansätze nicht signifikant von beiden Kontrollansätzen (Wilcoxon-Test, $p < 0,05$). Im Vergleich zu den Versuchsreihen der zuvor beschriebenen Studien am *Cnox-1*-, *Cnox-2*- bzw. *Cnox-3*-Gen lag der prozentuale Anteil an PAMs im Mittel deutlich niedriger (6,9% PAMs). Jeder der drei *Cnox-4*-RNAi-Experimentalansätze wies nach Beendigung der Studie nie mehr als 8,8% (absolut: 2 PAMs; 1. Versuchsreihe) phänotypisch abnormale Medusen auf (minimal 4,1%; 3. Versuchsreihe). In der 2. Versuchsreihe lag der Anteil der Tiere mit abnormem Habitus bei 8% (absolut: 4 PAMs). Die Steigungen der Regressionsgeraden der gesamten drei Versuchseihen (*Cnox-4*-Experimentalansatz: $y_{Cnox-4} = 0,33x$; Meerwasser-Kontrolle: $y_{H_2O} = 0,20x$; dsRNA-Kontrolle: $y_{dsRNA} = 0,16x$; Abb. 3.69) belegen, dass der prozentuale Anteil an PAMs in den Experimentalansätzen gegenüber den Kontrollen nur unwesentlich und nicht signifikant schneller zunimmt. Von insgesamt 144 Tieren am Ende der *Cnox-4*-RNAi-Studien waren nur zehn phänotypisch abnorm (Tab. 3.20).

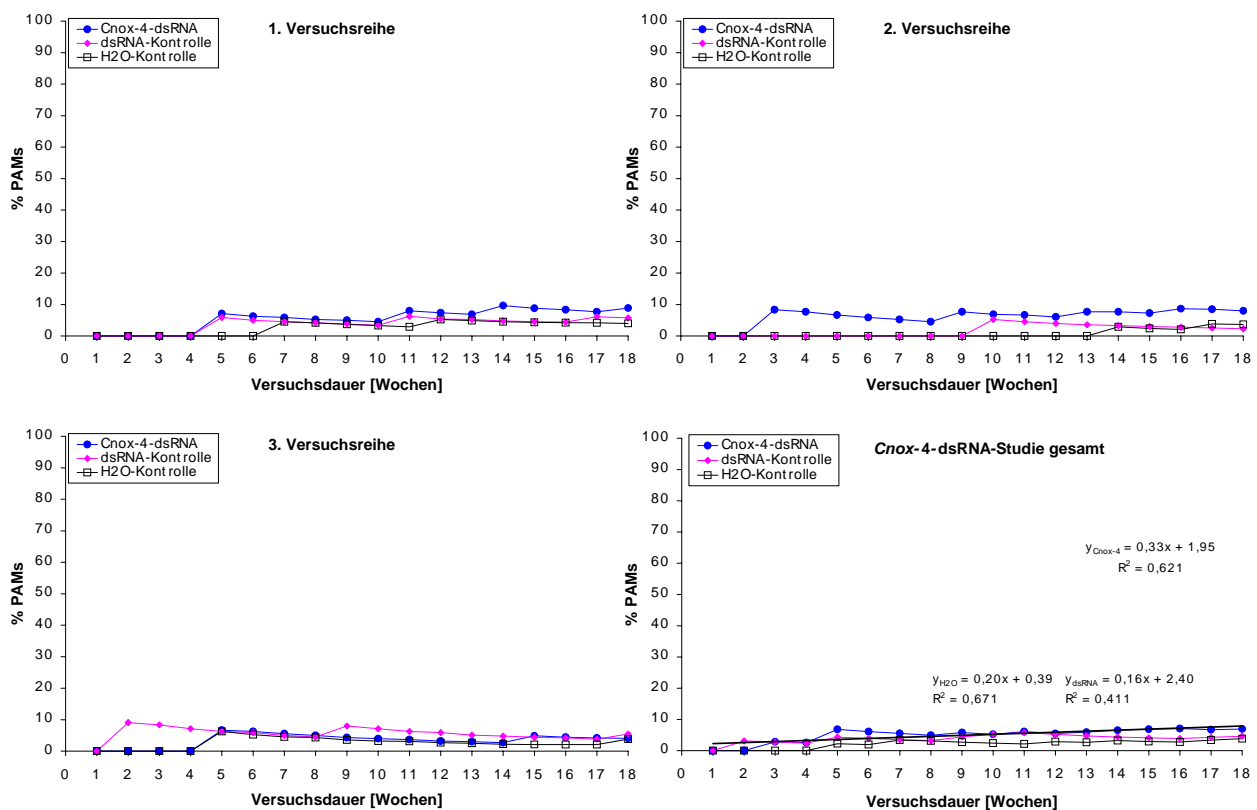


Abb. 3.69 Einfluss der *Cnox-4*-Inhibition via RNAi auf die Entstehungsrate von PAMs bei *E. dichotoma*. Aufgetragen ist der prozentuale Anteil an PAMs gegen die Versuchsdauer. Der Graph rechts unten zeigt eine Zusammenfassung von allen drei Versuchsreihen; die Steigungen (Regressionskoeffizienten) der Regressionsgeraden geben die prozentuale Zunahme an PAMs pro Zeiteinheit an; R= Korrelationskoeffizient.

In den ersten beiden Wochen der Studie trat in keiner der drei Versuchsreihen eine phänotypisch sichtbare Veränderung bei einer Medusen auf. In der dritten Woche konnte in der 2. Versuchsreihe eine PAM dokumentiert werden. In der fünften Woche verzeichneten auch die beiden anderen Versuchsreihen die erste Meduse mit abnormem Habitus. Die Anzahl der PAMs nahm nachfolgend in den drei Experimentalansätzen nur sehr wenig und ungleich langsamer als in den zuvor beschriebenen Versuchsreihen der anderen untersuchten *Cnox*-Gene zu.

3.2.4.2.2 QUALITATIVE ANALYSE DES *CNOX-4-RNAi-KNOCK-DOWNS*

In den *Cnox-4*-Versuchsreihen der RNAi-Studie war das Merkmal ZT am häufigsten vertreten. Nach Versuchsende zeigten insgesamt sechs Tiere diese abnorme Körperstruktur. Das Merkmal Kd konnte zweimal gefunden werden. Die Merkmalskategorien Kv und dT2h1w waren jeweils einmal vertreten. Alle anderen PAM-Varianten konnten in der *Cnox-4*-RNAi-Studie nicht detektiert werden (vgl. Tab. 3.20). Keine der Inhibitionsstudien an den anderen *Cnox*-Genen zeigte nach Beendigung eine solch geringe Anzahl an PAMs. In der dritten Woche trat das Merkmal Kd als erstes auf. In der fünften Woche konnten die Merkmale ZT als zweites dokumentiert werden. Erst in der fünfzehnten Woche wurde eine PAM der Merkmalskategorie Kv beobachtet. Das Merkmal dT2h1w wurde in der sechzehnten Woche als letztes detektiert (vgl. Abb. 3.70).

Versuchsreihe:	1.	2.	3.	ges.
dT2h1w:	1	0	0	1
dT1h2w:	0	0	0	0
dT2h2w:	0	0	0	0
ZT:	2	3	1	6
MT:	0	0	0	0
Kv:	0	0	1	1
Kd:	1	1	0	2
dM:	0	0	0	0
kM:	0	0	0	0
Normal:	41	46	47	134
M-gesamt:	45	50	49	144
PAMs:	4	4	2	10
% -PAMs:	8,89	8	4,08	6,94

Tab. 3.20 Anzahl an PAMs der *Cnox-4*-RNAi-Versuchsreihen am Ende der Studie.

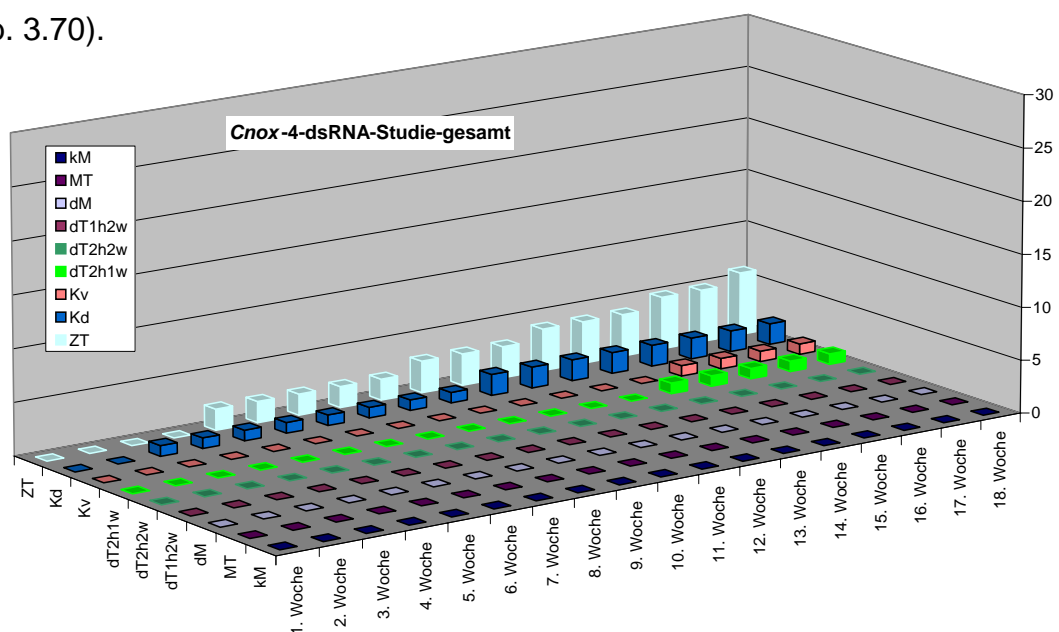


Abb. 3.70 Zeitlicher Verlauf der Zunahme an PAMs in allen neun Merkmalskategorien in den *Cnox-4*-RNAi-Versuchsreihen aufsummiert. Die Anzahl der PAMs ist in absoluten Zahlen aufgetragen.

3.2.4.3 *CNOX-4*-INHIBITION MITTELS MORPHOLINO-ANTISENSE-OLIGOS

3.2.4.3.1 QUANTITATIVE ANALYSE DER *CNOX-4*-MORPHOLINO-GEN-INHIBITION

Nach Beendigung der Studie unterschieden sich in allen drei *Cnox-4*-Morpholino-Versuchsreihen die beiden Kontrollansätze nicht signifikant vom Experimentalansatz (Wilcoxon-Test für gepaarte Stichproben, $p < 0,05$). Die Befunde der Morpholino-Versuchsreihen zeigten im Vergleich mit der *Cnox-4*-RNAi-Studie ein fast identisches Ergebnismuster, der mittlere Anteil an PAMs lag mit 4,4% sogar noch tiefer (vgl. *Cnox-4*-RNAi: 6,9%). In keiner der anderen *Cnox*-Gen-Inhibitionsstudien lag der prozentuale Anteil an PAMs so niedrig. Die 3. Versuchsreihe wies mit 7,1% phänotypisch abnormer Tiere (absolut: 3 PAMs) den höchsten Wert auf, die 2. Versuchsreihe mit nur 2,0% den niedrigsten. In der 1. Versuchsreihe wurden am Ende 4,7% Tiere mit abnormen Habitus dokumentiert (absolut: 2 PAMs). Aus den Steigungen der Regressionsgeraden der gesamten drei Versuchseihen (*Cnox-4*-Experimentalansatz: $y_{Cnox-4} = 0,21x$; Meerwasser-Kontrolle: $y_{H_2O} = 0,20x$; Sense-Kontrolle: $y_{sense} = 0,29x$; vgl. Abb. 3.69) lässt sich ersehen, dass der prozentuale Anteil an PAMs in den Experimentalansätzen gegenüber den

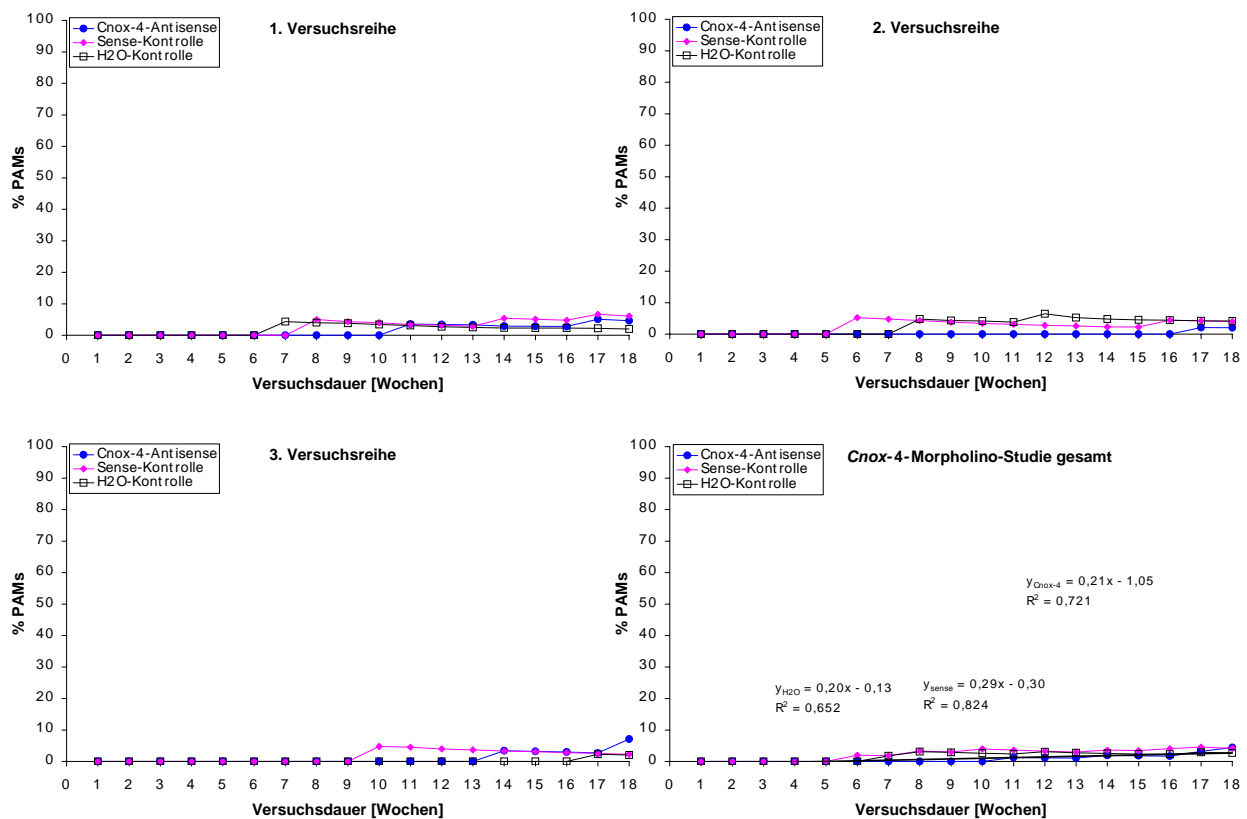


Abb. 3.71 Einfluss der *Cnox-4*-Inhibition via Morpholino-Antisense-Oligos auf die Entstehungsrate von PAMs bei *E. dichotoma*. Aufgetragen ist der prozentuale Anteil an PAMs gegen die Versuchsdauer. Der Graph rechts unten zeigt eine Zusammenfassung von allen drei Versuchsreihen; die Steigungen (Regressionskoeffizienten) der Regressionsgeraden geben die prozentuale Zunahme an PAMs pro Zeiteinheit an; R= Korrelationskoeffizient.

Kontrollen etwa gleichschnell und nicht signifikant unterschiedlich zunimmt. Von insgesamt 135 Medusen am Ende der drei *Cnox-4*-Morpholino-Studien waren lediglich sechs Tiere phänotypisch abnorm (vgl. Tab. 3.21). Die erste PAM konnte erst in der elften Woche dokumentiert werden, so spät wie in keiner anderen Inhibitionsstudie (vgl. Abb. 3.72).

3.2.4.3.2 QUALITATIVE ANALYSE DER *CNOX-4*-MORPHOLINO-GEN-INHIBITION

Gleich der *Cnox-4*-RNAi-Studie traten in den Versuchsreihen der *Cnox-4*-Morpholino-Studie PAMs mit Zwerg-Tentakeln (ZT) am häufigsten auf (absolut 3). Zwei Tiere zeigten das Merkmal Kd und eines das Merkmal kM. Alle anderen Merkmalskategorien kamen nicht vor (vgl. Tab. 3.21). Diese Befunde sind denen der *Cnox-4*-RNAi-Studie sehr ähnlich.

Wie die Abbildung 3.72 illustriert trat das Merkmal Kd in der elften Woche zeitlich als erstes auf. PAMs der Merkmalskategorie ZT und kM waren fast zeitgleich erst am Ende der Untersuchung zu detektieren (vgl. Abb. 3.72).

Versuchsreihe:	1.	2.	3.	ges.
dT2h1w:	0	0	0	0
dT1h2w:	0	0	0	0
dT2h2w:	0	0	0	0
ZT:	1	1	1	3
MT:	0	0	0	0
Kv:	0	0	0	0
Kd:	1	0	1	2
dM:	0	0	0	0
kM:	0	0	1	1
Normal:	41	49	39	129
M-gesamt:	43	50	42	135
PAMs:	2	1	3	6
% -PAMs:	4,65	2	7,14	4,44

Tab. 3.21 Anzahl phänotypisch abnormer Medusen der *Cnox-4*-Morpholino-Versuchsreihen am Ende der Studie.

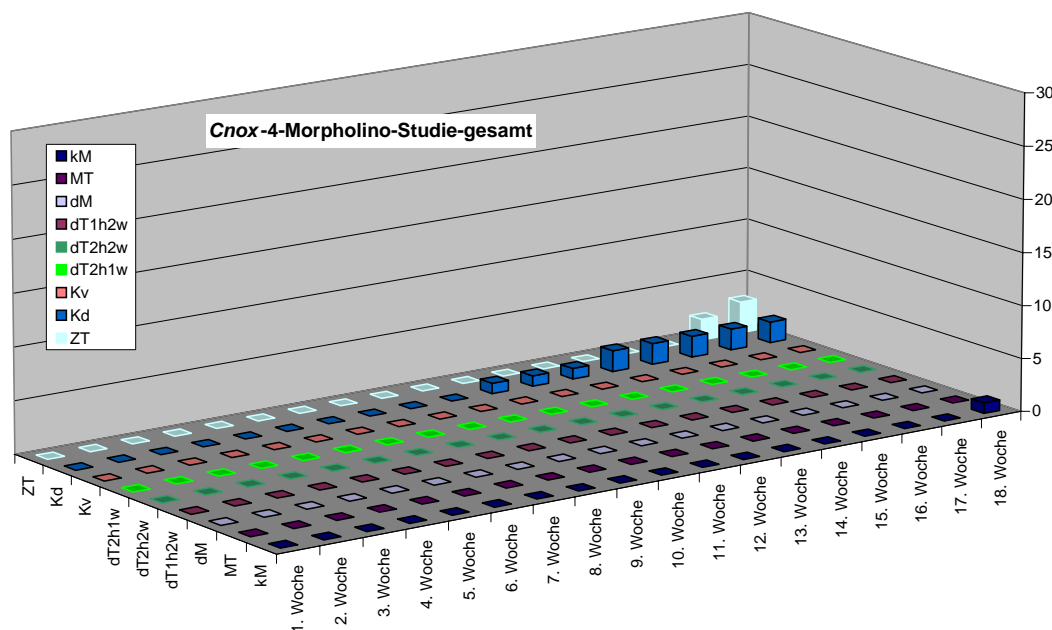


Abb. 3.72 Zeitlicher Verlauf der Zunahme an PAMs in allen neun Merkmalskategorien in den *Cnox-4*-Morpholino-Versuchsreihen aufsummiert. Die Anzahl der PAMs ist in absoluten Zahlen aufgetragen.

3.2.5 UNTERSUCHUNGEN AM *CNOX-5*-GEN

3.2.5.1 EXPRESSIONSSTUDIEN

In der Medusengeneration sowie in adulten Polypen konnte keine Expression des *Cnox-5*-Gens nachgewiesen werden, vielmehr war eine solche nur in Planularlarven und Primärpolypen zu detektieren. In beiden morphologischen Erscheinungsformen der Art erwies sich das Expressionsmuster aber, abhängig vom jeweiligen

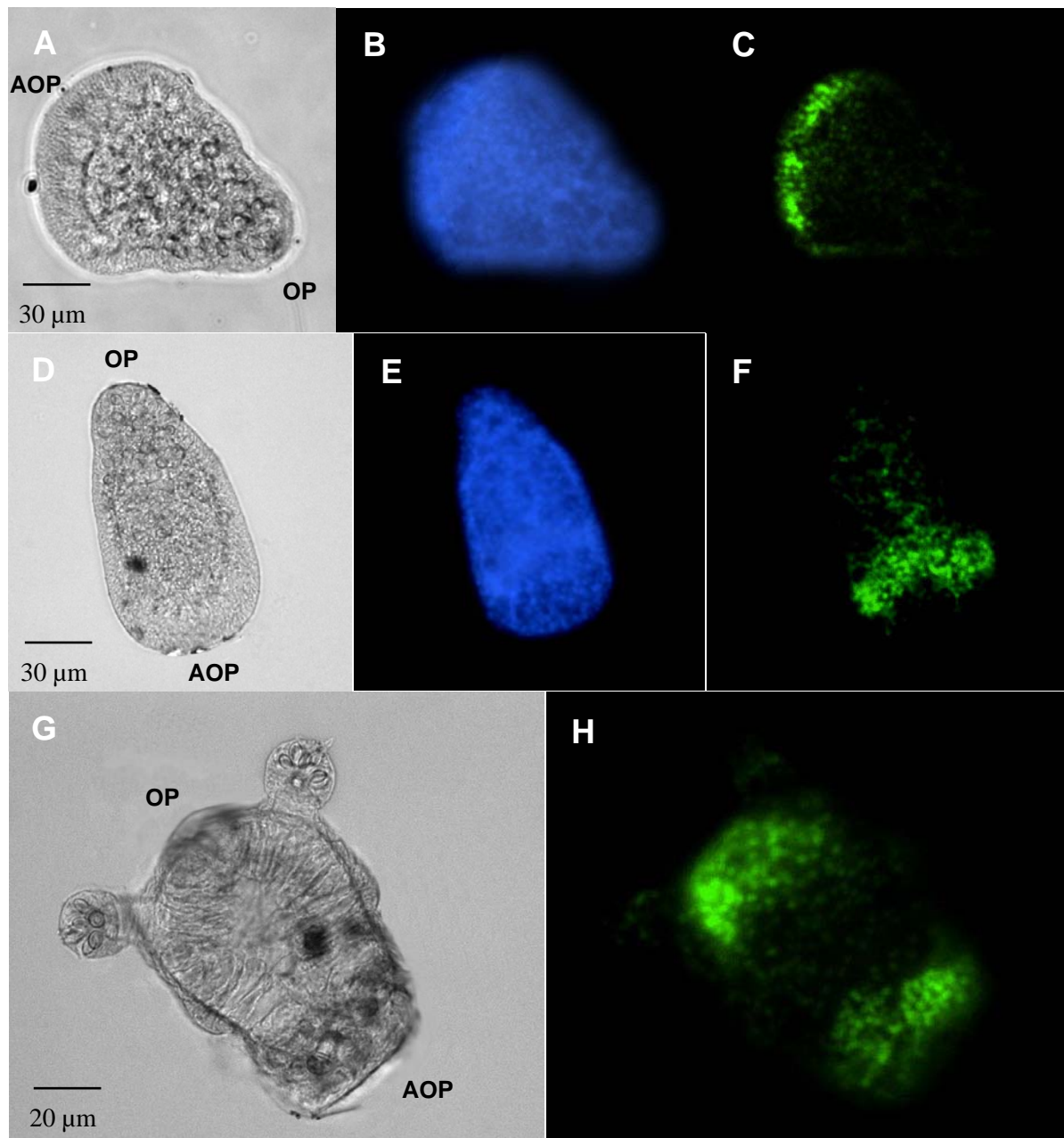


Abb. 3.73 Expression von *Cnox-5* in Planularlarven (A-F) und Primärpolypen (G+H) von *Eleutheria dichotoma*. Durchlichtmikroskopische Aufnahmen im Phasenkontrast (A+D+G), DAPI-Färbung (B+E) und *Cnox-5*-Expression detektiert mittels Fluoreszein markierter Sonden (C+F+H). Jeweils das gleiche Tier zeigt A, B und C (drei Tage alte Planula); D, E und F (sechs Tage alte Planula) bzw. G und H (Primärpolyp). Abkürzungen: AOP= aboraler Pol, OP= oraler Pol.

Entwicklungsstadium, als sehr divers. In ca. drei Tage alten Planularlarven wird das *Cnox-5*-Gen in ektodermalen Zellen am animalen Pol exprimiert. Die Expression ist relativ hoch, beschränkt sich aber auf einen maximal 3-5 Zellen breiten Bereich des aboralen Ektoderms (vgl. Abb. 3.73 C). Diese Expressionzone verlagert sich bei ca. sechs Tage alten Larven weiter in Richtung zum vegetativen Pol und expandiert in seiner räumlichen Breitenausdehnung auf bis zu 10 Zellen (vgl. Abb. 3.73 F). Im zweidimensionalen Bild erscheint der Signalbereich als ein gleichförmiges Band zu Beginn des letzten Larvedrittels am animalen Pol. Ein solches Expressionsmuster konnte bei jeder der untersuchten Planularlarven gefunden werden (n> 30).

In Primärpolypen wird das *Cnox-5*-Gen, wie auch in den jungen Planularlarven, am animalen Pol exprimiert. Zudem weisen die untersuchten Tiere einen gleichgroßen Bereich *Cnox-5*-exprimierender Zellen am oralen Pol auf, die Tentakel der Primärpolypen zeigen jedoch keinerlei Expressionsignale (vgl. Abb. 3.73 H). Die Signalantwort ist sowohl am oralen als auch am aboralen Ende deutlich ausgeprägt und nimmt jeweils ca. ein Viertel des gesamten Primärpolypen ein. Positive *Cnox-5*-Expressionsmuster dieser Art konnten in allen untersuchten Primärpolypen (n> 15) gefunden werden. Obwohl im Zuge der RT-PCR (vgl. Kap. 3.2.4.1 und Abb. 3.67) mit aus Medusen isolierter DNA als Templat ein sehr schwaches Bandensignal des *Cnox-5*-Gens bei der elektrophoretischen Trennung auf dem Gel gefunden wurde, konnte die Genexpression in diesem Stadium des Lebenszyklus mittels *in situ* Hybridisierung nicht nachgewiesen werden. Die gefundenen Expressionsmuster jedoch waren, gleich den zuvor beschriebenen Studien, interindividuell und genspezifisch immer gleich. Alle mit der Sense-Kontrollsonde inkubierten Tiere zeigten keine positiven Farb- bzw. Fluoreszenzsignale.

3.2.5.2 *CNOX-5*-INHIBITION MITTELS dsRNA

3.2.5.2.1 QUANTITATIVE ANALYSE DES *CNOX-5*-RNAi-KNOCK-DOWNS

In allen *Cnox-5*-Versuchsreihen unterschieden sich zum Ende der Untersuchung die beiden Kontrollansätze signifikant vom Experimentalansatz ($n=74$; Wilcoxon-Test, $p<0,05$); zwischen Versuchsdauer und der Anzahl an PAMs besteht eine signifikant positive Korrelation. In den drei Versuchsreihen lag der prozentuale Anteil an PAMs im Mittel bei 64,9% (absolut: 74 PAMs). Die 1. Versuchsreihe verzeichnete mit 76,5% PAMs den höchsten Wert (absolut: 26). In keiner Versuchsreihe der vier anderen *Cnox*-Gene (*Cnox-1* - *Cnox-4*), sowohl RNAi- als auch Morpholinostudien, lag der prozentuale Anteil an PAMs höher. Mit 58,3% phänotypisch abnormaler Medusen wies die 2. Versuchsreihe den niedrigsten Wert auf (absolut: 21); in der 3. Versuchsreihe waren 61,4% der Tiere missgebildet (absolut: 27). Die Steigungen der Regressionsgeraden der gesamten drei Versuchsreihen (*Cnox-5*-Experimentalansatz: $y_{Cnox-5} = 3,98x$; Meerwasser-Kontrolle: $y_{H_2O} = 0,20x$; dsRNA-Kontrolle: $y_{dsRNA} = 0,16x$; vgl. Abb. 3.74) zeigen, dass der prozentuale Anteil an PAMs in den Experimentalansätzen gegenüber den Kontrollen fast zwanzigmal schneller zunimmt. In den ersten beiden Wochen der

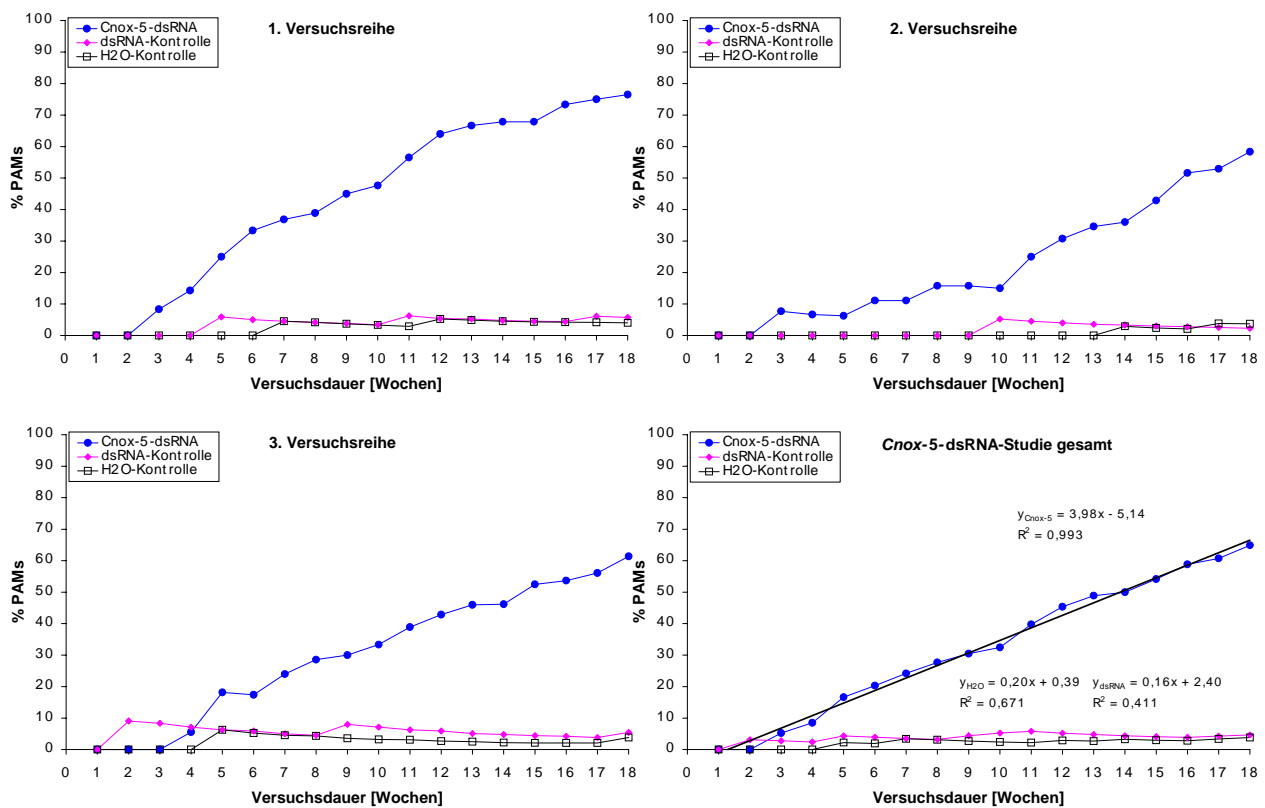


Abb. 3.74 Einfluss der *Cnox-5*-Inhibition via RNAi auf die Entstehungsrate von PAMs bei *E. dichotoma*. Aufgetragen ist der prozentuale Anteil an PAMs gegen die Versuchsdauer. Der Graph rechts unten zeigt eine Zusammenfassung von allen drei Versuchsreihen; die Steigungen (Regressionskoeffizienten) der Regressionsgeraden geben die prozentuale Zunahme an PAMs pro Zeiteinheit an; R= Korrelationskoeffizient.

Studie trat in keiner der drei Versuchsreihen eine phänotypisch sichtbare Veränderung bei einer Medusen auf. In der dritten Woche konnten in der 1. und 2. Versuchsreihe die ersten PAMs dokumentiert werden. In der vierten Woche verzeichnete auch die andere Versuchsreihe die ersten Medusen mit abnormem Habitus. Die Anzahl der PAMs nahm nachfolgend in den drei Experimentalansätzen kontinuierlich zu.

3.2.3.2.2 QUALITATIVE ANALYSE DES *CNOX-5-RNAi-KNOCK-DOWNS*

In den *Cnox-5*-Versuchsreihen der RNAi-Studie war das Merkmal Kd am häufigsten vertreten. Nach Beendigung der Versuche zeigten 58,1% aller PAMs (absolut: 43) diese abnorme Körperstruktur. In jedem der drei Experimentalansätze waren mindestens 13 PAMs dieser Merkmalskategorie zu beobachten. Am zweithäufigsten war das Merkmal Kv zu finden, 22,3% der PAMs (absolut: 15) zeigten diese phänotypische Veränderung. Immerhin 9,5% der PAMs (absolut: 7) wiesen das Merkmal dM auf. Nur jeweils zwei Tiere hatten einen doppelten Tentakel mit einem bzw. zwei Haft- und zwei Wehrästen oder einen Mehrfach-Tentakel ausgebildet. Das Merkmal dT2h1w war dreimal vertreten. Die Merkmalskategorien ZT und kM traten in keiner der drei Versuchsreihen auf (vgl. Tab. 3.22). Keine andere Studie zeigte eine derartige Dominanz eines einzelnen Merkmals (Kd).

In den drei Versuchsreihen betrafen nach Beendigung der Untersuchung 87,8% (absolut: 65) abnorme Achsenstrukturen, nur entsprechend 12,2% der PAMs wiesen phänotypische Veränderungen an Merkmalskategorien der Tentakel auf (absolut: 9; vgl. Abb. 3.63 - Abb. 3.66). Die Inhibition der anderen Hox-Gene resultierte in keinem der Fälle in einem solch hohen Prozentsatz an Achsenanomalien.

In der dritten Woche nach Versuchsbeginn trat das Merkmal Kd als erstes, das Merkmal Kv in der vierten Woche als zweites auf. In der fünften Woche konnten PAMs der Merkmalskategorien dM und dT2h1w zeitgleich als nächstes dokumentiert werden. Erst in der zehnten Woche konnten Tiere mit doppelten Tentakeln (dT1h2w) beobachtet werden. Zeitlich als letztes traten in der elften Woche die Merkmale dT2h2w und MT auf. Bei der Vernachlässigung des einen Tieres mit einem doppelten Tentakel mit 2 Haftästen und einem Wehrast in der fünften Woche, ist das erstmalige Auftreten von PAMs

Versuchsreihe:	1.	2.	3.	ges.
dT2h1w:	1	1	1	3
dT1h2w:	1	0	1	2
dT2h2w:	1	0	1	2
ZT:	0	0	0	0
MT:	1	0	1	2
Kv:	5	6	4	15
Kd:	14	13	16	43
dM:	3	1	3	7
kM:	0	0	0	0
Normal:	8	15	17	40
M-gesamt:	34	36	44	114
PAMs:	26	21	27	74
% -PAMs:	76,5	58,3	61,4	64,9

Tab. 3.22 Anzahl phänotypisch abnormer Medusen der *Cnox-5*-RNAi-Versuchsreihen am Ende der Studie.

beider Gruppierungen (Achsen- und Tentakelkategorien) signifikant unterschiedlich (vgl. Abb. 3.60).

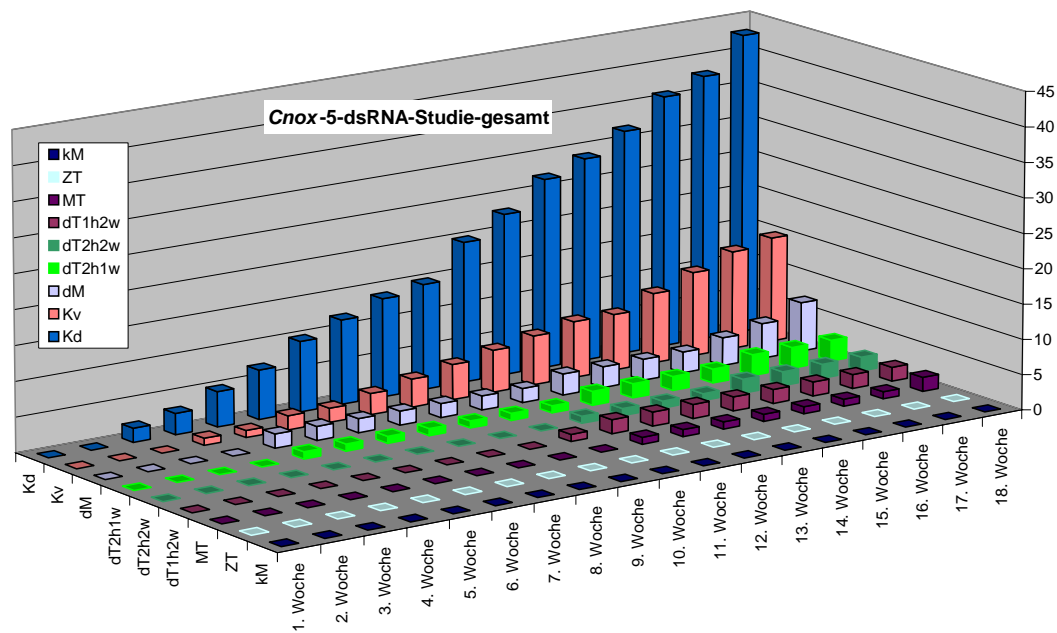


Abb. 3.75 Zeitlicher Verlauf der Zunahme an PAMs in allen neun Merkmalskategorien in den *Cnox-5*-RNAi-Versuchsreihen aufsummiert. Die Anzahl der PAMs ist in absoluten Zahlen aufgetragen.

3.2.5.3 *CNOX-5*-INHIBITION MITTELS MORPHOLINO-ANTISENSE-OLIGOS

3.2.5.3.1 QUANTITATIVE ANALYSE DER *CNOX-5*-MORPHOLINO-GEN-INHIBITION

Nach 18 Wochen Versuchsdauer unterschieden sich in allen drei *Cnox-5*-Versuchsreihen die beiden Kontrollansätze signifikant vom Experimentalansatz ($n=67$; Wilcoxon-Test, $p < 0,05$). Die Versuchsdauer und die Anzahl der PAMs sind, wie in den zuvor beschriebenen Studien, eindeutig signifikant positiv korreliert. Mit 66,3% PAMs wies die *Cnox-5*-Morpholino-Studie im Vergleich zur *Cnox-5*-RNAi-Studie (64,9%) im Mittel einen sehr ähnlichen Wert auf (67 PAMs von 101 Medusen insgesamt). In der 1. Versuchsreihe lag der Anteil phänotypisch abnormer Tiere mit 56,8% (absolut: 25 PAMs) am niedrigsten. Die 2. (74,2% PAMs; absolut: 23) und 3. Versuchsreihe (73,1% PAMs; absolut: 19) verzeichneten am Ende der Untersuchung einen vergleichbaren Anteil an Tieren mit abnormem Habitus. Bemerkenswerterweise war in der 1. Versuchsreihe zwar der niedrigste Prozentsatz an PAMs zu dokumentieren, die absolute Anzahl lag aber freilich höher als in den beiden anderen Reihen. Die Befunde dieser Studie zeigen somit, sowohl im Vergleich mit der *Cnox-5*-RNAi-Studie als auch untereinander eine hohe Über-

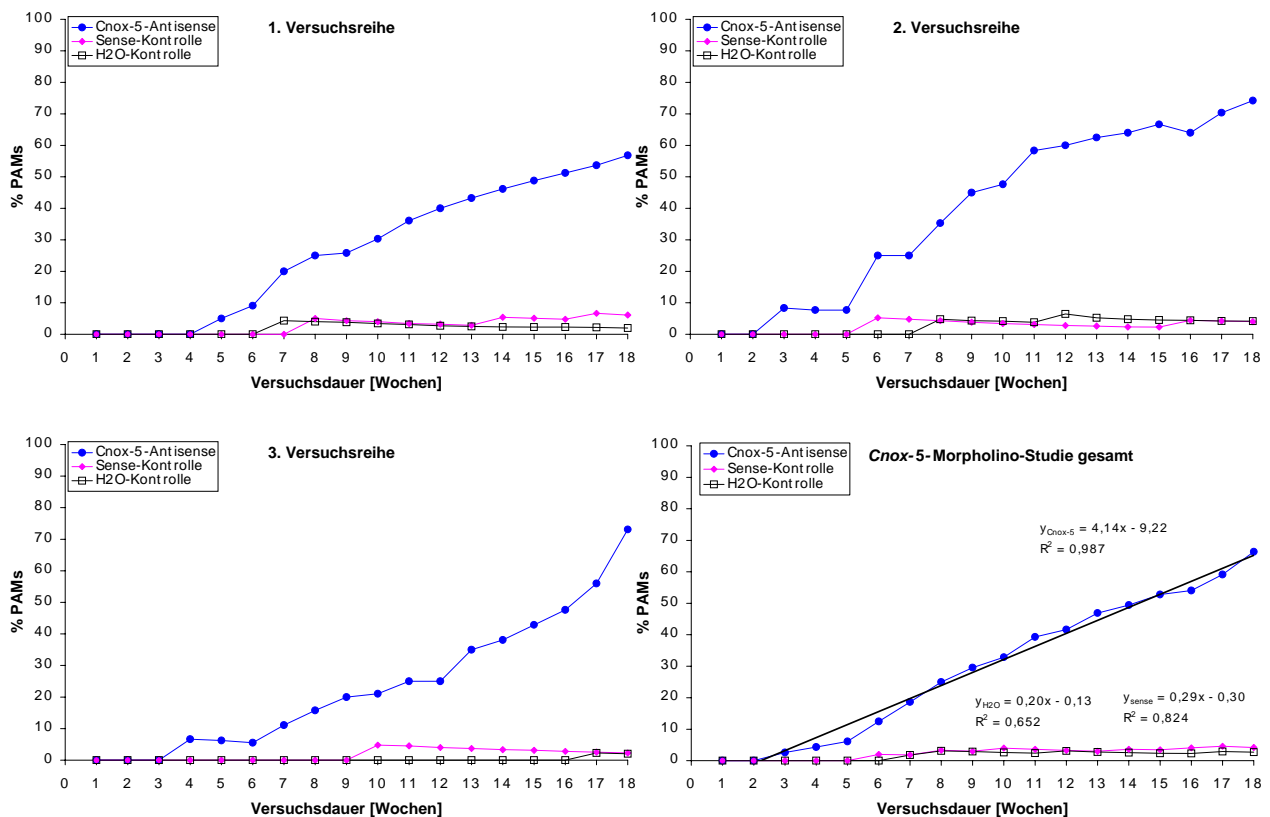


Abb. 3.76 Einfluss der *Cnox-5*-Inhibition via Morpholino-Antisense-Oligos auf die Entstehungsrate von PAMs bei *E. dichotoma*. Aufgetragen ist der prozentuale Anteil an PAMs gegen die Versuchsdauer. Der Graph rechts unten zeigt eine Zusammenfassung von allen drei Versuchsreihen; die Steigungen (Regressionskoeffizienten) der Regressionsgeraden geben die prozentuale Zunahme an PAMs pro Zeiteinheit an; R= Korrelationskoeffizient.

einstimmung. Aus den Steigungen der Regressionsgeraden der drei Versuchseihen in der Zusammenfassung (*Cnox-5*-Experimentalansatz: $y_{Cnox-5} = 4,14x$; Meerwasser-Kontrolle: $y_{H_2O} = 0,20x$; Sense-Kontrolle: $y_{sense} = 0,29x$; vgl. Abb. 3.76) lässt sich ersehen, dass der prozentuale Anteil an PAMs in den Experimentalansätzen gegenüber den Kontrollen mehr als zehnmals schneller ansteigt. In keinem der Meerwasser-Kontrollansätze lag der Anteil an PAMs am Ende der Versuchszeit über 5% (Mittelwert: 2,7%), in den Sense-Kontrollansätzen nicht über 7% (Mittelwert: 4,2%). Gleich der *Cnox-5*-RNAi-Studie trat in den ersten beiden Wochen in keiner der drei Versuchsreihen eine phänotypisch sichtbare Veränderung auf Medusenebene auf. In der dritten Woche konnte im Experimentalansatz der 2. Versuchsreihe die erste PAM dokumentiert werden. In der vierten bzw. erst in der fünften Woche verzeichneten auch die beiden anderen Versuchsansätze die ersten PAMs. Die Anzahl der PAMs aller drei Versuchsreihen beschrieb nachfolgend in den Experimentalansätzen einen kontinuierlichen Anstieg (vgl. Abb. 3.76).

3.2.5.3.2 QUALITATIVE ANALYSE DER *CNOX-5*-MORPHOLINO-GEN-INHIBITION

Wie in der *Cnox-5*-RNAi-Studie traten in den Versuchsreihen der *Cnox-5*-Morpholino-Studie PAMs mit deformierter Achse (Kd) am häufigsten auf. Im Mittel zeigten 53,7% der PAMs (absolut: 36) dieses Merkmal. Am zweithäufigsten war gleichsam das Merkmal Kv zu detektieren, 19,4% der PAMs (absolut: 13) zeigten diese phänotypische Anomalie (vgl. Tab. 3.23 und Abb. 3.78 bis Abb. 3.81). Insgesamt fünf bzw. viermal wurde das Merkmal dT2h1w und dT2h2w, dreimal das Merkmal dM gefunden. Jeweils zweimal trat die Merkmalskategorie dT1h2w und MT auf. Nur eine PAM bildete einen Zwerg-Tentakel bzw. kein Manubrium aus. Interessant erscheint, dass in dieser Studie alle neun Merkmalskategorien vertreten waren (vgl. Tab. 3.23). In den drei Versuchsreihen betrafen nach Beendigung der Untersuchungen 79,1% (absolut: 53) Veränderungen an Achsenmerkmalen und somit weniger als in der parallelen *Cnox-5*-RNAi-Studie (87,8%). Entsprechend nur 21,9% (absolut: 14) der PAMs wiesen tentakel-abnorme Strukturen auf.

Versuchsreihe:	1.	2.	3.	ges.
dT2h1w:	2	2	1	5
dT1h2w:	1	1	0	2
dT2h2w:	1	1	2	4
ZT:	0	1	0	1
MT:	1	0	1	2
Kv:	6	3	4	13
Kd:	12	13	11	36
dM:	2	1	0	3
kM:	0	1	0	1
Normal:	19	8	7	34
M-gesamt:	44	31	26	101
PAMs:	25	23	19	67
% -PAMs:	56,8	74,2	73,1	66,3

Tab. 3.23 Anzahl phänotypisch abnormer Medusen der *Cnox-5*-Morpholino-Versuchsreihen am Ende der Studie.

Wie aus der Abbildung 3.77 zu ersehen ist, trat das Merkmal Kd in der dritten Woche zeitlich als erstes auf. PAMs der Merkmalskategorie Kv waren bereits eine Woche später zu detektieren. Die Anzahl der PAMs dieser Merkmalskategorien

nahm nachfolgend stetig zu. Nach weiteren drei Wochen trat das Merkmal dT2h1w erstmals auf. In der achten Woche nach Beginn des Experiments konnte ein Tier mit einem Zwerg-Tentakel dokumentiert werden. Die anderen Merkmalskategorien wurden in etwa zeitgleich um die elfte Woche erstmalig gefunden. Erst in der siebzehnten Woche wurde ein Tier ohne Manubrium detektiert. Merkmale die Veränderungen der Achsenstruktur betrafen, waren zeitlich signifikant früher zu finden.

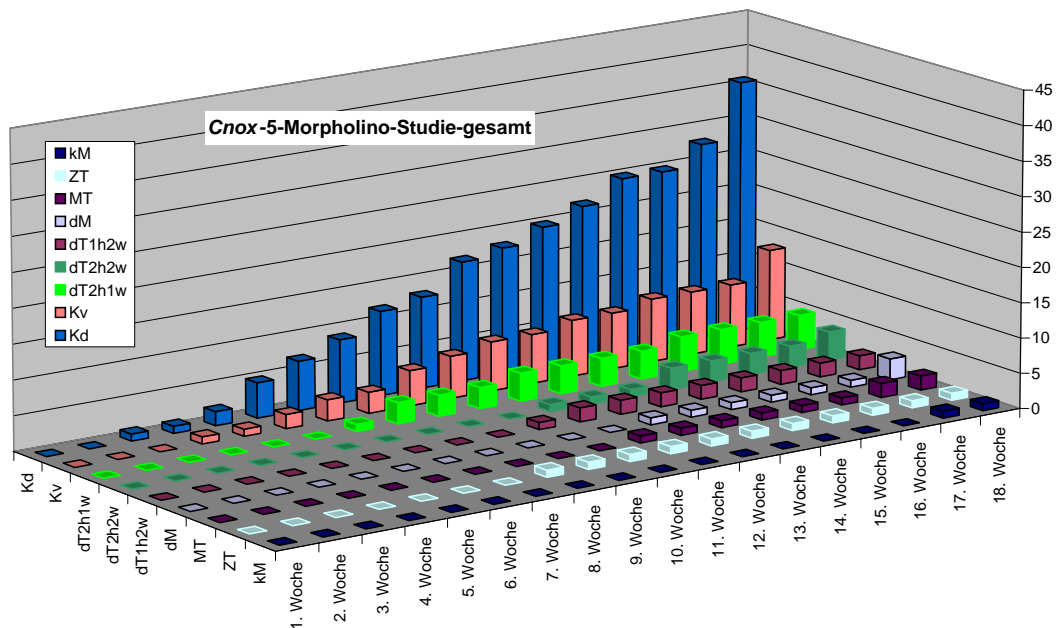


Abb. 3.77 Zeitlicher Verlauf der Zunahme an PAMs in allen neun Merkmalskategorien in den *Cnox-5*-Morpholino-Versuchsreihen aufsummiert. Die Anzahl der PAMs ist in absoluten Zahlen aufgetragen.

3.2.5.4 EXEMPLARISCHE DARSTELLUNG DER PAMS DER *CNOX-5*-STUDIEN

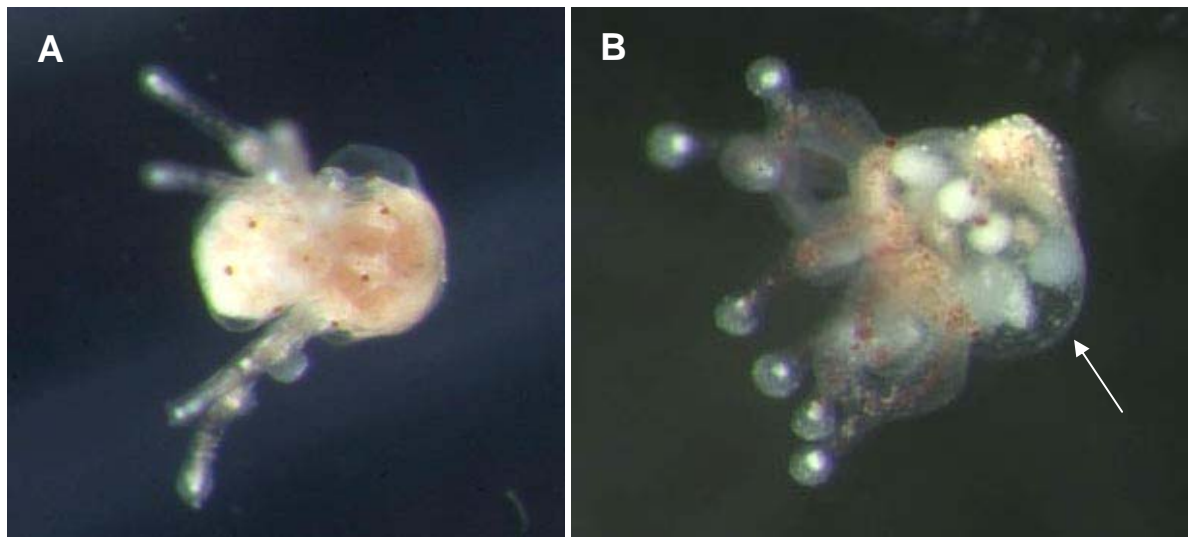


Abb. 3.78 Medusen von *E. dichotoma* aus den *Cnox-5*-Inhibitionsstudien. Deformation der Aboral-Oral-Achse (Kd) und die Radiärsymmetrie ist gestört, zudem ist der Brutraum überdimensioniert (**B**; siehe Pfeilmarkierung). Die phänotypisch abnormen Merkmale wurden in der dritten bzw. fünften Woche nach Beginn des Experiments dokumentiert (Aboral-Ansicht bei 40-facher Vergrößerung).

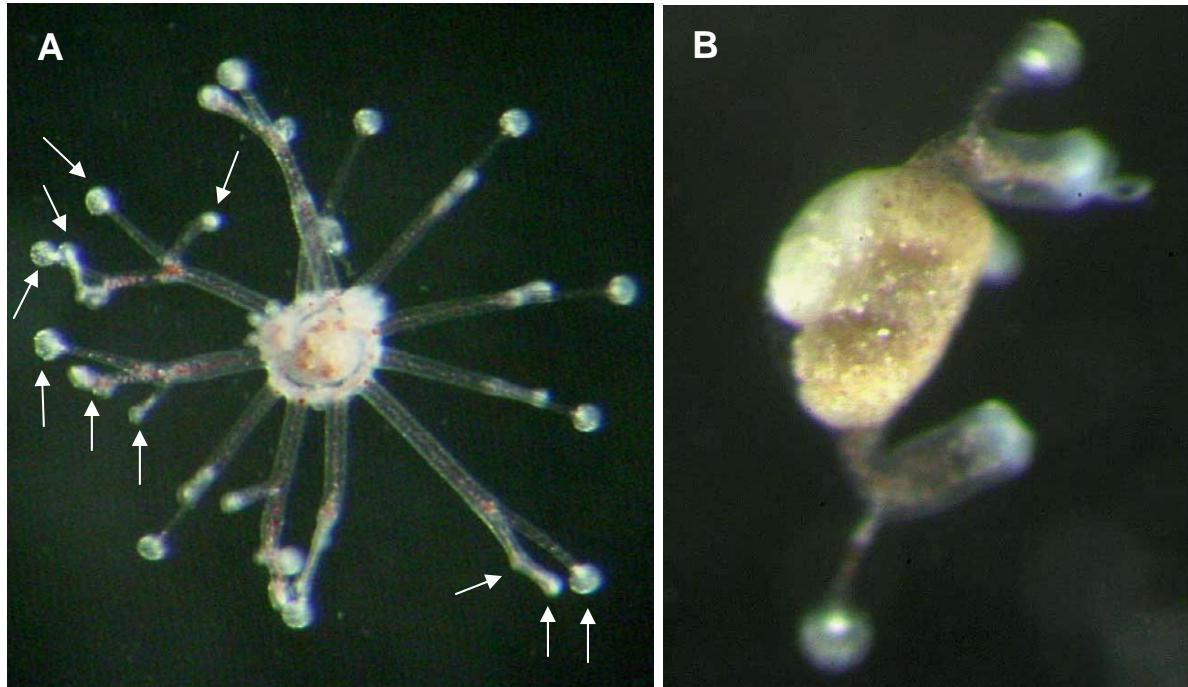


Abb. 3.79 Medusen von *E. dichotoma* aus den *Cnox-5*-Inhibitionsstudien. Deformation der Aboral-Oral-Achse (Kd; **A & B**), Ausbildung von zwei doppelten Tentakeln mit zwei Haftästen und einem Wehrast (dT2h1w; **A**) und Ausbildung von einem Mehrfach-Tentakel mit drei Haftästen und zwei Wehrästen (MT; **A**; siehe Pfeilmarkierungen). Die phänotypisch abnormen Merkmale wurden in der elften bzw. dreizehnten Woche nach Beginn des Experiments dokumentiert (Oral-Ansicht bei 40-facher Vergrößerung).

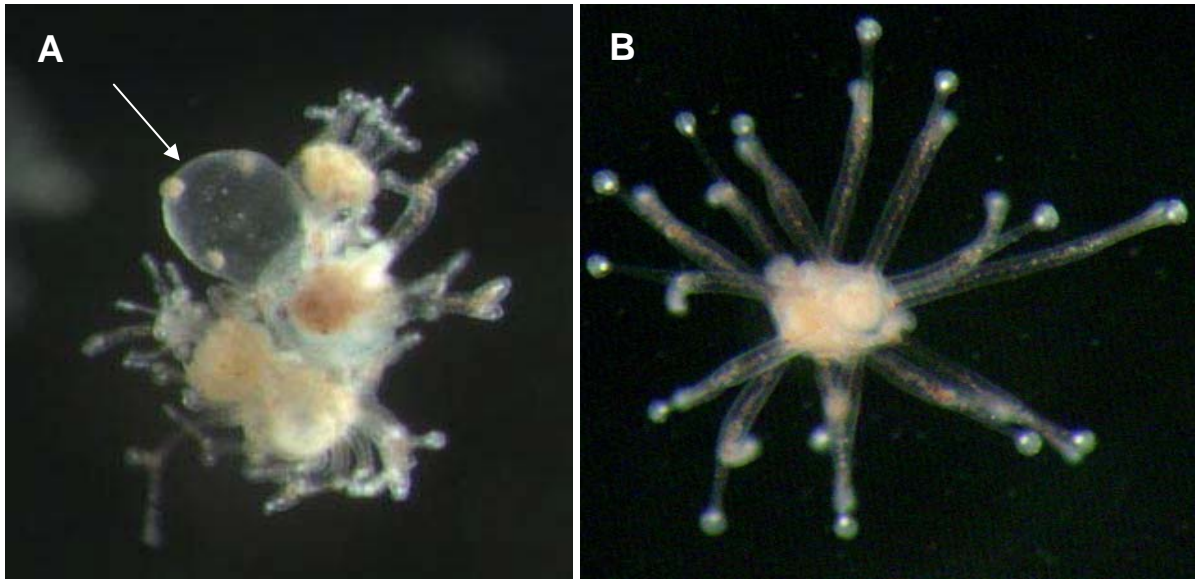


Abb. 3.80 A Medusen von *E. dichotoma* aus den *Cnox-5*-Inhibitionsstudien. Mehrere Tiere sind verwachsen und trennen sich nicht; der Brutraum ist überdimensioniert (Kv; siehe Pfeilmarkierung). **Abb. 3.80 B** zwei Medusen sind lateral fusioniert und es ist nicht mehr möglich deren Grenze zu definieren (Kv). Die phänotypisch abnormen Merkmale wurden in der vierten bzw. neunten Woche nach Beginn des Experiments dokumentiert (Aboral-Ansicht bei 30-facher Vergrößerung).

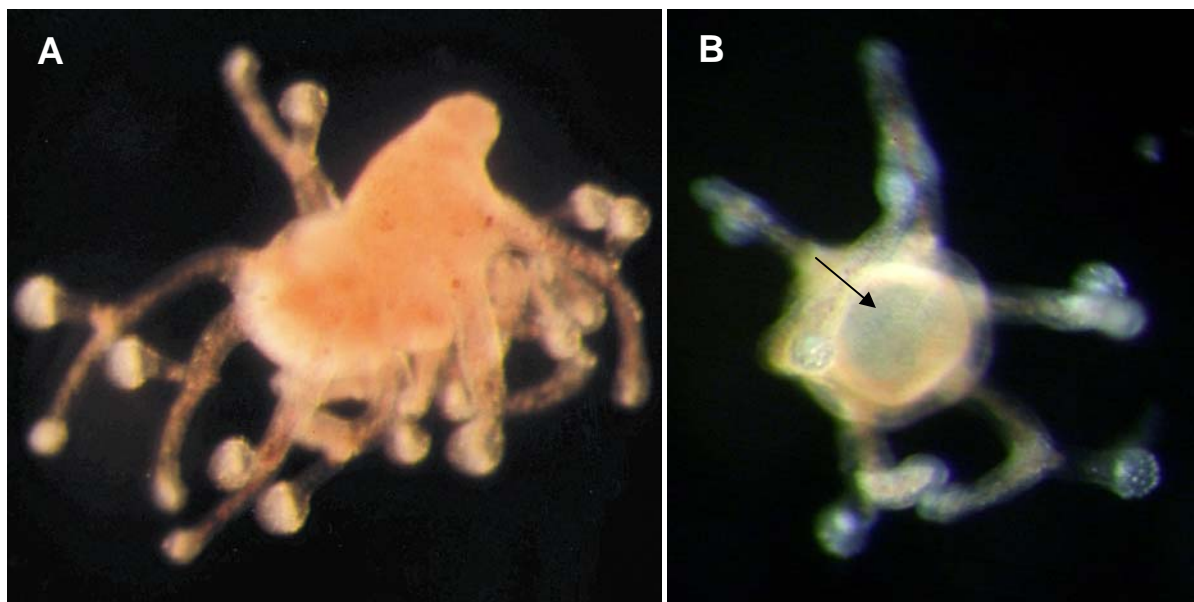


Abb. 3.81 Medusen von *E. dichotoma* aus den *Cnox-5*-Inhibitionsstudien. Deformation der Aboral-Oral-Achse und die Radiärsymmetrie ist gestört (Kd; **A**). Die Meduse in Abbildung **B** hat kein Manubrium ausgebildet (kM; siehe Pfeilmarkierung). Die phänotypisch abnormen Merkmale wurden in der vierten bzw. siebzehnten Woche nach Beginn des Experiments dokumentiert (Aboral-Ansicht bei 40-facher Vergrößerung).

3.2.6 VERGLEICHENDE ANALYSE DER INHIBITIONSSTUDIEN

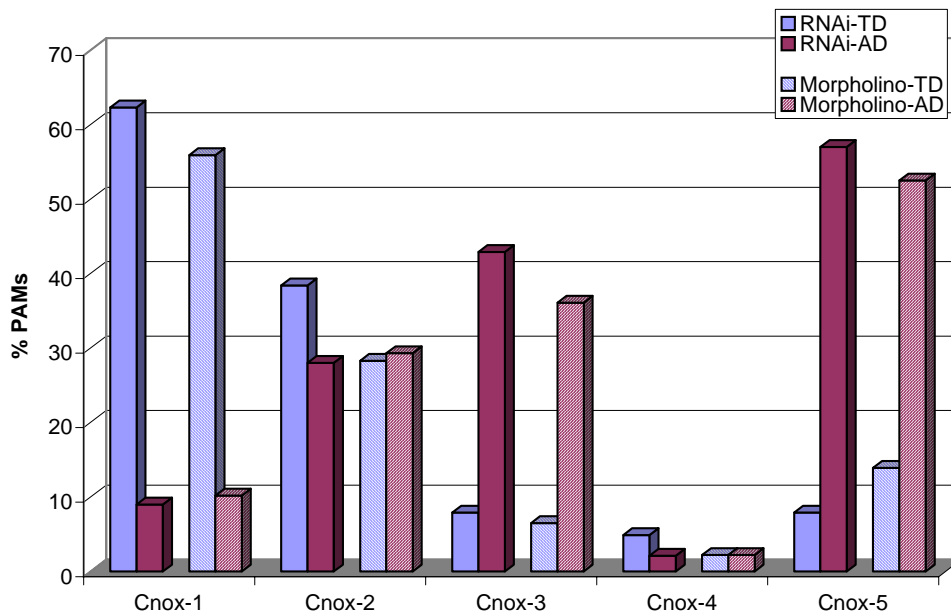


Abb. 3.82 Prozentualer Anteil an PAMs mit Deformationen an Tentakelmerkmalen (TD) bzw. Achsenmerkmalen (AD) in der Medusengeneration von *E. dichotoma*. Alle fünf RNAi- und Morpholino-*Cnox*-Gen-Inhibitionsstudien im Vergleich. Der prozentuale Anteil an PAMs einer Merkmalsgruppe bezieht sich jeweils auf die gesamte Anzahl an Medusen, nicht auf die gesamte Anzahl an PAMs nach Beendigung der einzelnen Studien.

Tentakelveränderungen: Der Vergleich der fünf RNAi- bzw. Morpholino-Inhibitionsstudien zeigt, dass die beiden *Cnox-1*-Studien den bei weitem höchsten Prozentsatz an tentakelveränderten PAMs aufwiesen (RNAi: 87,4% der PAMs, 62,3% der Medusen; Morpholino: 84,5% der PAMs, 55,9% der Medusen; vgl. Abb. 3.82 und Abb. 3.84). In den *Cnox-3*-Studien war der Prozentsatz an PAMs mit Tentakelabnormalitäten am niedrigsten (RNAi: 15,6% der PAMs, 7,9% der Medusen; Morpholino: 15,2% der PAMs, 6,5% der Medusen); in der *Cnox-5*-Studie lagen die vergleichbaren Werte nur unwesentlich höher (RNAi: 12,2% der PAMs, 7,9% der Medusen; Morpholino: 20,9% der PAMs, 13,9% der Medusen). Die Inhibition des *Cnox-2*-Gens resultierte für beide Methoden in einer fast gleichen Verteilung von PAMs der zwei Merkmalsgruppen (vgl. Abb. 3.82 und Abb. 3.84). Die Inhibition des *Cnox-4*-

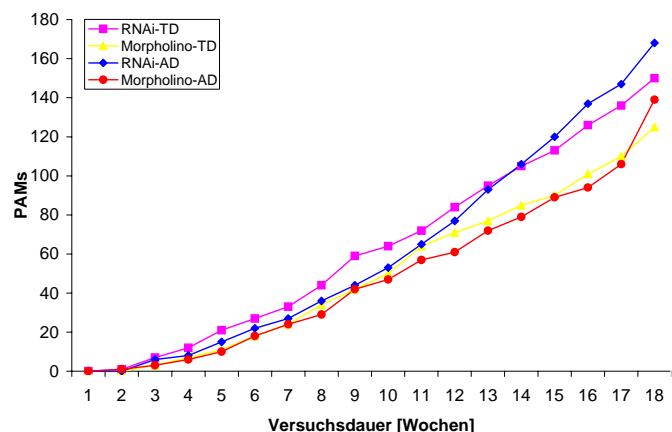


Abb. 3.83 Zunahme an PAMs mit Deformationen an Tentakelmerkmalen (TD) bzw. Achsenmerkmalen (AD) beider Inhibitionsmethoden unabhängig vom inhibierten *Cnox*-Gen. Die Anzahl der PAMs ist in absoluten Zahlen aufgetragen.

Gens mit beiden benutzten Agenzien (dsRNA bzw. Morpholino-Oligos) hatte keine sichtbare Wirkung auf die Entwicklung der Versuchstiere (vgl. Kap. 3.2.4.2).

Achsenveränderungen: Die *Cnox-5*-Studien wiesen den prozentual höchsten Anteil an achsenveränderten PAMs auf (RNAi: 87,8% der PAMs, 57,0% der Medusen; Morpholino: 79,1% der PAMs, 52,5% der Medusen; vgl. Abb.3.82 und Abb. 3.84). Den bei weitem niedrigsten Prozentsatz an PAMs mit Achsenveränderungen, zeigten die beiden *Cnox-1*-Inhibitionsstudien (RNAi: 12,6% der PAMs, 9,0% der Medusen; Morpholino: 15,4% der PAMs, 10,2% der Medusen). Die *Cnox-3*-Studien wiesen den zweithöchsten Anteil an achsendeformierten PAMs auf (RNAi: 12,6% der PAMs, 9,0% der Medusen; Morpholino: 15,4% der PAMs, 10,2% der Medusen), wobei 46,9% (RNAi-Studie) bzw. 34,8% (Morpholino-Studie) der PAMs auf die einzelne Merkmalskategorie "doppeltes Manubrium" entfielen. Achsenabnorme Strukturen wurden von 37,2% (RNAi) bzw. 29,3% (Morpholino) der *Cnox-2*-inhibierten Tiere gebildet. Nach Beginn der Studien wurden Veränderungen an Tentakelmerkmalen und an Achsenmerkmalen zeitlich nicht signifikant unterschiedlich detektiert. Jeweils in der zweiten Woche konnte für beide Merkmalsgruppen die erste PAM beobachtet werden. Auch die zahlenmäßige Zunahme an PAMs beider Merkmalsgruppen war im zeitlichen Verlauf der Studie vergleichbar und stetig (vgl. Abb. 3.83).

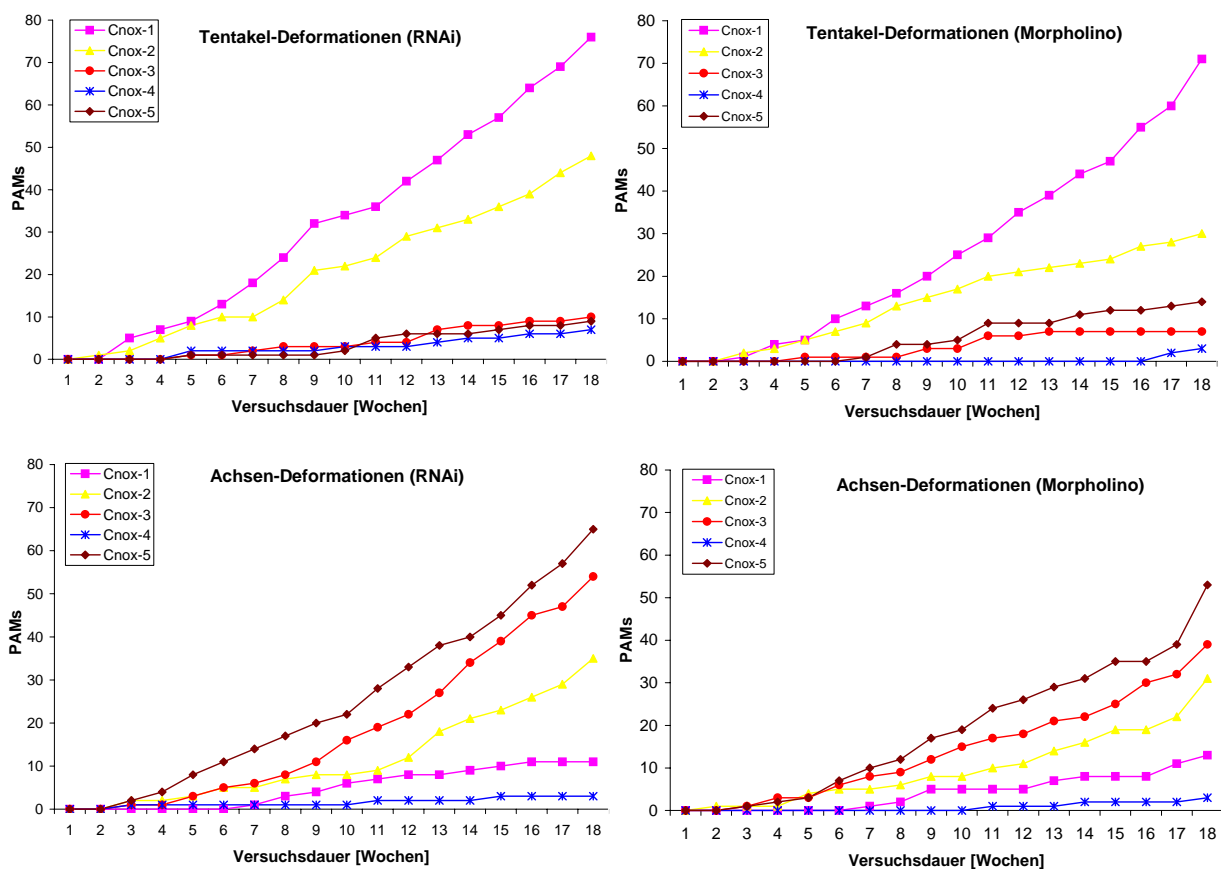


Abb. 3.84 Zeitliche Zunahme an PAMs mit Deformationen an Tentakelmerkmalen bzw. Achsenmerkmalen der fünf RNAi- und Morpholino-*Cnox*-Gen-Inhibitionsstudien im Vergleich. Die Anzahl an PAMs einer Merkmalsgruppe ist für die fünf Gene in absoluten Zahlen aufgetragen.

3.2.7 SIMULTANE INHIBITION ALLER FÜNF *CNOX*-GENE

In einem abschließenden Versuch wurden alle fünf *Cnox*-Gene von *E. dichotoma* gleichzeitig inhibiert. Die verwendeten Mengen an dsRNA bzw. Morpholino-Antisense-Oligos entsprachen für jedes Gen den zuvor beschriebenen Angaben. In den dsRNA- bzw. Morpholino-Kontrollen wurden die Mengen der Agenzien entsprechend verfünffacht. Als zweite Kontrolle diente in jeder Versuchsreihe ein Meerwasser-Ansatz. Für beide Inhibitionsmethoden wurden jeweils drei Versuchsreihen mit einer Dauer von 42 Tagen durchgeführt. Jeder Versuchsansatz enthielt zu Beginn 10 Tiere. Es wurde sichergestellt, dass keines der Versuchstiere zu Versuchsbeginn eine phänotypische Abnormalität und offensichtliche Anzeichen einer sexuellen und/oder vegetativen Vermehrung aufwies. Die Versuchstiere wurden täglich gezählt und einer genauen Untersuchung auf morphologische und entwicklungsbiologische Veränderungen unterzogen.

Die kombinierte Inhibition von allen fünf *Cnox*-Genen resultierte bei beiden Methoden nicht in einer Entwicklung phänotypisch veränderter Versuchstiere, sondern führte zu einem Absterben aller Individuen nach nur wenigen Wochen (vgl. GRIMM, 2002). In den Experimentalansätzen der drei Versuchsreihen der RNAi-

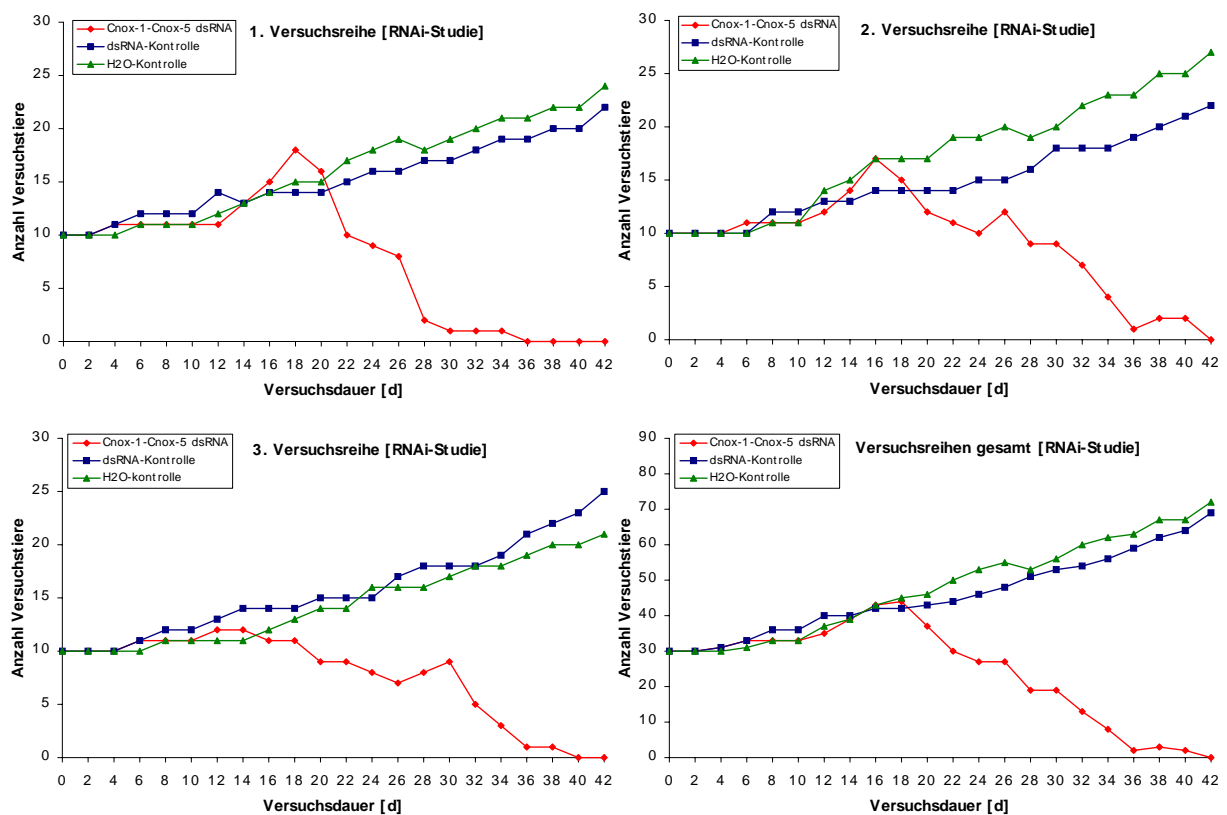


Abb. 3.85 Einfluss der Inhibition aller fünf *Cnox*-Gene via RNAi auf die Vermehrungsrate von *E. dichotoma*. Aufgetragen ist die absolute Anzahl an Versuchstieren gegen die Versuchsdauer. Der Graph rechts unten zeigt eine Zusammenfassung der drei Versuchsreihen.

Studie war die Anzahl der Versuchstiere spätestens zwischen dem vierzehnten und dem achtzehnten Versuchstag rückläufig. Spätestens ab dem vierundzwanzigen Versuchstag unterschieden sich Experimental- und Kontrollansätze signifikant (χ^2 -Anpassungstest; Experimentalansatz vs. H₂O-Kontrolle, $p=0,004$; Experimentalansatz vs. RNAi-Kontrolle, $p=0,026$). Nach sechs Wochen waren in den Experimentalansätzen der drei Versuchsreihen alle Tiere verendet. Die Zunahme der Anzahl an Medusen in den Kontrollen war stetig und entsprach den analogen, zuvor beschriebenen Kontrollwerten (vgl. Abb.3.85).

Die parallele Morpholino-Studie ergab ein sehr ähnliches Resultat. Hierbei war die Anzahl der Versuchstiere in den Experimentalansätzen sogar schon zwischen dem zwölften und dem sechzehnten Versuchstag rückläufig. Spätestens ab dem zwanzigsten Versuchstag unterschieden sich Experimental- und Kontrollansätze signifikant (χ^2 -Anpassungstest, Experimentalansatz vs. H₂O-Kontrolle, $p=0,038$; Experimentalansatz vs. Sense-Kontrolle, $p=0,022$). Nach sechs Wochen (nach nur fünf Wochen in der 1. Versuchsreihe) waren in den Experimentalansätzen der drei Versuchsreihen, gleich der RNAi-Studie, ebenfalls alle Tiere verendet (vgl. Abb.3.86).

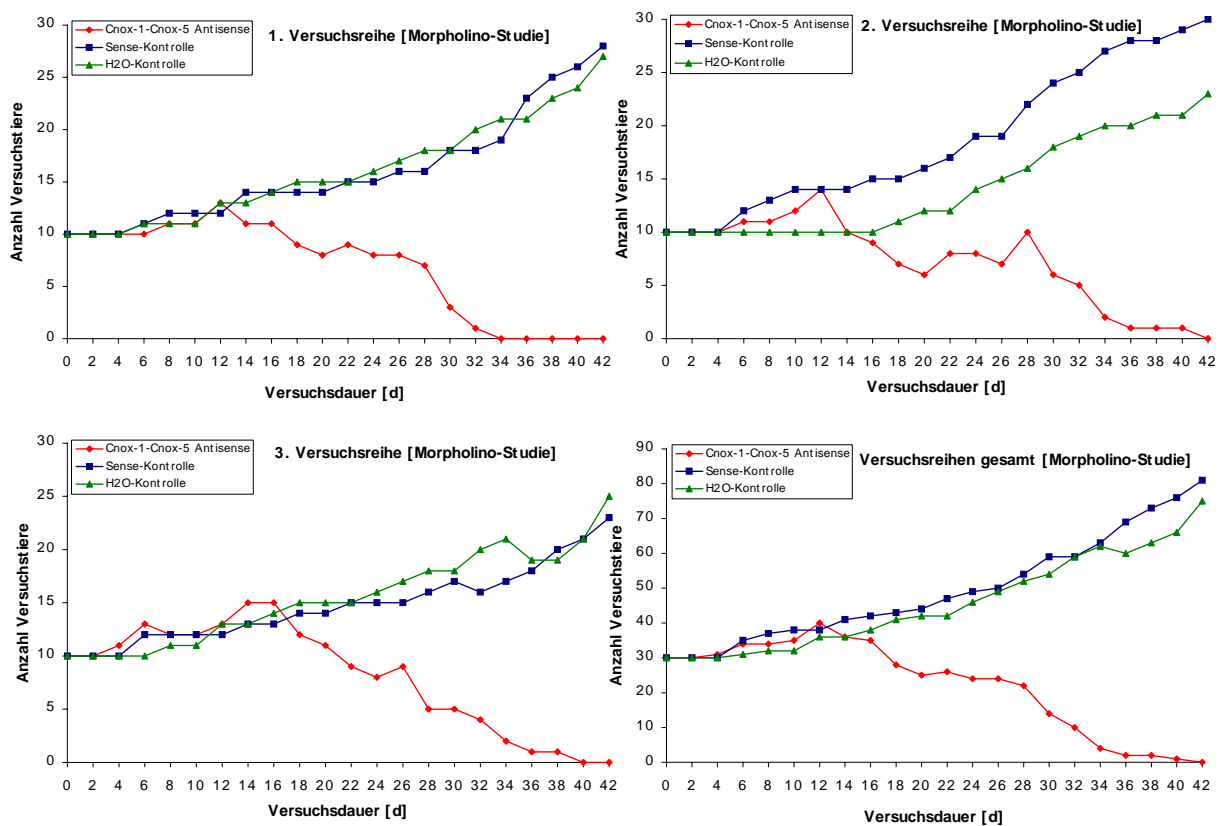


Abb. 3.86 Einfluss der Inhibition aller fünf *Cnox*-Gene via Morpholino-Antisense-Oligonukleotiden auf die Vermehrungsrate von *E. dichotoma*. Aufgetragen ist die absolute Anzahl an Versuchstieren gegen die Versuchsdauer. Der Graph rechts unten zeigt eine Zusammenfassung der drei Versuchsreihen.

4. DISKUSSION

Die Gen-Inhibitions-Experimente am Hydrozoon *Eleutheria dichotoma* und am Placozoon *Trichoplax adhaerens* zeigten eindeutig und erstmalig in Diploblasten, dass sowohl mittels Antisense-Oligonukleotiden als auch mittels dsRNA gezielt Einfluss auf die Expression von Hox-Genen genommen werden kann. Die kombinierte Analyse der Resultate aus den Inhibitions-Experimenten und den Datensätzen der *in situ* Hybridisierung erlauben Aussagen über die Funktionen der untersuchten Hox-Gene.

4.1 METHODISCHE ASPEKTE

4.1.1 INHIBITIONS-EXPERIMENTE

Die signifikanten Abweichungen der Experimental-Ergebnisse von denen der Kontrolle sowie die positive Signaldetektion am Fluoreszenzmikroskop in fast allen Zellen lassen darauf schließen, dass sowohl die Fluoreszin markierten Oligonukleotide als auch die FITC gelabelte dsRNA in die Zellen der Versuchstiere gelangten und dort eine Inhibition der entsprechenden Homöoboxgene bewirkten. Die zelluläre Aufnahme der Agenzien ins Cytosol wurde hierbei offensichtlich sehr effizient mittels der EPEI-*Special Delivery* Transfektionslösung (Morpholino-Oligos; Gene Tools, LLC) bzw. durch das FuGene™ 6 Transfektions-Reagent (dsRNA; Roche) katalysiert. Des Weiteren kann im Falle von *Eleutheria* von einer Aufnahme der Antisense-Oligonukleotide und der dsRNA im Zuge der Nahrungsaufnahme aus dem Gastralraum via "kontraktiler Vakuolen" in die entodermalen Verdauungszellen ausgegangen werden (SCHIERWATER et al., 1992).

Im Verlaufe der Studien erwies es sich als unvermeidbar, dass zuweilen Eleutherien verendeten. Die Mortalitätsrate der PAMs lag über der der Kontroll-Medusen, da in den meisten Fällen die phänotypischen Veränderungen zur Einschränkung bzw. sogar zum Verlust lebensnotwendiger Körperfunktionen führten. Die Inhibitionsstudien an *T. adhaerens* hatten keine erhöhte Sterberate zur Folge. An den *Eleutheria*-Medusen war es nur erschwert möglich, die Merkmale "doppeltes Manubrium" (dM) bzw. "kein Manubrium" (kM) zu detektieren, da das Manubrium der Medusen in aller Regel nicht ausgestülpt wird und zudem am oralen, dem Untergrund zugewandten und somit dem Betrachter normalerweise abgewandten Pol des Tieres lokalisiert liegt. Infolgedessen sind die in Tab. 3.14 bis Tab. 3.23 dargestellten Endergebnisse relativ zu den Ergebnissen der Kontrollexperimente als konservativ zu bewerten und spiegeln eine Unterschätzung der absoluten Anzahl an PAMs wider. Die Anzahl der PAMs stieg bis

zum Ende der Versuche stetig an (und vielfach verstärkt gegen Versuchsende). Die minimale Versuchsdauer sollte unter Berücksichtigung dieses Befundes den Zeitraum von 18 Wochen nicht unterschreiten. Der prozentuale Anteil an PAMs wäre möglicherweise bei längerer Versuchsdauer noch weiter angestiegen.

In den Versuchen wurde die Konzentration der Morpholino-Antisense-Oligonukleotide (1 μM) in den einzelnen Ansätzen so gewählt, wie vom Hersteller (Gene Tools, LLC) als maximal effizient empfohlen. Die in der Literatur gefundenen Vergleichswerte sind entsprechend (z.B.: TAYLOR et al., 1996, Säugerkrebszellen; MORCOS, 2000, 2001, Säugerkrebszellen; MCCAFFREY et al., 2003, *Mus musculus*). Im Vergleich dazu wurden in den Antisense-DNA-Experimenten Oligo-Konzentrationen gewählt, die bis zu Faktor 20 erhöht lagen. Mit der Erhöhung der Konzentration ging innerhalb der Antisense-DNA-Experimente unmittelbar eine Steigerung der Inhibitionseffizienz einher. Die Angaben in der Literatur über Antisense-Oligo-Konzentrationen in vergleichbaren Inhibitionsexperimenten variieren stark. In der Mehrzahl der Studien wurde jedoch die Konzentration ähnlich gewählt wie in der vorliegenden Arbeit (z.B.: 25 μM , WAGNER et al., 1993; WAGNER, 1994; 10-20 μM , RAMCHANDANI et al., 1997, Säugerkrebszellen). Gleichsam existieren aber auch Untersuchungen, welche niedrigere Antisense-Oligo-Konzentrationen beschreiben (z.B.: 2 μM , SCHLINGENSIEPEN et al., 1997; 1 μM , TORTORA et al., 1997, Säugerkrebszellen; 1-10 μM , HARTH et al., 2000, *M. tuberculosis*). Die Konzentration der dsRNA von 10 ng/ μl entsprach dem Transfektionsprotokoll von Roche. Die Literaturangaben hierzu sind vergleichbar (z.B.: 17 ng/ μl , ELBASHIR et al., 2001, Säugerkrebszellen; 30 ng/ μl , HAMMOND et al., 2000, *Drosophila*), allerdings ausreichend effizient ist die Repressionswirkung der dsRNA schon bei einer Konzentration von 0,02 ng/ μl (ELBASHIR et al., 2001).

4.1.2 *IN SITU* HYBRIDISIERUNG

In manchen Fällen (z.B.: Abb. 3.12 & Abb. 3.15) erschien das Expressionssignal im Zuge der (NBT/X-Phosphat-) Farb-Detektion rötlich, anstatt der zu erwartenden typischen violetten Färbung der NBT/X-Phosphat-Präzipitate. Da die Detektionsfärbung des NBT/X-Phosphats aus der Überlagerung zweier Farbpräzipitate resultiert, nämlich blau (NBT) und rot (X-Phosphat), ist anzunehmen, dass die blaue NBT-Farbreaktion nicht erfolgte und nur der rote Niederschlag des X-Phosphatpräzipitats zur Ausprägung kam. Die negativen Kontrollen schließen eine unspezifische Farbreaktion aus.

Die Fluoreszenz-Detektion erwies sich als wesentlich sensitiver als die Farb-Detektion und wurde deshalb hauptsächlich benutzt, um die (*low copy*-) Hox-Gen-Expression nachzuweisen.

4.2 FUNKTION DER UNTERSUCHTEN HOMÖOBOXGENE

4.2.1 FUNKTION VON *Trox-2* IN *TRICHOPLAX*

Das Expressionsmuster des einzigen Placozoen-Hox-Gens beschreibt eine Ringform in der Randzone der Tiere und wird in kleinen, zuweilen geclusterten Zellen zwischen dem funktionell oberen und unteren Epithelium exprimiert (vgl. Abb. 3.13). Die Zellen sind wesentlich kleiner als die Faserzellen der Zwischenschicht bzw. als die Deck-, Drüsen- oder Zylinderzellen. Man kann daher ausschließen, dass es sich bei den gefundenen Zellen um einen dieser vier somatischen Zelltypen handelt und hier offensichtlich ein neuer, noch unbeschriebener Zelltyp in *T. adhaerens* vorliegen muss (JAKOB et al., 2004). Möglicherweise handelt es sich um einen toti- bzw. omnipotenten Typ von Stammzellen, der es vermag, sich in jedweden der vier anderen Zelltypen zu differenzieren, ähnlich den I-Zellen der Cnidarier (vgl. *Hydra*-Stammzellen; DAVID & MACWILLIAMS, 1978) oder den totipotenten Archaeocyten der Poriferen. Gestützt wird diese These zudem durch die Regenerationsexpressions-Experimente (vgl. Abb. 3.15), die zweifelsfrei belegen, dass das *Trox-2*-Gen in der Randzone von sich regenerierendem Zellgewebe exprimiert wird. In diesem Zusammenhang erscheint es interessant, dass fünf weitere Regulator-Gene in *Trichoplax*, *PaxB* (HADRYN et al., unveröffentlichte Daten), *Not*, *SecP1*, *Brachyury* und *Tbx2/3* (MARTINELLI & SPRING, 2003, 2004), ebenfalls in peripheren Randkörperbereichen exprimiert werden. Die Ergebnisse der Inhibitionsstudien zeigen zudem unmissverständlich, dass das *Trox-2*-Gen unabkömmlich für vegetative Teilungsprozesse ist. Kombiniert man diese Befunde mit den Datensätzen der Expressionsstudien ergibt sich ein mögliches Modell, den vegetativen Teilungsmechanismus in Placozoen zu verstehen. Die Inhibition des Gens verhindert offensichtlich die Bereitstellung differenzierter, somatischer Zellen, die aus den toti- bzw. omnipotenten, *Trox-2*-exprimierenden Stammzellen hervorgehen. Letzteres macht eine Teilung der Tiere unmöglich. Diese Annahme korreliert mit der Hypothese, dass diese Stammzellen Differenzierungsprozesse an der Körpergrenze, wo sich das obere und untere Epithelium vereinen, dirigieren. Grundsätzlich nimmt im Zuge der Entwicklung die Plastizität von Zellen ab (Toti- bzw. Omnipotenz > Pluripotenz > Multipotenz; LEVIN, 1998); der Plastizitätsgrad dieser Stammzellen scheint vergleichsweise hoch zu sein.

Hox- und ParaHox-Gene steuern die axiale Musterbildung in Cnidariern und Bilateriern. Mit der Anzahl der Hox/ParaHox-Gene nimmt die Komplexität des Körperbauplans und der axialen Strukturen eines Organismus zu (z.B.: GEHRING, 1998; KNOLL & CAROLL, 1999; vgl. Abb. 4.1). *Trichoplax adhaerens* besitzt keinerlei Achsensymmetrien, das heißt es existiert keine aboral-orale Achse bzw.

Anterior-Posterior-Achse oder eine Bilateralsymmetrie. Die einzige Polarität von *Trichoplax* ist durch die beiden Epithelien der funktionellen Ober- und Unterseite bedingt, welche möglicherweise aus den *Trox-2*-exprimierenden Stammzellen hervorgehen (JAKOB et al., 2004). Es ist demnach naheliegend, dass das Vorhandensein von nur einem Hox/ParaHox-Gen (*Trox-2*) mit dem Fehlen axialer Musterbildung in Placozoen in Zusammenhang steht. Ebenso erscheint es denkbar, dass diesem Hox/ParaHox-Gen die basale Rolle in der Evolution der axialen Musterbildung zukommt und es sich beim *Trox-2*-Gen um das von CASTRO und HOLLAND (2003) postulierte ancestrale (ANTP-) Proto-Hox-Gen handelt (s.a. Abb. 1.3).

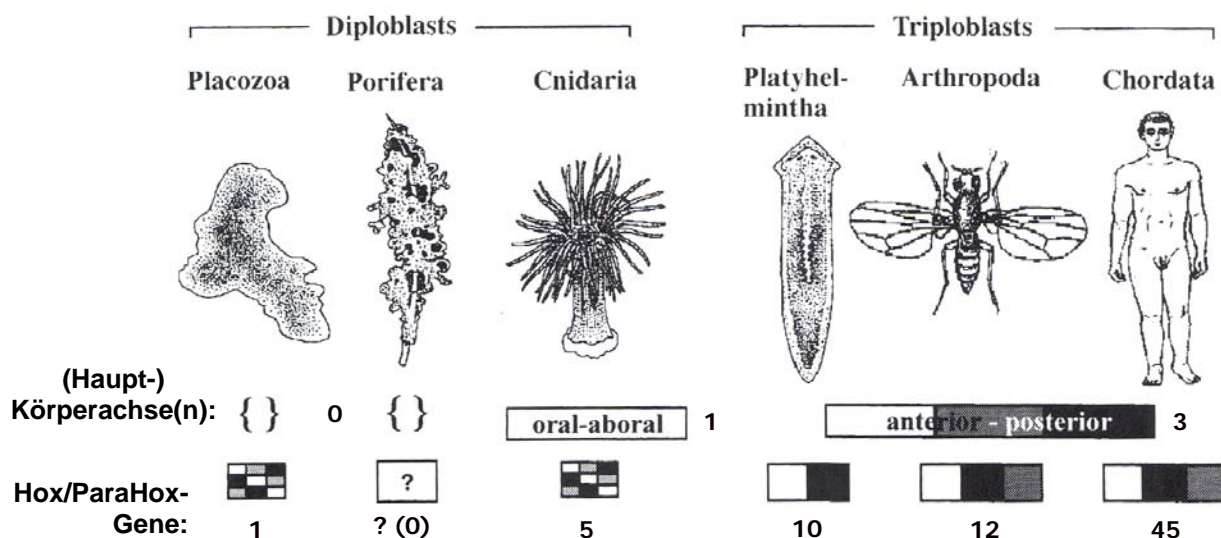


Abb. 4.1 Korrelation zwischen der Anzahl der Hox/ParaHox-Gene und der Komplexität des Körperbauplans (Körperachse(n)) von diploblastischen (*Placozoa*; *Porifera*; *Cnidaria*) und triploblastischen (*Plathelmintha*; *Arthropoda*; *Chordata*) Tierstämmen. Während in Placozoen und Schwämmen keine echte Körperlängsachse zu definieren ist, besitzen Cnidarier eine aboral-orale Hauptkörperachse. In Triploblasten sind drei Achsensymmetrien vorhanden (Bilateral-, Anterior-Posterior-, Dorsal-Ventral-Achse). Modifiziert nach SCHIERWATER & DESALLE (2001).

4.2.2 FUNKTIONEN DER UNTERSUCHTEN *CNOX*-GENE IN *ELEUTHERIA*

Bei der Analyse der Ergebnisse erscheint auffällig, dass die Funktionsstudien der fünf verschiedenen *Cnox*-Gene vergleichbare Tendenzen bezüglich der Qualität der Merkmalsveränderungen aufzeigen, wenn auch in gänzlich unterschiedlicher prozentualer Verteilung. Dieses liegt wahrscheinlich darin begründet, dass die inhibierten *Cnox*-Gene auf komplexe Art und Weise miteinander regulatorisch vernetzt sind (BILLETTER et al., 1993). Homöoboxgene kodieren Transkriptionsfaktoren, die wiederum auf andere homöotische Gene und untergeordnete Genloci einwirken (GEHRING, 1998). So beeinflusst die Inhibition eines homöotischen Gens auch gleichzeitig die Expression anderer Homöoboxgene in einer komplexen Expressionskaskade. Daher hängt der Phänotyp eines Organismus letztlich nicht nur vom Verlust einer homöotischen Genfunktion ab, sondern auch davon, wie andere Gene ihr Expressionsmuster auf diesen Verlust hin ändern (z.B.: GEHRING

et al., 1994, GEHRING, 1998; LEWIN, 1998; MÜLLER & HASSEL, 1998). Somit erscheint es schwer, einzelnen Homöoboxgenen eine spezifische Funktion zuzuordnen, da die untersuchten Hox-Gene sich möglicherweise teilweise und wechselseitig kompensierten (z.B.: DUBOULE, 1994; GEHRING et al., 1994; GEHRING, 1998; LEWIN, 1998). Aufgrund der Ähnlichkeiten zwischen den Hox-Gen-Homöodomänen (z.B.: *Cnox-1/Cnox-3*: 36 Aminosäuren; *Cnox-2/Cnox-3*: 34 Aminosäuren oder *Cnox-1/Cnox-5*: 33 Aminosäuren) und den hoch konservierten Sequenzmotiven dieser Proteine (u.a. LELEKEF, KIWFQNRMMK; vgl. Abb. 4.2) kann man annehmen, dass sie möglicherweise einander überlappende Sequenzmuster erkennen. Nahe verwandte Homöoproteine könnten daher um dieselben Bindungsstellen auf der DNA konkurrieren und gegebenenfalls den Ausfall einer Genfunktion kompensieren. Es sind Arbeiten bekannt, die eine solche funktionelle Redundanz unterschiedlicher Homöoproteine mit gleichen DNA-Bindestellen beschreiben (vgl. KISSINGER et al., 1990; GEHRING, 1998; MÜLLER & HASSEL, 1998).

Cnox-1: SKRKRMTYSRKQLELEKEFHLSHFLLKERRVDLAKQLNLSERQIKIWFQNRMMKFKKEN
Cnox-2: SKRIRTAYSIQLELEKEFQNNRYLSRLRRIQIAAMLDLTEKQVKIWFQNRVRVKKDK
Cnox-3: SKRKRTSYSRRQIFELENEFNRSRYITREKRIELSMILNLTERQVKTWFQNRMMKTKKEK
Cnox-4: AMRSRPFSSHQTRLELEKEFLVCQYVTRRRRIELAFSLNLSKQIKTWFQNRVRVKKERKQK
Cnox-5: ICKKRVCFQKQIVELEKEFHYNRYLTRARRVEIAQLLKLTEAQIKIWFQNRMMKQKREQ

Abb. 4.2 Homöodomänen der fünf *Cnox*-Gene von *E. dichotoma* im Vergleich. Konservierte Aminosäurepositionen sind rot bzw. blau markiert.

Das Muster der Genexpression bestimmt das Schicksal und die Funktion einer Zelle im sich entwickelnden sowie adulten Organismus. Da es wiederum Genprodukte sind, die die Genexpression steuern, wird die Zelldifferenzierung also über eine Verkettung sich bedingender Expressionsmuster reguliert. In Eukaryoten sind Histonkomplexe und andere Proteine mit regulatorischer Funktion an die DNA gebunden. Zellulär gesteuerte Modifikationen dieser Proteine können die Zugänglichkeit von DNA-Abschnitten für Proteine der RNA-Transkription verändern (LEVIN, 1998). Genregulation bei Eukaryoten erfolgt also nicht nur über die Aktivität von Transkriptionsfaktoren, sondern zusätzlich über strukturelle Modifikationen der DNA-bindenden Proteine und darüber hinaus dem ontogenetischen Entwicklungsstadium eines Organismus. Insbesondere aus diesen Gründen kann ein und derselbe Transkriptionsfaktor in unterschiedlichen Zelltypen oder zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Ontogenese die Expression verschiedener Gene beeinflussen (BROCK, 2002) und somit umgekehrt, die Repression eines Transkriptionsfaktors die Ausbildung verschiedener Phänotypen als Folge haben.

Unmissverständlich zeigen die Ergebnisse jedoch, dass die fünf in den Studien inhibierten Hox/ParaHox-Gene (*Cnox-1* - *Cnox-5*) in *E. dichotoma* eine Funktion bei der Determination der Aboral-Oral-Achse einnehmen. Gleichwohl sind sie auch in regionale Strukturbildungsprozesse wie die Tentakeldifferenzierung involviert.

4.2.2.1 FUNKTION VON *CNOX-1*

Bisher liegen keinerlei Publikationen über Hox-Gen-Inhibitionsstudien in Diploblasten vor. Außer den Studien am *Anthox-1*-Gen in *Nematostella vectensis* (FINNERTY, 1998, 2003) existieren zudem keine Arbeiten, die in irgendeiner Weise Aussagen über die Funktion oder die Expression von Homologen des *Cnox-1*-Gens in anderen Cnidarier-Arten zulassen. Eine phylogenetische *Neighbor-Joining*-Analyse der bisher bekannten Hox/ParaHox-Gen-Sequenzen gruppiert das *Cnox-1-Ed*-Gen zusammen mit dem *Cnox-1*-Gen des Süßwasserhydrozoons *Hydra magnipapillata* (NAITO et al., 1993; KROIHER, 1999, 2000), von welchem jedoch keine Expressionsdaten vorliegen (GAUCHAT et al., 2000; FINNERTY, 2003). Das homologe Anthozoen-Hox-Gen (*Anthox-1*) von *Nematostella vectensis* wird ektodermal am aboralen Pol des Polypen exprimiert (FINNERTY, 1998, 2003). Die erhobenen Datensätze stehen hiermit nicht im Einklang. Das *Cnox-1-Ed*-Gen wird zwar ebenfalls ektodermal, aber nur in der Medusengeneration im oralen Nesselkanal exprimiert.

In der vorliegenden Arbeit wiesen nach der Inhibition des *Cnox-1*-Gens in der RNAi-Studie 87,4% der PAMs und in der Morpholino-Studie 84,5% der PAMs Veränderungen an Tentakelmerkmalen auf. Nur entsprechend 12,6% bzw. 15,5% der PAMs hingegen betrafen Veränderungen an Aboral-Oral-Achsenmerkmalen. Dies legt die Vermutung nahe, dass das *Cnox-1*-Gen in *E. dichotoma* eine gewichtige Funktion bei der Tentakeldetermination einnimmt, und dass die Zellen, die für Tentakel betreffende Regenerations- und Neubildungsprozesse Verantwortung tragen, im Nesselkanal lokalisiert liegen (s.a. HAUENSCHILD, 1957b). Die Art der Tentakelveränderungen lässt sich auf zwei Hauptkriterien reduzieren. Zum einen zeigten sich Veränderungen in der Variation von Tentakelgröße bzw. Tentakellänge (ZT) und zum anderen in Veränderungen, die die dichotome Tentakelsymmetrie betrafen (DT, MT). Letzteres wurde insgesamt bei 70,8% der tentakelveränderten PAMs beobachtet. Diese Befunde lassen darauf schließen, dass das *Cnox-1*-Gen möglicherweise Formbildungsprozesse, die die Polarität innerhalb sehr lokaler Strukturen betreffen determiniert (vgl. JAKOB, 2001; GRIMM, 2002). Gleichsam fällt auf, dass es niemals zu einem gänzlichen Ausfall der Tentakelausbildung kam, sondern nur zu Doppel-, Mehrfach- oder Missbildungen. Denkbar wäre, dass die induzierte Inhibition des *Cnox-1*-Gens nur teilweise und unzureichend durch ein anderes Gen kompensiert wurde oder dass die koordinierte Expression untergeordneter Regulator-Gene bzw. ganzer Regulator-Gensätze durch den Genausfall nicht mehr gewährleistet war, so dass die nachfolgend unregulierte Expressions-Kaskade die Ausbildung doppelter und mehrfacher (Tentakel-) Strukturen als Folge hatte.

Möglicherweise ist das Gen darüberhinaus in Differenzierungsprozesse der verschiedenen, hochkomplexen Cnidoblasten eingebunden, die in einem steten Fließgleichgewicht vom Nesselkanal über das Tentakelektoderm zu den distalen Nesselzellenkomplexen stehen, wo sie die verbrauchten Vorgängerzellen erneuern (HAUENSCHILD, 1957b). Das Expressionssignal resultierte aus den undifferenzierten I-Zellen des Nesselkanals, aus welchen u.a. die verschiedenen Cnidoblasten hervorgehen.

4.2.2.2 FUNKTION VON *CNOX-2*

Das primär von höheren (triploblastischen) Tieren bekannt gewordene ParaHox-Gen *Gsx* hat möglicherweise ein Homolog im *Cnox-2*-Gen diploblastischer Tiere (vgl. SCHIERWATER & DE SALLE, 2001; FERRIER & HOLLAND, 2002; SCHIERWATER et al., 2002). Sollte es sich bei den *Gsx*- und *Cnox-2*-Genen, wie von manchen Autoren vermutet, um wirkliche Homologe handeln (z.B.: GALLIOT, 2000; GALLIOT & MILLER, 2000; KOURAKIS & MARTINDALE, 2000; FERRIER & HOLLAND, 2001a; FINNERTY et al., 2003), wäre hiermit ein regulatorisches Entwicklungsgen der ANTP-Klasse für tiefgreifende vergleichende Untersuchungen an vermutlich allen Metazoen-Tierstämmen disponibel. Sollten die beiden Gene indes nicht zu homologisieren sein (SCHIERWATER & DE SALLE, 2001), stünde vielleicht ein sehr ähnliches Hox/ParaHox-Gen für vergleichende Betrachtungen innerhalb der Diploblasten und Triploblasten zur Verfügung. In Bilateriern determiniert das *Gsx*-Gen am anterioren Pol die cerebralen Strukturen (HSIEH-LI et al., 1995; SZUCSIK et al., 1997; BROOKE et al., 1998). Auch in Diploblasten, speziell in Cnidariern, sind die Struktur und die Expression des *Diplox-2*-Gens vergleichsweise gut examiniert, obgleich die Untersuchungen zum Teil sehr widersprüchliche Befunde ergaben. Demnach soll das Gen in die Aboral-Oral-Achsendetermination bzw. in Differenzierungsprozesse der Polregionen (zumeist vegetativ/oral, selten animal/aboral) involviert sein (z.B.: GALLIOT & SCHMID, 2002; RYAN & FINNERTY, 2003). Eine orale, ektodermale Expression des *Cnox-2*-Gens im Polypenstadium wurde in den Hydrozoen *Hydractinia symbiolongicarpus* (MURTHA et al., 1991; CARTWRIGHT & BUSS, 1999; CARTWRIGHT et al., 1999; auch entlang des gesamten Polypen-Hydranths), *Hydra vulgaris* (ENDL et al., 1999; GAUCHAT et al., 2000; MILJKOVIC et al., 2002), *Chlorohydra viridissima* (SCHUMMER et al., 1992) sowie den Anthozoen *Nematostella vectensis* (FINNERTY et al., 2003; RYAN & FINNERTY, 2003) und *Acropora millepora* (HAYWARD et al., 2001; auch in Planulae) gefunden. Für *Hydra magnipapillata* wurde hingegen eine aborale, ektodermale Expression des *Cnox-2*-Gens postuliert (SHENK et al., 1993a, b). Aboral und entodermal soll das Gen in den Planularlarven von *Podocoryne carnea* exprimiert werden (YANZE et al. 2001). Diesem wiederum widersprechen Daten von MASUDA-NAKAGAWA und

Mitarbeitern (2000), die das Gen in allen drei morphologischen Erscheinungsformen der Art exprimiert fanden, in Larven zwar ebenfalls aboral, aber ektodermal. In der Medusen- und Polypengeneration soll das Gen hingegen oral und ektodermal, nur in adulten Medusen auch entodermal, exprimiert werden.

Die erhobenen Datensätze stehen mit den Ergebnissen der Mehrzahl der Autoren im Einklang. Gleich den für das Hydrozoon *Podocoryne carnea* postulierten Befunden (MASUDA-NAKAGAWA et al., 2000), wird das *Cnox-2*-Gen in *E. dichotoma* in allen drei morphologischen Erscheinungsformen exprimiert. Die Expressionsmuster in Polyp und Meduse sind fast identisch. In der Polypengeneration und in Planularlarven von *E. dichotoma* wird das *Cnox-2*-Gen ektodermal am oralen Pol exprimiert (vgl. u.a. CARTWRIGHT et al., 1999; ENDL et al., 1999; GAUCHAT et al., 2000; HAYWARD et al., 2001; MILJKOVIC et al., 2002; FINNERTY et al., 2003; FRÖBIUS et al., 2003). Dies suggeriert eine Beteiligung des Gens bei der "Kopfbildung" des Polypen sowie der Tentakeldifferenzierung. Für *Hydractinia symbiolongicarpus* wurde gezeigt, dass ein Homöobox-Gen der *empty spiracles*-Klasse (*Emx*-Genfamilie; ANTP-Klasse) ebenfalls bei der Bildung der oralen Polregion des Polypen eine basale Funktion einnimmt (MOKADY et al., 1998). Die Expression wurde hierbei aber im entodermalen Gewebe gefunden.

Die entodermale Expression in den jungen Medusenknospen lässt vermuten, dass das Gen auf Medusenebene die embryonale Achsendetermination (mit-) steuert. Im Kontrast zu den Studien am homologen *Trox-2*-Gen in Placozoen hatte die Inhibition des Gens in der vorliegenden Arbeit keinen signifikanten Einfluss auf die vegetative Vermehrungsrate, freilich aber wiesen 45,8% der PAMs bei Versuchsende eine wesentliche Deformation der Körperlängsachse und der radialen Symmetrie auf. Dieser Befund bestärkt die These, dass das Gen unmittelbar die Achsendetermination der Meduse dirigiert. Denkbar wäre zudem, dass das *Cnox-2*-Gen als ein fundamentales Masterkontrollgen eine hierarchisch sehr übergeordnete Funktion einnimmt, da auch ein relativ hoher Prozentsatz an Medusen abnorme Tentakelstrukturen aufwies (33,8%). Die Expression im Knospenentoderm in dem sehr frühen Entwicklungsstadium der Medusen könnte darauf hindeuten, dass das Gen zu Beginn der axialen Musterbildung, die grundlegenden Determinationsschritte steuert und somit auch gleichzeitig auf spätere, regionale Strukturbildungsprozesse Einfluss nimmt. Dafür spräche zudem die, für ein übergeordnetes Masterkontrollgen typisch niedrige Expressionsrate des *Cnox-2*-Gens (vgl. RT-PCR; Abb. 3.67). Das *Pax-6*-Gen in *Drosophila* beispielsweise, ebenfalls ein Masterkontrollgen, setzt nach seiner Translation die Expressionskaskade von ca. 2000 Genen in Gang (GEHRING & IKEO, 1999; PINEDA et al., 2000).

4.2.2.3 FUNKTION VON *CNOX-3*

Der gegenwärtige Kenntnisstand zur Funktion und Expression des *Cnox-3*-Gens in Diploblasten beschränkt sich auf wenige empirisch ermittelte Datensätze aus Studien an *Hydra vulgaris* und somit ausschließlich auf das Polypenstadium eines Hydrozoons (GAUCHAT et al., 2000; PENNISI, 2000; SMITH et al., 2000; BODE, 2001). Demnach wird das Gen ektodermal am oralen Pol an der Basis der Tentakelzone und um das Hypostom herum exprimiert. Im *Hydra*-Polypen wurde zudem nachgewiesen, dass das *Cnox-3*-Gen unmittelbar in Regenerationsprozesse der "Kopfreion" involviert ist. Die Befunde der vorliegenden Arbeit lassen sich hiermit nur in Teilen in Kongruenz bringen. In den untersuchten Polypen von *E. dichotoma* konnte bei keinem Tier ein Expressionssignal detektiert werden. Positive Signale wurden hingegen nur in der Medusengeneration gefunden, in dieser aber gleichsam oral und ektodermal um das dem Polypenhypostom homologe Manubrium. Ein vergleichbares Expressionsmuster am bzw. um das Medusenmanubrium während der Entwicklung und eine Einbindung in die axiale Musterbildung wurden für das *PMP1*-Gen im Hydrozoon *Podocoryne carnea* postuliert (PAN et al., 1998). Das Genprodukt, eine Zink-Metalloproteinase spielt u.a. auch in *Drosophila* eine fundamentale Rolle im Zuge der dorsoventralen Achsenbildung, indem sie durch proteolytische Spaltung andere Transkriptionsfaktoren aktiviert (SHIMELL et al., 1991).

Die Inhibition des *Cnox-3*-Gens in *E. dichotoma* hatte in der RNAi-Studie 42,9% und in der Morpholino-Studie 36,1% Medusen mit deformierter Aboral-Oral-Achse zur Folge. Zudem bildeten 46,9% der phänotypisch abnormen Medusen in der RNAi-Studie (Morpholino-Studie: 34,8%) einen doppelten "Kopf" mit zwei basal verbundenen Mundrohren aus. Dies legt die Vermutung nahe, dass das *Cnox-3-Ed*-Gen eine gewichtige Funktion bei der Determination des axialen und radialen Musters sowie der oralen Manubrienregion einnimmt. Im ektodermalen, oralen Körperbereich um das Manubrium, dort wo die Expression des *Cnox-3-Ed*-Gens nachgewiesen werden konnte, liegen keine Stammzellen lokalisiert (vgl. KRUMBACH, 1907; LENGERICH, 1923; HAUENSCHILD, 1956, 1957a, b; NAUMOV, 1967). Man könnte deshalb vermuten, dass die Signalzellen entweder aus Zellen, die aus dem entodermalen Ringkanal oralwärts auswandern oder aus vom Nesselkanal zentripetal nach innen wandernden Zellen resultieren, um dann am Zielort angelangt, Differenzierungs- und Regenerationsprozesse am Manubrium zu begleiten. Das *Cnox-3-Ed*-Gen würde nach diesem Modell erst später, in den sich bereits am Zielort befindlichen, sich aber noch entwickelnden Zellen exprimiert.

4.2.2.4 FUNKTION VON *CNOX-4*

Die Datensätze zur Expression und Funktion des *Cnox-4*-Gens wirken zunächst in sich sehr un schlüssig. Zum einen konnten mit Hilfe der RT-PCR in aus Medusen isolierter RNA eindeutig *Cnox-4*-Transkripte nachgewiesen werden, wenngleich auch die Expressionsrate relativ zu manchen der anderen *Cnox*-Genen sehr niedrig war (vgl. Abb. 3.67). Die Sequenz-Charakterisierung des Gens (KUHN et al., 1996) wurde ebenfalls an Hand von Medusen-cDNA vollzogen. Dennoch war es in der vorliegenden Studie nicht möglich, mittels *in situ* Hybridisierung ein Expressionsmuster in der Medusengeneration aufzuzeigen. Auch konnte im Rahmen der Inhibitionsexperimente kein signifikanter Unterschied in der Entwicklung bzw. Morphologie der Kontrollmedusen im Vergleich zu den *Cnox-4*-defizitären Tieren beobachtet werden. Vergleichende Datensätze zur Funktion und Expression von *Cnox-4*-Homologen in anderen Cnidarier-Arten wurden bisher nicht erbracht. Phylogenetische *Neighbor-Joining*-Analysen der bisher bekannten Hox/ParaHox-Gen-Sequenzen suggerieren eine nahe Verwandtschaft des *Cnox-4-Ed*-Gens zu den triploblastischen *Cdx*-Genen (kaudal determinierende ParaHox-Gene; CALVO et al., 2000; GAUCHAT et al., 2000; FINNERTY, 2003; HOLLAND, P., 2004, pers. Mittlg). Tatsächlich wird das *Cnox-4*-Gen in *E. dichotoma* in der, dem kaudalen Pol der Triploblasten vermeintlich homologen (z.B.: FINNERTY et al., 2003) Fußregion des Primärpolypen exprimiert. Dies legt eine Einbindung des Gens in Determinationsprozesse der aboralen Region und möglicherweise der frühen Stolonbildung nahe. Hingegen konnte im Planulastadium kein Expressionsmuster gefunden werden. Die sehr niedrige Expressionsrate in der Medusengeneration lässt darauf schließen, dass dem *Cnox-4*-Gen in Entwicklungsprozessen dieser eine eher untergeordnete Rolle zukommt. Der Genausfall im Zuge der Inhibitionsstudien wurde entweder durch ein anderes Gen kompensiert oder hatte keine phänotypisch sichtbaren Auswirkungen. Der fehlende Nachweis eines Expressionsmusters in der Medusengeneration ließe sich möglicherweise dadurch erklären, dass das Gen gegebenenfalls nur in einem sehr kurzen und/oder speziellen Zeitfenster (Entwicklungsstadium) aktiv ist, in welchem keine Tiere untersucht (fixiert) wurden.

4.2.2.5 FUNKTION VON *CNOX-5*

Die für das *Cnox-5*-Gen erhobenen Inhibitionsdaten deuten an, dass das Gen von grundlegender Bedeutung für die Determination der Aboral-Oral-Achse der Medusen ist. In der *Cnox-5*-RNAi-Studie wiesen 87,8%, in der *Cnox-5*-Morpholino-Studie 79,1% der PAMs grobe Deformationen an Oral-Aboral-Achsenmerkmalen auf. Die Inhibition des *Cnox-5*-Gens hatte den höchsten Prozentsatz an achsenabnormen Tieren in der gesamten Inhibitionsstudie als Folge. Für das *Cnox-5*-Gen konnte in der Medusengeneration paradoxerweise kein Expressionsmuster

gefunden werden, obwohl, gleich dem *Cnox-4*-Gen, in der RT-PCR aus Medusen isolierter RNA ein positives Bandensignal zu detektieren war. Die Gelbande war allerdings sehr schwach, was auf eine quantitativ sehr niedrige oder zeitlich sehr kurze Genexpression hindeutet (vgl. Abb. 3.67). Die Tatsache, dass der prozentuale Anteil an achsendeformierten PAMs derart hoch lag, suggeriert eine sehr basale Rolle des *Cnox-5*-Gens im Zuge der Musterbildung der Meduse. Bisher wurden nur fünf vermeintliche *Cnox-5-Ed*-Homologe in anderen Cnidarier-Arten beschrieben. Vergleichend experimentelle Expressionsdaten aus der Medusengeneration liegen nur vom Hydrozoon *Podocoryne carnea* vor. Demnach wird das *Cnox-1-Pc*-Gen (*Cnox-5*-Homolog von *E. dichotoma*) in den Epithelmuskelzellen der Hydromeduse exprimiert (AERNE et al., 1995; MÜLLER et al., 1999; YANZE et al., 1999, 2001; GALLIOT & SCHMID, 2002). Ansonsten beschränken sich die wenigen bisher postulierten Datensätze anderer Autoren ausschließlich auf das (adulte) Polypenstadium. In *Hydra vulgaris* wird das *Cnox-5-Ed*-homologe Gen in der oralen Polregion exprimiert (GAUCHAT et al., 2000). Das gleiche Expressionsmuster und eine Beteiligung an Regenerationsprozessen des oralen "Kopfes" wurden im Hydropolypen von *Chlorohydra viridissima* gefunden (SCHUMMER et al., 1992). Im Anthozoon *Nematostella vectensis* wird das homologe *Anthox-6*-Gen hingegen aboral (und entodermal) exprimiert (FINNERTY, 2003). Expressionsdatensätze für das *Cnox-5-Ed*-Homolog in *Hydra magnipapillata* (*Cnox-4-Hm*; NAITO et al., 1993) wurden bisher nicht erbracht.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit stehen mit den Befunden der genannten Autoren nicht im Einklang, da in adulten Polypen (und in der Medusengeneration) keine Expression des *Cnox-5-Ed*-Gens nachgewiesen werden konnte. Vielmehr war eine solche nur in Planularlarven und Primärpolypen zu detektieren. In ca. drei Tage alten Planularlarven wurde das *Cnox-5-Ed*-Gen in ektodermalen Zellen am animalen Pol exprimiert, beschränkte sich aber auf einen maximal 3-5 Zellen breiten Bereich des aboralen Ektoderms (vgl. Abb. 3.73 C). Diese Expressionzone verlagerte sich bei ca. sechs Tage alten Larven weiter in Richtung zum vegetativen Pol und expandierte in seiner räumlichen Breitenausdehnung auf bis zu 10 Zellen (vgl. Abb. 3.73 F). In Primärpolypen wird das *Cnox-5*-Gen, wie auch in den jungen Planularlarven, am animalen Pol exprimiert. Zudem wiesen die untersuchten Jungpolypen einen gleichgroßen Bereich *Cnox-5*-exprimierender Zellen am oralen Pol auf (vgl. Abb. 3.73 H). Ein fast identisches Expressionsmuster wurde in Planularlarven und Primärpolypen von *Podocoryne carnea* gefunden (YANZE et al., 2001). Offensichtlich begleitet das Gen eine fundamentale Rolle im Rahmen der gesamten larvalen Polypenentwicklung. Diese basale Stellung in der Koordination der Polypen-Ontogenese betrifft, wie die Expressionsdaten suggerieren, sowohl Determinationsprozesse der frühen aboralen, als auch der späteren aboralen und oralen Polregion.

4.3 AUSBLICK

Die simultane Inhibition der fünf *Cnox*-Gene (*Cnox-1* - *Cnox-5*) hatte das Absterben aller Medusen binnen weniger Wochen als Konsequenz (s.a. GRIMM, 2002). Offensichtlich konnte in den Einzelgeninhibitionsstudien ein Genausfall durch die anderen vier Transkriptionsfaktoren kompensiert werden oder die Vitalität der defizitären Tiere war letztendlich durch die abnormen Strukturen nur selten und nicht unmittelbar zwingend lebensbedrohlich beeinträchtigt. Eindeutig zeigen die Daten aber, dass der simultane Ausfall der fünf *Cnox*-Gene ein Überleben der Medusen unmöglich macht. In diesem Zusammenhang wäre es in nachfolgend kombinierten Gen-Inhibitionsstudien interessant zu erarbeiten, welche Gensätze zum Überleben der Tiere essentiell sind und ob die kombinierte Inhibition von schon zwei, drei bzw. vier *Cnox*-Genen ein Überleben der Eleutherien verhindert, oder ob möglicherweise neue Merkmale und Merkmalskombinationen entstünden. Histologische Untersuchungen an den defizitären Eleutherien würden weiteren Aufschluss über die Entwicklung der Gewebeverbände und das Schicksal der beiden Keimblätter in den abnormen Körperstrukturen erbringen. Dies könnte gewichtige Datensätze zum weiteren Verständnis der Hox-Genfunktionen liefern. Um die Funktionen der untersuchten Gene aber insgesamt zu verstehen, sind, da die räumlich-zeitlichen Expressionsmuster nun aufgeklärt wurden, nachfolgende Inhibitionsstudien an Larven- und Polypenstadien der Art zwingend notwendig.

Weitere Gen-Inhibitionsstudien an anderen diploblastischen Organismen könnten zeigen, ob eine Kongruenz in der Funktion einzelner Homöoboxgene, sowohl innerhalb der *Cnidaria* als auch stammesübergreifend, besteht. Des Weiteren herrscht wenig Klarheit über die genomische Anordnung von Homöoboxgenen in diploblastischen Organismen und über die Korrelationen zwischen Genclustering und Körperbauplan. Erste gewonnene Datensätze an *E. dichotoma* geben bis jetzt keinerlei Hinweise auf eine mögliche Clusterung einzelner Diploblasten-Hox-Gene (KAMM et al., unveröffentlichte Daten), eine abschließende Aufklärung der Problematik steht jedoch noch aus.

5. ANHANG

5.1 cDNA-SEQUENZEN DER HOMÖOBOXGENE

Aufgeführt sind die cDNA-Sequenzen der Homöoboxgene *Cnox-1*, *Cnox-2*, *Cnox-3*, *Cnox-4*, *Cnox-5* von *Eleutheria dichotoma*, *Trox-2* und β -Aktin von *Trichoplax adhaerens* (modifiziert nach KUHN, 1997). Unterstrichen sind die Homöoboxen bzw. die Homöodomänen, fettgedruckt die Bindungssequenzen der Antisense-Oligodesoxyribonukleotide (grün) bzw. der Morpholino-Antisense-Oligonukleotide (rot) der Inhibitionsversuche. Die Interferenzbereiche der dsRNA sind gelb unterlegt. Die gleichen Sequenzbereiche betreffen die Sonden der *in situ* Hybridisierung.

cDNA *Cnox-1*

```

AACTCGTCAAATCAATTCATTGTTATAATTATATGCTACAAGATTGTTAGTAAAGATAAT 60
ATAAATATCAAAACTATTCTTAAAAAAGGTA GTTTACTTTCAGCAATTATTTTTAAATC 120
TATTAATGAATTAGTAAATTAAATACTAATGGAAATTTCTCGTTTGCAACAAATTGATTC 180
                                     M E I S R L Q Q I D S
AATTCAAAATAATGACAATGATGATAGATACCACTATGCACACAATTCAAGAACACCTGC 240
I Q N N D N D D R Y H Y A H N S R T P A
TTTGATATCAAGCCACGCTACAAATTTTCGATCTGCTTTTCTCCCAACAACTCTGTCAAG 300
L I S S H A T N F R S A F L P T T L S S
TCACCAATATCAAAGTAGCGTTATAAGAAATATCGATAATAGTACGGATACGACAAGTTT 360
H Q Y Q S S V I R N I D N S T D T T S F
TGGTTCCTTTAGTCACGGAAATGAAAGTTCAACACACAATAGCTTACCGTATCCTCCGAA 420
G S F S H G N E S S T H N S L P Y P P N
CTCGACTCATATCGAACTACCGTCTTATTTATCAAATACAGGTTTACCGCCAGCAACATC 480
S T H I E L P S Y L S N T G L P P A T S
TAGTTTATCAGCATTCTATAATCCAATTCATTCTTCGTCGCAAGCACACCTCGCAGAATA 540
S L S A F Y N P I H S S S Q A H L A E Y
TCAACAATGGCCGTACGGCAACGTTTCACCTTCTGGGAATTATATATACGGATATGGTAG 600
Q Q W P Y G N V S P S G N Y I Y G Y G S
TCCGATGAATAACGGATTCAATCCGTATTCTTCTGTTGATAGTAATGGATTTGCAGGATC 660
P M N N G F N P Y S S V D S N G F A G S
GAGTTCCTGGTTATATAGAGATATTGATAGTAAACGCAAACGAATGACTTATTCGAGAAA 720
S S W L Y R D I D S K R K R M T Y S R K
ACAGTTATTAGAACTTGAAAAAGAATTCCACTTAAGTCATTTTCTGAAAAAAGAAAGAAG 780
Q L L E L E K E F H L S H F L K K E R R
AGTTGACTTGGCAAAACAGCTTAATCTAAGTGAACGTCAAATAAAGATTTGGTTTCAAAA 840
V D L A K Q L N L S E R Q I K I W F Q N
TCGTAGAATGAAGTTTAAAAAGGAAAATAAAAAAACTTCCAGTTCTGAATCAATTATGAA 900
R R M K F K K E N K K T S S S E S I M N
TCAAGAAGCACAAAAAATTGAAGAACATCCTGATATCATTCTGAAAATGTAAGTGAACA 960
Q E A P K I E E H P D I I S E N V T E Q
ACAAGAAACAAATGAAAATATAGAAAATGAAGAAAAAGATAAAAAAATGAATATTCAGCA 1020
Q E T N E N I E N E E K D K K M N I Q Q
GATAAATTTGAATGATATGAAAATTTTCATGATGTCACACGTTGCTAGGATTTAAATGAA 1080
I N L N D M K N F M M S H V A R I
CTATTTACGTTAATTTGCTTTTTCATTTTCGATACGATCTTTACCAGAGATAAAAGGTTTAT 1140
CGTACAAGGTACACTTGTATGACAAACAAGTTTTTATTTGCTTGCTTTTTTAAAGTAAAAG 1200

```

TTCATACAGTTCTTCATTTGCGAAAAAAAAACAAAAATAAAATGAATTTGCGATTTTACAA 1260
 ATTTAAAAATATGAAAGGTTTCAACTTCGTTGCTGTTATGAAATAATCTATATGTATATA 1320
 CAAAAATTATTTACAACGCTTTAGAAAAAAAAATAAECTTGCAAATAATAATTACACAAAAT 1380
 TTAAAAAAAAAAAAAAAAA 1396

cDNA Cnox-2

CATTTGATTACAACAGTTGTCAAAGAAGGAAGAAATAGTTTCGATTGAACAAATATTAGTG 60
 H L I T T V V K E G R N S S I E Q I L V
 AAAAAAAAAAGATATGTCGACTTCAAAGTCGTTTCTTATCGATACAATTATGCATGAAAAA 120
 K K K D M S T S K S F L I D T I M H E K
CAGAAACTATTATTACGTCAGCAACCAACCGCTGCACCTTACGTCAGGGAATCTTCTCCA 180
 Q K L L L R Q Q Q P L H L T S R E S S P
 GTTTCAGACCATTCTACTTCAAGATTGATGATGTCATCAGAAGATATTAGGTATAACAGA 240
 V S D H S T S R L M M S S E D I R Y N R
 TCCCTGGTTCTTCGCCTCGTACTCCACCAACACCTCAAGTTATGGACTTTCACATGATG 300
 S P G S S P R T P P T P Q V M D F H M M
 GAAAGATCAAGAGCTATTGCATATTGTAATATGAGATGTTCAAGCATTTGTGCAAGCTGT 360
 E R S R A I A Y C N M R C S S I C A S C
 CCCCCACACCCTGGTCAACCGATTTGTACTTTGTGTGAACCGAGAGAGGGAGAAGCTGCG 420
 P P H P G Q P I C T L C E P R E G E A A
 CCATCTCAACACATGTATACATATTCAAGAGAACCATGTACTAGACACCCGTTTTCAATG 480
 P S Q H M Y T Y S R E P C T R H P F S M
 AATCGCGGATCTGCTCGACCTTTAAACCCCTCACCTCATCTTCAAGACTTCAACAGATA 540
 N R G S A R P L N P L T S S S R L Q Q I
 TCCCCAACTTTTGTGCGTGAATTGAAAATCGGAGAATGCGTTCACAACATGAACACGAA 600
 S P T F V R E L E N R R M R S Q H E H E
 CAACAGATGTGCTCTAAATCTAAACGCATACGAACCGCATAACAGATATTAGTTGTTA 660
 Q Q M C S K S K R I R T A Y T S I O L L
 GAACTAGAGAAAGAATTTCAAATAATCGATATCTGTCTAGATTAAGACGTATACAAATC 720
E L E K E F O N N R Y L S R L R R I O I
 GCTGCCATGCTAGACTTAACAGAAAAGCAGGTTAAAATTTGGTTCCAGAACAGGAGAGTA 780
A A M L D L T E K O V K I W F O N R R V
 AAATGGAAGAAAGATAAAAAAGGCTCGCATGGTTATTCCCCGAGCTCACCAATCAATAGC 840
K W K K D K K G S H G Y S P S S P I N S
 CCGGAATCTCCCATGTAAAAATAAACAGGAGAAATTGAAAAATACTCATATATTCAAACA 900
 P E S P M
 TTATTTTCGTTTAAATCAAATAGAAAATTCCTTTCTTGAATACTATATTCTTTATTAACA 960
 ATATGTTAAAATTTTTCTAATCGCTAACAAATGAGATTTGGAATTTTATTTATGCATTTTC 1020
 TGACAAGCTCCAGTTGACATAAAGATAATCTATATTAATCAGAAACCTATTCATAAAAACA 1080
 CTTTGCATGTCAAAAAAAGTGTAACGCGTTTTTAAATTTCAATCGTTAATTTAGTTTAAAGT 1140
 AAAAGTTTAGCACTCATCACTAGTGCCAAACCTTTTTTTTAAAGAGTTATAAAGTTACTCAG 1200
 TTATAATTTATTAATGATCTCCTTTGCAGAGACCTATTCTATTATGTTTCGGTTTGAATT 1260
 TGTAATATAGCACTTGATATAAATTTATTTATTTATTTGCCAATTTATATACATTTTCTAT 1320
 ACAACAATTATAATATTCAAATAAAATTTAAAATATATATTAATCTAAAAA 1371

cDNA Cnox-3

ACAGATAATACACAAACTAATCTTGAGTCACTGTGTATAAGGTTTCATGATATTTAGATA 60
GAAAAATCTTGAATAATTATCAA**AACATAATAAACATCAATTCAAAA**AATTATTTTTTCA 120
CTGATGAATTCATTTAATTTTTGAAGATAATCTTAATAAAGATGCATTGTATAATCGCCAT 180
M N S F N F E D N L N K D A L Y N R H
CCTCATGTTTCAGAATTATTCTTATCTATCAATAAATTGTAAACAACCAAATGATGATGCG 240
P H V Q N Y S Y L S I N C K Q P N D D A
TATGTGTATAATAGACAACGTGTTCCA**AGCTCTCCAGAGATTACCGGTGATACTAGAATG** 300
Y V Y N R Q R V P S S P E I H G D T R M
GAGCAATTGAGTCAACGTTCCATACCAGACATTACAAAGTCGAAGCCATGAAACAGAAGCT 360
E Q L S Q R S Y Q T L Q S R S H E T E A
CCCGATTATTATTTCATATGAGCATATTGATGATGCAAAACAAAACGCTAAACTATCATTAT 420
P D Y Y S Y E H I D D A N K T L N Y H Y
ATGAATAAAAATACTTACGATAATAATACATGGCAAAACAATACACCTCTATCTTGGCAT 480
M N K N T Y D N N T W Q N N T P L S W H
CATAATATAACATCTCAGCCAGCAGCTTGGCATTCAACGCAAACTAATACCACACCCCAA 540
H N I T S Q P A A W H S T Q T N T T P Q
TTGGATCAAGGTTATATGTCTTGGAAATTGTTGCTATGTTGACAGTAAACGGAAAAGAACT 600
L D Q G Y M S W N C C Y V D S K R K R T
TCATATTCGCGTAGACAAATATTTGAACTTGAAAACGAGTTTAATAGAAGTCGTTACATC 660
S Y S R R Q I F E L E N E F N R S R Y I
ACACGTGAAAAAGAATAGAATTATCCATGATATTAACCTTAACGGAGAGACAAGTTAAA 720
T R E K R I E L S M I L N L T E R Q V K
ACATGTTTCAAATCGTAGAATGAAAACAAAGAAAGAAAAGACAATGGATGATACTTCT 780
T W F Q N R R M K T K K E K T M D D T S
AATGACTGTTTCGATTAAGTAAAACCTTAAATATCAATAACACTTCAATGAAAAATTATA 840
N D C S I K S K T
AAGAATGAATGAAAATACGAAAGCTTAACTACTGCATACAAATGTAACGCAATTGTTGT 900
TATAGATCATTTTACGTGAAAGTTTAAGGTAAC TAAAAA 943

cDNA Cnox-4

TACGGAATAGTTGATAAAATTTT**TTTCTCAAATGATTGATACAACAC**TCAACACGATGCT 60
M I D T T L N T M L
GTATTGGGACAACAAATCTTTAGATATTTTTGAAGACAAAAGTGGATTGGGGTTTGAAGT 120
Y W D N K S L D I F E D K S G L G F E V
GAACAAC TATTT CACAAC TAAACATCAATACAACAACCTATCTTATCCAACTTCATCAA 180
N N Y F T T K H Q Y N N L S Y P N F I N
TGATGACAATATAAAGTGTAGCTTAACTCAAACACAAAGTATCTCGAAATCTCCTAAAAG 240
D D N I K C S L T Q T Q S I S K S P K S
TGCAGAGATTACTGTCAATAAATTGCAACACGAACAAGACAACCTAATCCAACAACAAAT 300
A E I T V N K L Q H E Q D N L I Q Q Q I
TCAAGACCGTACAATTTTCATTAACAAATATGAACAACCCCTCAGGAGCAGTTGGCCAAC 360
Q D R T I S L T N M N N P L T S S W P T
TTATAATCCCTTACCAAGAACAACATATTGATGAATGATCCATCAACATCAACATCTTT 420
Y N P L P R T N I L M N D P S T S T S F
TACAAC TACTTCCCTTTCCCATGTATGCTTACTCCGCAAGCGAGCGTGCAATGGTTTAA 480
T T T S L S P C M L T P Q A S V Q W F N
CCGATCCAACATGGTAAATGATCCTTGGGCTATGGAATATGGGCATGATCCTGCCATGCG 540
R S N M V N D P W A M E Y G H D P A M R
AAGCAGACCATGTTTTTTCATCTCATCAGACAAGAGAGCTTGAGAAGGAGTTTTTGGTTTG 600
S R P C F S S H Q T R E L E K E F L V C
TCAATATGTCACTCGCAGGCGACGGATCGAACTTGCATTTTCACTTAATCTATCTGAGAA 660
Q Y V T R R R R I E L A F S L N L S E K

ACAAATAAAAACATGGTTTCAAATCGCAGAGTGAAAGAAAACAAAAGAAATGTTTC 720
Q I K T W F Q N R R V K E R K Q K C S
AAGTGAAAGTGAACGGTCGGCTTCAAAAATATGAAAAGAAAACGTTTCTTGAAGAACAA 780
S E S E R S A S K I
TAGCCTCTTCTGTTTTTCGATAAAAAATGGAGCTAGTTGAGGAGACGTAGATGGAAGGTTG 840
ATATCCGTTGATAGAGACATATGGTATCTGAAAATAAAATTTATCTGTCATCACAAGGAC 900
GTAATTACGAACAAAAAGATTATCCTCGATGAACGCAACCATATGTTGATGAAACCGCAA 960
TGCATATGATATCTTTCACTTCAAAGTGTTTTTCCTTCAAATCAATAAACTTGTTTGAT 1020
CTTTGTTGACAAAACAGTAATCCAATATGTGCTTTAAATTGTTTTTCTTATTTCAATACT 1080
TCCGTTTGTAATTACAAAGAGAGTTTGTAAACTGTTAAAGTGCTTGCTTATAACACGCC 1140
ATATCAAACGCAGAGTAGAAAAAAATTCATATCTTTATCAAAAAAAAAAAAAA 1193

cDNA Cnox-5

TGACAACATAAGAGACTATATA **TAAGTAACATGGCAGAGATTGAAAA**AGATTTTTTTCGAC 60
M A E I E K D F F D
TTAATTAATTCAAATAATGAATCCATCGATGTTGAAAGGAAAAATTTAAATGACAAAGAA 120
L I N S N N E S I D V E R K N L N D K E
ATTAACCCCAATGCATACAGCATGTCGGTACTCTAGTCAACATACATATTCTCATACTTTT 180
I N P M H T A C R Y S S Q H T Y S H T F
GAATATTTCCCAGGAGATTCTCATGTACAGAAAATAAAAAAAGATGATCAAGCTGCACCT 240
E Y F P G D S H V Q K I K K D D Q A A P
ATACAACCTTCTTGCATGAGCAGTTATTTTTAGTAAACCTGGAGAAGTAACTGATGGTTTT 300
I Q L P C M S S Y F S K P G E V T D G F
GAAGATGCGTTTTAAAAAGAGAGATTTCGAAAAGAGATGTTGGAA**CACCGATAACTTCAA** 360
E D A F K K R D S Q K R C W N T D N F K
TGGATAAATATTTAAACGTGAAAACGGGCAGCGGATGTTGAATCTACTCAAGATAATCAA 420
W I N I K R E K R A A D V E S T Q D N Q
AAACAGAGAGAGTTGCACTCGAAGGATATTTGTAAAAAACGTGTATGTTTCACACAAAAA 480
K Q R E L H S K D I C K K R V C F T Q K
CAGATCGTCGAACTTGAAAAAGAATTTCAATTACAATCGATATCTTACACGTGCTCGGAGA 540
Q I V E L E K E F H Y N R Y L T R A R R
GTAGAGATCGCACAAATTGTTAAAACTTACTGAAGCTCAAATAAAAAATATGGTTTCAAAT 600
V E I A O L L K L T E A O I K I W F Q N
CGTCGCATGAAGCAAAAACGAGAACAAAAAGATATGGCAACACCGCATTTTCTTGATAAT 660
R R M K Q K R E Q K D M A T P H F L D N
CAACTCAATCAGTGCAGTTGACTACACGACTTCTGCCCAGTTAACTTCCCAACTTCA 720
Q L N Q C A V D Y T T S C P V N F P T S
TGTCCAGTCGAATTCACAAACAATAGAGCATGGTACAATGCTTGTAATCAAGGAGATTCA 780
C P V E F T N N R A W Y N A C N Q G D S
TCTCATTTTCAATCAATCACTTTTCAATTGATCTAATTGAATCGGTATTTACAGGTCAATG 840
S H F Q S I T F H
ATTTGTTTGTAATGTGATAGAATATTTCTCCAAAACCTCGAATTATCTGATATATTATTT 900
AAACCATAGTCTATGAGAAATAAGAAAATGAATAAACAACTGCAGCTCCTTTGAATATC 960
TATTTATTTAAAAATAGAAGAAAACCTGAAAATAATAGACTTTTAATTGTAAATATATTAG 1020
TTTATGAATCTTCGCTTTATTTGAAATATATTATTTATCTTTAAAAAAA 1070

TGTTCGAAACATTCAACACCCCAGCTATGTATGTCAACATCCAAGCTGTACTATCCTTGT 600
 F E T F N T P A M Y V N I Q A V L S L Y
 ATGCTTCTGGCCGTACTIONACTGGTATCGTTCTCGATTCTGGCGATGGTGTAAAGCCATACCG 660
 A S G R T T G I V L D S G D G V S H T V
 TTCCAATCTACGAAGGTTACGCTTTGCCTCATGCTATGATGCGTTTGGACTTGGCTGGCC 720
 P I Y E G Y A L P H A M R L D L A G R
 GTGACTTAAGTACTACATGATGAAAATCTTGACTGAACGTGGCTATACTTTCACTACTA 780
 D L T D Y M M K I L T E R G Y T F T T T
 CCGCTGAACGTGAAATCGTTCGTGATATCAAGGAAAAATTAGCCTATGTTGCTTTAGACT 840
 A E R E I V R D I K E K L A Y V A L D F
 TTGAGCAAGAAATGCAAACCGCTGCTTCTAGTTCAAGCCTTGAAAAGAGCTACGAATTAC 900
 E Q E M Q T A A S S S L E K S Y E L P
 CTGACGGTCAAGTCATCACCATTGGTAATGAACGATTCGCTGCCCAGAAGCTCTCTTCC 960
 D G Q V I T I G N E R F R C P E A L F Q
 AACCCGCTTCTTAGGTATGGAATCCGCTGGTATCCACGAAACTACCTACAACCTGTAA 1020
 P A F L G M E S A G I H E T T Y N S V M
 TGAAATGCGACGTCGATATTCGAAAAGACTTATACAGTAATATTGTCTTGTCTGGCGGTA 1080
 K C D V D I R K D L Y S N I V L S G G T
 CTACTIONTTCCTGGTATTGCTGACCGTATGCAAAGGAAATTGTTAGCTTGGCACCTC 1140
 T M F P G I A D R M Q K E I V S L A P P
 CACTIONTGAATAAAGATCGTTGCTCCACCAGAAAGAAATACTIONTGTATGGATCGGAG 1200
 T M K I K I V A P P E R K Y S V W I G G
 GATCTATTTTGGCTAGTTTATCCACCTTCCAACAGATGTGGATCTCCAACAAGAATACG 1260
 S I L A S L S T F Q Q M W I S K Q E Y D
 ATGAATCTGGCCCCGCTATCGTTCACCGTAAATGCTTCTAAGTTCGTGTTAAGTTTAATT 1320
 E S G P A I V H R K C F
 TATACAATATCCAAAAATCAATAACTIONTATAGCAATATCAAAAAACTIONTGTATAATAAACTIONT 1380
 TTAAATCCAAAAAAGAAAAAAGAAAAAAGAAAAAAGAAAAAAGAAAAAAGAAAAAAGAAAAAAG 1439
 CAGTCATGCCGTTACGTAGCGTATCGTTGACAGC

5.2 SEQUENZEN DER MORPHOLINO-ANTISENSE-OLIGONUKLEOTIDE

Cnox-1-25-Morpho: AAATAATTGCTGAAAGTAAACTACC

Cnox-2-25-Morpho: GTTGCTGACGTAATAATAGTTTCTG

Cnox-3-25-Morpho: TTTTTGAATTGATGTTTATTATGTT

Cnox-4-25-Morpho: GTGTTGTATCAATCATTTTGAGAAA

Cnox-5-25-Morpho: TTTTCAATCTCTGCCATGTTACTTA

Trox-2-25-Morpho: GCATTGGTTGGATTACCTGGACCGA

Con-25-Morpho: CCTCCTGACCTCAGTTACAATTTATA (Kontroll-Oligonukleotid)

5.3 SEQUENZEN DER ANTISENSE-OLIGODESOXYRIBONUKLEOTIDE

Trox-2-14-Antisense: GAAGGCTGGTAATG

Con-14-Sense: CTACTCACTTAGCG (Kontroll-Oligodesoxyribonukleotid)

5.4 SEQUENZEN DER GENSPEZIFISCHEN *PRIMER*

Cnox-1-forward: TTCGATCTGCTTTTCTCCCAAC

Cnox-1-reverse: GGAACTCGATCCTGCAAATCC

Cnox-2-forward: CGTCAAGGGAATCTTCTCCA

Cnox-2-reverse: GTGAACGCATTCTCCGATTT

Cnox-3-forward: AGCTCTCCAGAGATTCACGG

Cnox-3-reverse: AAGCTGCTGGCTGAGATGTT

Cnox-4-forward: ATATGAACAACCCCTCACG

Cnox-4-reverse: CATGCCCATATTCCATAGCC

Cnox-5-forward: CCCAATGCATACAGCATGTC

Cnox-5-reverse: TTCCAACATCTCTTTTGCGA

Eleutheria-Aktin-forward: GGTATYGCTGAYCGTATGCA

Eleutheria-Aktin-reverse: GAGATCCACATYTGTTGGAA

Trox-2-forward1: TGTCAAGTCTGTATACCCAA

Trox-2-forward2: ATCATCACCAATCATTACCAGC

Trox-2-reverse: GGTTCCAGAATCGTCGCGTA

Trichoplax-Aktin-forward: GTGCGAACTTCCCTTGACCGTTACA (Yale)

Trichoplax-Aktin-reverse1: ATACGCTACGTAACGGCATGACTG

Trichoplax-Aktin-reverse2: GACGATTGAAGGGAAAACAGCACGAG (Yale)

Trichoplax-Aktin-reverse3: TGATTTGAGTCATTTTTTTCACGGT

Trichoplax-Aktin-reverse4: ATAGCTGGGGTGTGTAATGTTTCGA

GeneRacer™ dT Oligo: GCTGTCAACGATACGCTACGTAACGGCATGACAGTG(T)₁₈

GeneRacer™ 3'-*Primer*: GCTGTCAACGATACGCTACGTAACG

5.5 ERGEBNISSE DER INHIBITIONSSTUDIEN

In den Tabellen Tab. 5.10 bis Tab. 5.12 sind die Einzelergebnisse der Inhibitionsstudien an *Trichoplax adhaerens* aufgeführt. Die Tabellen Tab. 5.13 bis Tab. 5.26 zeigen sowohl die quantitativen als auch die qualitativen, phänotypischen Veränderungen der *Eleutheria*-Medusen im zeitlichen Verlauf der Experimente. Abkürzungen wurden wie folgt verwendet: Kv (Körper verschmolzen), Kd (Aboral-Oral-Achse deformiert), dT2h1w (doppelter-Tentakel, 2 Haftäste und 1 Wehrast), dT1h2w (doppelter-Tentakel, 1 Haftast und 2 Wehräste), dT2h2w (doppelter-Tentakel, 2 Haft- und 2 Wehräste), ZT (Zwerg-Tentakel), MT (Mehrfach-Tentakel), dM (doppeltes Manubrium), kM (kein Manubrium), Med (Medusen), PAMs (phänotypisch abnormale Medusen).

Tab. 5.10											
<i>Trox-2</i>-RNAi-Studie (Vermehrungsrate der Tiere)											
1. Versuchsreihe	Beginn	1. Tag	2. Tag	3. Tag	4. Tag	5. Tag	6. Tag	7. Tag	8. Tag	9. Tag	10. Tag
<i>Trox-2</i> -RNAi:	10	10	11	11	11	11	11	10	11	12	12
H ₂ O-Kontrolle:	10	10	11	12	12	12	14	15	16	17	19
dsRNA-Kontrolle:	10	11	11	11	12	12	13	15	16	18	20
	11. Tag	12. Tag	13. Tag	14. Tag	15. Tag	16. Tag	17. Tag	18. Tag	19. Tag	20. Tag	21. Tag
<i>Trox-2</i> -RNAi:	12	12	12	13	13	13	13	13	13	13	14
H ₂ O-Kontrolle:	22	22	25	31	39	45	51	62	67	73	83
dsRNA-Kontrolle:	23	28	34	42	49	57	66	76	85	92	98
2. Versuchsreihe	Beginn	1. Tag	2. Tag	3. Tag	4. Tag	5. Tag	6. Tag	7. Tag	8. Tag	9. Tag	10. Tag
<i>Trox-2</i> -RNAi:	10	10	11	12	12	12	12	13	13	13	14
H ₂ O-Kontrolle:	10	10	11	12	12	13	14	15	16	18	20
dsRNA-Kontrolle:	10	11	11	11	12	13	14	15	17	18	20
	11. Tag	12. Tag	13. Tag	14. Tag	15. Tag	16. Tag	17. Tag	18. Tag	19. Tag	20. Tag	21. Tag
<i>Trox-2</i> -RNAi:	14	14	15	14	15	15	15	16	16	16	16
H ₂ O-Kontrolle:	24	29	36	42	48	54	62	70	77	83	88
dsRNA-Kontrolle:	21	27	33	38	45	56	64	70	81	88	92
3. Versuchsreihe	Beginn	1. Tag	2. Tag	3. Tag	4. Tag	5. Tag	6. Tag	7. Tag	8. Tag	9. Tag	10. Tag
<i>Trox-2</i> -RNAi:	10	10	11	12	12	13	13	13	13	13	14
H ₂ O-Kontrolle:	10	10	11	12	12	13	14	15	16	17	22
dsRNA-Kontrolle:	10	10	10	11	11	11	12	14	15	16	20
	11. Tag	12. Tag	13. Tag	14. Tag	15. Tag	16. Tag	17. Tag	18. Tag	19. Tag	20. Tag	21. Tag
<i>Trox-2</i> -RNAi:	14	14	14	14	15	15	15	15	15	16	16
H ₂ O-Kontrolle:	24	27	29	31	39	44	57	60	66	78	87
dsRNA-Kontrolle:	23	26	31	41	49	53	64	77	87	93	96
4. Versuchsreihe	Beginn	1. Tag	2. Tag	3. Tag	4. Tag	5. Tag	6. Tag	7. Tag	8. Tag	9. Tag	10. Tag
<i>Trox-2</i> -RNAi:	10	10	10	11	11	11	11	11	11	12	12
H ₂ O-Kontrolle:	10	10	11	11	12	12	13	14	16	19	20
dsRNA-Kontrolle:	10	10	12	12	14	14	14	17	18	19	21
	11. Tag	12. Tag	13. Tag	14. Tag	15. Tag	16. Tag	17. Tag	18. Tag	19. Tag	20. Tag	21. Tag
<i>Trox-2</i> -RNAi:	12	12	13	13	13	13	13	13	14	14	14
H ₂ O-Kontrolle:	25	30	37	43	50	61	68	71	84	91	97
dsRNA-Kontrolle:	22	22	25	32	39	45	56	63	70	76	89

Tab. 5.11											
<i>Trox-2-Morpholino-Studie (Vermehrungsrate der Tiere)</i>											
1. Versuchsreihe	Beginn	1. Tag	2. Tag	3. Tag	4. Tag	5. Tag	6. Tag	7. Tag	8. Tag	9. Tag	10. Tag
<i>Trox-2</i> -Antisense:	10	10	11	11	11	12	12	11	11	10	11
H ₂ O-Kontrolle:	10	10	12	13	14	16	17	19	23	24	25
Sense-Kontrolle:	10	10	11	12	14	15	18	20	21	28	29
	11. Tag	12. Tag	13. Tag	14. Tag	15. Tag	16. Tag	17. Tag	18. Tag	19. Tag	20. Tag	21. Tag
<i>Trox-2</i> -Antisense:	12	12	9	10	11	11	11	12	12	14	14
H ₂ O-Kontrolle:	30	35	39	44	50	52	58	62	74	79	85
Sense-Kontrolle:	33	38	44	49	52	55	63	66	68	75	87
2. Versuchsreihe	Beginn	1. Tag	2. Tag	3. Tag	4. Tag	5. Tag	6. Tag	7. Tag	8. Tag	9. Tag	10. Tag
<i>Trox-2</i> -Antisense:	10	10	10	11	11	12	11	12	12	13	12
H ₂ O-Kontrolle:	10	11	13	15	16	18	22	24	27	33	36
Sense-Kontrolle:	10	11	12	14	16	16	18	22	23	27	34
	11. Tag	12. Tag	13. Tag	14. Tag	15. Tag	16. Tag	17. Tag	18. Tag	19. Tag	20. Tag	21. Tag
<i>Trox-2</i> -Antisense:	12	12	11	11	10	10	10	11	10	9	9
H ₂ O-Kontrolle:	38	43	56	57	61	63	68	69	76	79	84
Sense-Kontrolle:	35	39	45	51	52	51	59	64	67	69	72
3. Versuchsreihe	Beginn	1. Tag	2. Tag	3. Tag	4. Tag	5. Tag	6. Tag	7. Tag	8. Tag	9. Tag	10. Tag
<i>Trox-2</i> -Antisense:	10	10	10	11	11	12	14	16	16	17	17
H ₂ O-Kontrolle:	10	11	12	13	13	14	14	17	16	17	17
Sense-Kontrolle:	10	12	13	14	16	17	21	22	24	26	32
	11. Tag	12. Tag	13. Tag	14. Tag	15. Tag	16. Tag	17. Tag	18. Tag	19. Tag	20. Tag	21. Tag
<i>Trox-2</i> -Antisense:	17	18	19	19	19	20	20	20	20	21	21
H ₂ O-Kontrolle:	18	20	21	23	28	34	39	46	57	64	78
Sense-Kontrolle:	34	35	39	43	47	53	59	67	75	85	90
4. Versuchsreihe	Beginn	1. Tag	2. Tag	3. Tag	4. Tag	5. Tag	6. Tag	7. Tag	8. Tag	9. Tag	10. Tag
<i>Trox-2</i> -Antisense:	10	10	11	13	13	13	14	14	15	16	17
H ₂ O-Kontrolle:	10	12	13	15	17	17	18	22	24	28	32
Sense-Kontrolle:	10	12	12	14	16	21	25	29	32	33	36
	11. Tag	12. Tag	13. Tag	14. Tag	15. Tag	16. Tag	17. Tag	18. Tag	19. Tag	20. Tag	21. Tag
<i>Trox-2</i> -Antisense:	18	19	19	19	21	21	20	21	22	22	22
H ₂ O-Kontrolle:	39	45	49	57	63	69	77	79	84	89	90
Sense-Kontrolle:	43	45	55	61	70	78	84	90	92	96	99
5. Versuchsreihe	Beginn	1. Tag	2. Tag	3. Tag	4. Tag	5. Tag	6. Tag	7. Tag	8. Tag	9. Tag	10. Tag
<i>Trox-2</i> -Antisense:	10	11	11	11	13	13	13	13	12	12	12
H ₂ O-Kontrolle:	10	11	13	13	13	17	19	22	27	29	33
Sense-Kontrolle:	10	11	12	14	16	18	21	25	31	35	38
	11. Tag	12. Tag	13. Tag	14. Tag	15. Tag	16. Tag	17. Tag	18. Tag	19. Tag	20. Tag	21. Tag
<i>Trox-2</i> -Antisense:	13	14	14	14	14	15	15	15	15	16	16
H ₂ O-Kontrolle:	37	40	41	48	49	53	59	66	67	71	76
Sense-Kontrolle:	44	50	55	57	60	61	64	73	78	85	91
6. Versuchsreihe	Beginn	1. Tag	2. Tag	3. Tag	4. Tag	5. Tag	6. Tag	7. Tag	8. Tag	9. Tag	10. Tag
<i>Trox-2</i> -Antisense:	10	10	10	9	9	10	10	11	11	12	12
H ₂ O-Kontrolle:	10	10	11	15	16	19	22	27	30	32	37
Sense-Kontrolle:	10	10	10	11	11	12	13	14	15	17	21
	11. Tag	12. Tag	13. Tag	14. Tag	15. Tag	16. Tag	17. Tag	18. Tag	19. Tag	20. Tag	21. Tag
<i>Trox-2</i> -Antisense:	13	14	14	14	14	14	14	14	15	15	16
H ₂ O-Kontrolle:	42	45	50	56	60	66	72	78	81	88	92
Sense-Kontrolle:	25	33	39	47	53	61	69	77	85	90	98

Tab. 5.12											
<i>Trox-2</i>-Antisense-DNA-Studie (Vermehrungsrate der Tiere)											
1. Versuchsreihe	Beginn	1. Tag	2. Tag	3. Tag	4. Tag	5. Tag	6. Tag	7. Tag	8. Tag	9. Tag	10. Tag
<i>Trox-2</i> -Antisense:	10	10	11	13	14	15	17	19	22	27	32
H ₂ O-Kontrolle:	10	11	11	12	14	15	17	18	21	22	25
Sense-Kontrolle:	10	11	12	15	15	17	19	19	24	25	28
	11. Tag	12. Tag	13. Tag	14. Tag	15. Tag	16. Tag	17. Tag	18. Tag	19. Tag	20. Tag	21. Tag
<i>Trox-2</i> -Antisense:	36	42	45	47	53	54	56	57	61	64	66
H ₂ O-Kontrolle:	27	33	35	38	43	44	46	47	50	53	54
Sense-Kontrolle:	30	31	34	37	39	42	43	44	48	53	57
2. Versuchsreihe	Beginn	1. Tag	2. Tag	3. Tag	4. Tag	5. Tag	6. Tag	7. Tag	8. Tag	9. Tag	10. Tag
<i>Trox-2</i> -Antisense:	10	11	11	12	12	13	14	14	16	16	16
H ₂ O-Kontrolle:	10	10	12	13	14	15	17	18	19	19	20
Sense-Kontrolle:	10	10	12	12	12	14	15	15	15	17	18
	11. Tag	12. Tag	13. Tag	14. Tag	15. Tag	16. Tag	17. Tag	18. Tag	19. Tag	20. Tag	21. Tag
<i>Trox-2</i> -Antisense:	17	18	19	23	24	25	27	29	30	32	33
H ₂ O-Kontrolle:	22	22	24	23	24	25	25	26	26	27	27
Sense-Kontrolle:	19	19	19	21	21	23	23	25	25	25	25
3. Versuchsreihe	Beginn	1. Tag	2. Tag	3. Tag	4. Tag	5. Tag	6. Tag	7. Tag	8. Tag	9. Tag	10. Tag
<i>Trox-2</i> -Antisense:	10	10	10	11	11	12	13	14	14	15	17
H ₂ O-Kontrolle:	10	11	12	15	18	20	21	21	24	25	27
Sense-Kontrolle:	10	10	12	14	15	15	17	18	18	19	25
	11. Tag	12. Tag	13. Tag	14. Tag	15. Tag	16. Tag	17. Tag	18. Tag	19. Tag	20. Tag	21. Tag
<i>Trox-2</i> -Antisense:	18	19	21	22	22	23	24	26	28	31	32
H ₂ O-Kontrolle:	29	32	33	34	34	37	42	44	47	50	53
Sense-Kontrolle:	27	27	28	34	35	37	40	42	44	45	47
4. Versuchsreihe	Beginn	1. Tag	2. Tag	3. Tag	4. Tag	5. Tag	6. Tag	7. Tag	8. Tag	9. Tag	10. Tag
<i>Trox-2</i> -Antisense:	10	10	11	13	14	14	14	15	15	15	15
H ₂ O-Kontrolle:	10	11	11	12	14	15	17	18	21	22	25
Sense-Kontrolle:	10	11	12	15	15	17	19	19	24	25	28
	11. Tag	12. Tag	13. Tag	14. Tag	15. Tag	16. Tag	17. Tag	18. Tag	19. Tag	20. Tag	21. Tag
<i>Trox-2</i> -Antisense:	16	16	16	16	16	15	15	16	17	17	17
H ₂ O-Kontrolle:	27	33	34	38	39	41	46	47	48	50	53
Sense-Kontrolle:	30	31	34	37	37	38	41	44	45	46	49
5. Versuchsreihe	Beginn	1. Tag	2. Tag	3. Tag	4. Tag	5. Tag	6. Tag	7. Tag	8. Tag	9. Tag	10. Tag
<i>Trox-2</i> -Antisense:	10	10	10	11	11	11	11	12	12	12	12
H ₂ O-Kontrolle:	10	11	11	12	12	13	15	17	19	21	24
Sense-Kontrolle:	10	10	11	12	13	14	16	17	20	22	23
	11. Tag	12. Tag	13. Tag	14. Tag	15. Tag	16. Tag	17. Tag	18. Tag	19. Tag	20. Tag	21. Tag
<i>Trox-2</i> -Antisense:	12	14	14	14	14	15	15	16	16	16	16
H ₂ O-Kontrolle:	27	29	33	35	36	39	43	47	48	52	55
Sense-Kontrolle:	25	26	34	35	36	36	38	39	42	47	51
6. Versuchsreihe	Beginn	1. Tag	2. Tag	3. Tag	4. Tag	5. Tag	6. Tag	7. Tag	8. Tag	9. Tag	10. Tag
<i>Trox-2</i> -Antisense:	10	10	7	4	4	2	1	1	1	1	0
H ₂ O-Kontrolle:	10	11	15	18	20	23	25	26	28	30	34
Sense-Kontrolle:	10	11	14	16	18	20	23	24	27	29	33
7. Versuchsreihe	Beginn	1. Tag	2. Tag	3. Tag	4. Tag	5. Tag	6. Tag	7. Tag	8. Tag	9. Tag	10. Tag
<i>Trox-2</i> -Antisense:	10	8	7	6	6	2	0	0	0	0	0
H ₂ O-Kontrolle:	10	11	14	17	19	22	25	28	30	34	40
Sense-Kontrolle:	10	11	14	15	16	18	22	25	27	32	36
8. Versuchsreihe	Beginn	1. Tag	2. Tag	3. Tag	4. Tag	5. Tag	6. Tag	7. Tag	8. Tag	9. Tag	10. Tag
<i>Trox-2</i> -Antisense:	10	7	5	5	3	2	1	1	1	0	0
H ₂ O-Kontrolle:	10	11	15	17	18	21	24	28	33	37	40
Sense-Kontrolle:	10	11	12	14	15	18	21	24	29	34	39

Tab. 5.13 Cnox-1-RNAi-Studie (GESAMT)									
	1. Woche	2. Woche	3. Woche	4. Woche	5. Woche	6. Woche	7. Woche	8. Woche	9. Woche
dT2h1w:	0	0	1	3	5	7	10	12	13
dT1h2w:	0	0	2	2	2	3	3	4	6
dT2h2w:	0	0	0	0	0	0	0	1	1
ZT:	0	0	2	2	2	3	4	6	10
MT:	0	0	0	0	0	0	1	1	2
Kv:	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Kd:	0	0	0	0	0	0	0	1	2
dM:	0	0	0	0	0	0	1	2	2
kM:	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Normal:	30	33	34	37	38	38	38	38	36
Med.-gesamt/PAMs:	30/0	33/0	39/5	44/7	47/9	51/13	57/19	65/27	72/36
%-PAMs:	0	0	12,8	15,9	19,2	25,5	33,3	41,5	50,0
	10. Woche	11. Woche	12. Woche	13. Woche	14. Woche	15. Woche	16. Woche	17. Woche	18. Woche
dT2h1w:	13	13	14	15	18	21	24	26	28
dT1h2w:	7	7	8	9	10	11	11	12	12
dT2h2w:	2	3	5	6	6	6	7	7	7
ZT:	10	11	11	13	15	15	15	16	21
MT:	2	2	4	4	4	4	7	8	8
Kv:	0	0	0	0	1	1	1	1	1
Kd:	3	3	4	4	4	5	6	6	6
dM:	3	4	4	4	4	4	4	4	4
kM:	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Normal:	35	34	32	31	32	34	34	35	35
Med.-Gesamt/PAMs:	75/40	77/43	82/50	86/55	94/62	101/67	109/75	115/80	122/87
%-PAMs:	53,3	55,8	61,0	64,0	65,0	66,3	68,8	69,6	71,3

Tab. 5.14 Cnox-1-Morpholino-Studie (GESAMT)									
	1. Woche	2. Woche	3. Woche	4. Woche	5. Woche	6. Woche	7. Woche	8. Woche	9. Woche
dT2h1w:	0	0	1	2	3	6	8	9	9
dT1h2w:	0	0	0	1	1	1	2	2	2
dT2h2w:	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ZT:	0	0	0	1	1	3	3	5	9
MT:	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Kv:	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Kd:	0	0	0	0	0	0	0	1	3
dM:	0	0	0	0	0	0	1	1	2
kM:	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Normal:	30	34	37	40	41	42	44	47	45
Med.-gesamt /PAMs:	30/0	33/0	38/1	44/4	46/5	52/10	58/14	65/18	70/25
%-PAMs:	0	0	2,6	9,1	10,9	19,2	24,1	27,7	35,7
	10. Woche	11. Woche	12. Woche	13. Woche	14. Woche	15. Woche	16. Woche	17. Woche	18. Woche
dT2h1w:	10	11	13	13	15	17	19	20	24
dT1h2w:	4	5	5	6	7	7	7	8	8
dT2h2w:	1	2	4	5	5	5	5	6	6
ZT:	9	10	10	12	14	15	17	17	22
MT:	1	1	3	3	3	3	7	9	11
Kv:	0	0	0	2	2	2	2	2	2
Kd:	3	3	3	3	4	4	4	6	8
dM:	2	2	2	2	2	2	2	3	3
kM:	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Normal:	47	46	46	47	41	41	41	44	43
Med.-Gesamt/PAMs:	77/30	80/34	86/40	93/46	93/52	96/55	104/63	115/71	127/84
%-PAMs:	39,0	42,5	46,5	49,5	55,9	57,3	60,6	61,7	66,1

Tab. 5.15									
<i>Cnox-2</i>-RNAi-Studie (GESAMT)									
	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.
	Woche	Woche	Woche	Woche	Woche	Woche	Woche	Woche	Woche
dT2h1w:	0	1	1	2	3	4	4	4	8
dT1h2w:	0	0	0	0	0	0	0	2	3
dT2h2w:	0	0	0	0	1	1	1	2	3
ZT:	0	0	1	2	2	2	2	2	3
MT:	0	0	0	1	2	3	3	4	4
Kv:	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Kd:	0	0	1	1	2	4	4	6	7
dM:	0	0	1	1	1	1	1	1	1
kM:	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Normal:	30	34	36	39	42	42	42	42	44
Med.-gesamt/PAMs:	30/0	35/1	40/4	46/7	53/11	57/15	57/15	63/21	73/29
%-PAMs:	0	2,9	10,0	15,2	20,8	26,3	26,3	33,3	39,7
	10.	11.	12.	13.	14.	15.	16.	17.	18.
	Woche	Woche	Woche	Woche	Woche	Woche	Woche	Woche	Woche
dT2h1w:	8	8	8	9	9	9	11	14	15
dT1h2w:	3	3	3	3	3	4	4	4	5
dT2h2w:	3	4	5	5	5	5	5	5	5
ZT:	4	4	5	6	7	8	8	9	10
MT:	4	5	8	8	9	10	11	12	13
Kv:	0	0	1	3	4	4	5	6	6
Kd:	7	7	9	13	14	14	16	17	22
dM:	1	2	2	2	3	4	4	5	6
kM:	0	0	0	0	0	1	1	1	1
Normal:	43	43	41	41	40	41	45	46	42
Med.-Gesamt/PAMs:	73/30	76/33	82/41	90/49	94/54	100/59	110/65	119/73	125/83
%-PAMs:	41,1	43,4	50,0	54,4	57,4	59,0	59,1	61,3	66,4

Tab. 5.16									
<i>Cnox-2</i>-Morpholino-Studie (GESAMT)									
	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.
	Woche	Woche	Woche	Woche	Woche	Woche	Woche	Woche	Woche
dT2h1w:	0	0	1	2	3	4	5	6	6
dT1h2w:	0	0	0	0	0	0	0	2	2
dT2h2w:	0	0	0	0	0	0	0	1	1
ZT:	0	0	0	0	1	1	2	2	2
MT:	0	0	1	1	1	2	2	2	4
Kv:	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Kd:	0	1	1	1	3	4	4	5	7
dM:	0	0	0	0	1	1	1	1	1
kM:	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Normal:	30	34	36	41	42	41	42	40	40
Med.-gesamt/PAMs:	30/0	35/1	39/3	45/4	51/9	53/12	56/14	59/19	63/23
%-PAMs:	0	2,9	7,7	8,9	17,6	22,6	25,0	32,2	36,5
	10.	11.	12.	13.	14.	15.	16.	17.	18.
	Woche	Woche	Woche	Woche	Woche	Woche	Woche	Woche	Woche
dT2h1w:	7	7	7	8	8	8	9	10	11
dT1h2w:	2	2	2	2	2	2	3	3	4
dT2h2w:	2	3	3	3	3	3	3	3	3
ZT:	2	3	4	4	4	5	6	6	6
MT:	4	5	5	5	6	6	6	6	6
Kv:	0	0	1	1	1	2	2	2	2
Kd:	7	8	8	11	13	13	13	15	21
dM:	1	2	2	2	2	3	3	4	7
kM:	0	0	0	0	0	1	1	1	1
Normal:	44	47	49	49	47	48	44	44	45
Med.-Gesamt/PAMs:	69/25	77/30	81/32	85/36	86/39	91/43	90/46	94/50	106/61
%-PAMs:	36,2	39,0	39,5	42,4	45,3	47,3	51,1	53,2	57,5

Tab. 5.17 <i>Cnox-3-RNAi-Studie (GESAMT)</i>									
	1. Woche	2. Woche	3. Woche	4. Woche	5. Woche	6. Woche	7. Woche	8. Woche	9. Woche
dT2h1w:	0	0	0	0	0	0	0	1	1
dT1h2w:	0	0	0	0	0	0	0	0	0
dT2h2w:	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ZT:	0	0	0	0	1	1	2	2	2
MT:	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Kv:	0	0	0	0	0	0	0	1	1
Kd:	0	0	1	1	1	2	2	2	3
dM:	0	0	0	0	2	3	4	5	7
kM:	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Normal:	30	33	37	46	50	50	50	54	51
Med.-gesamt/PAMs:	30/0	33/0	38/1	47/1	54/4	56/6	58/8	65/11	65/14
%-PAMs:	0	0	2,6	2,1	7,4	10,7	13,8	16,9	21,5
	10. Woche	11. Woche	12. Woche	13. Woche	14. Woche	15. Woche	16. Woche	17. Woche	18. Woche
dT2h1w:	1	1	1	1	1	1	2	2	2
dT1h2w:	0	0	0	0	0	0	0	0	0
dT2h2w:	0	0	0	1	2	2	2	2	2
ZT:	2	3	3	5	5	5	5	5	6
MT:	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Kv:	2	2	2	3	4	5	5	5	7
Kd:	5	6	7	7	10	12	14	15	17
dM:	9	11	13	17	20	22	26	27	30
kM:	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Normal:	56	56	56	55	57	59	58	60	62
Med.-Gesamt/PAMs:	75/19	79/23	82/26	89/34	99/42	106/47	112/54	116/56	126/64
%-PAMs:	25,3	29,1	31,7	38,2	42,4	44,3	48,2	48,3	50,8

Tab. 5.18 <i>Cnox-3-Morpholino-Studie (GESAMT)</i>									
	1. Woche	2. Woche	3. Woche	4. Woche	5. Woche	6. Woche	7. Woche	8. Woche	9. Woche
dT2h1w:	0	0	0	0	0	0	0	0	1
dT1h2w:	0	0	0	0	0	0	0	0	0
dT2h2w:	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ZT:	0	0	0	0	1	1	1	1	2
MT:	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Kv:	0	0	0	1	1	1	1	2	3
Kd:	0	0	1	1	1	2	3	3	5
dM:	0	0	0	1	1	3	4	4	4
kM:	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Normal:	30	33	37	45	48	48	49	53	53
Med.-gesamt/PAMs:	30/0	33/0	38/1	48/3	52/4	55/7	58/9	63/10	68/15
%-PAMs:	0	0	2,6	6,3	7,7	12,7	15,5	15,9	22,1
	10. Woche	11. Woche	12. Woche	13. Woche	14. Woche	15. Woche	16. Woche	17. Woche	18. Woche
dT2h1w:	1	2	2	3	3	3	3	3	3
dT1h2w:	0	0	0	0	0	0	0	0	0
dT2h2w:	0	1	1	1	1	1	1	1	1
ZT:	2	3	3	3	3	3	3	3	3
MT:	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Kv:	3	3	3	4	5	5	5	6	6
Kd:	6	7	7	8	8	9	12	13	17
dM:	6	7	8	9	9	11	13	13	16
kM:	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Normal:	55	56	57	54	59	59	60	62	62
Med.-Gesamt/PAMs:	73/18	79/23	81/24	82/28	88/29	91/32	97/37	101/39	108/46
%-PAMs:	24,7	29,1	29,6	34,1	33,0	35,2	38,1	38,6	42,6

Tab. 5.19 Cnox-4-RNAi-Studie (GESAMT)									
	1. Woche	2. Woche	3. Woche	4. Woche	5. Woche	6. Woche	7. Woche	8. Woche	9. Woche
dT2h1w:	0	0	0	0	0	0	0	0	0
dT1h2w:	0	0	0	0	0	0	0	0	0
dT2h2w:	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ZT:	0	0	0	0	2	2	2	2	2
MT:	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Kv:	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Kd:	0	0	1	1	1	1	1	1	1
dM:	0	0	0	0	0	0	0	0	0
kM:	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Normal:	30	31	34	38	41	46	51	58	66
Med.-gesamt/PAMs:	30/0	31/0	35/1	39/1	44/3	49/3	54/3	61/3	69/3
%-PAMs:	0	0	2,9	2,6	6,8	6,1	5,6	4,9	4,3
	10. Woche	11. Woche	12. Woche	13. Woche	14. Woche	15. Woche	16. Woche	17. Woche	18. Woche
dT2h1w:	0	0	0	0	1	1	1	1	1
dT1h2w:	0	0	0	0	0	0	0	0	0
dT2h2w:	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ZT:	3	3	3	4	4	4	5	5	6
MT:	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Kv:	0	0	0	0	0	1	1	1	1
Kd:	1	2	2	2	2	2	2	2	2
dM:	0	0	0	0	0	0	0	0	0
kM:	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Normal:	72	77	86	95	100	108	118	125	134
Med.-Gesamt/PAMs:	76/4	82/5	91/5	101/6	107/7	116/8	127/9	134/9	144/10
%-PAMs:	5,3	6,1	5,5	5,9	6,5	6,9	7,1	6,7	6,9

Tab. 5.20 Cnox-4-Morpholino-Studie (GESAMT)									
	1. Woche	2. Woche	3. Woche	4. Woche	5. Woche	6. Woche	7. Woche	8. Woche	9. Woche
dT2h1w:	0	0	0	0	0	0	0	0	0
dT1h2w:	0	0	0	0	0	0	0	0	0
dT2h2w:	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ZT:	0	0	0	0	0	0	0	0	0
MT:	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Kv:	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Kd:	0	0	0	0	0	0	0	0	0
dM:	0	0	0	0	0	0	0	0	0
kM:	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Normal:	30	33	36	42	46	52	58	63	69
Med.-gesamt/PAMs:	30/0	33/0	36/0	42/0	46/0	52/0	58/0	63/0	69/0
%-PAMs:	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	10. Woche	11. Woche	12. Woche	13. Woche	14. Woche	15. Woche	16. Woche	17. Woche	18. Woche
dT2h1w:	0	0	0	0	0	0	0	0	0
dT1h2w:	0	0	0	0	0	0	0	0	0
dT2h2w:	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ZT:	0	0	0	0	0	0	0	2	3
MT:	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Kv:	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Kd:	0	1	1	1	2	2	2	2	2
dM:	0	0	0	0	0	0	0	0	0
kM:	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Normal:	76	82	87	91	101	108	115	121	129
Med.-Gesamt/PAMs:	76/0	83/1	88/1	92/1	103/2	110/2	117/2	125/4	135/6
%-PAMs:	0	1,2	1,1	1,1	1,9	1,8	1,7	3,2	4,4

Tab. 5.21 Cnox-5-RNAi-Studie (GESAMT)									
	1. Woche	2. Woche	3. Woche	4. Woche	5. Woche	6. Woche	7. Woche	8. Woche	9. Woche
dT2h1w:	0	0	0	0	1	1	1	1	1
dT1h2w:	0	0	0	0	0	0	0	0	0
dT2h2w:	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ZT:	0	0	0	0	0	0	0	0	0
MT:	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Kv:	0	0	0	1	1	2	2	3	4
Kd:	0	0	2	3	5	7	10	12	14
dM:	0	0	0	0	2	2	2	2	2
kM:	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Normal:	30	34	36	43	45	47	47	47	48
Med.-gesamt/PAMs:	30/0	34/0	38/2	47/4	54/9	59/12	62/15	65/18	69/21
%-PAMs:	0	0	5,3	8,5	16,7	20,3	24,2	27,7	30,4
	10. Woche	11. Woche	12. Woche	13. Woche	14. Woche	15. Woche	16. Woche	17. Woche	18. Woche
dT2h1w:	1	1	2	2	2	2	3	3	3
dT1h2w:	1	2	2	2	2	2	2	2	2
dT2h2w:	0	1	1	1	1	2	2	2	2
ZT:	0	0	0	0	0	0	0	0	0
MT:	0	1	1	1	1	1	1	1	2
Kv:	5	6	7	8	8	10	12	14	15
Kd:	15	20	23	27	29	32	36	38	43
dM:	2	2	3	3	3	3	4	5	7
kM:	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Normal:	50	50	47	46	46	44	42	42	40
Med.-Gesamt/PAMs:	74/24	83/33	86/39	90/44	92/46	96/52	102/60	107/65	114/74
%-PAMs:	32,4	39,8	45,3	48,9	50,0	54,2	58,8	60,7	64,9

Tab. 5.22 Cnox-5-Morpholino-Studie (GESAMT)									
	1. Woche	2. Woche	3. Woche	4. Woche	5. Woche	6. Woche	7. Woche	8. Woche	9. Woche
dT2h1w:	0	0	0	0	0	0	1	3	3
dT1h2w:	0	0	0	0	0	0	0	0	0
dT2h2w:	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ZT:	0	0	0	0	0	0	0	1	1
MT:	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Kv:	0	0	0	1	1	2	3	3	5
Kd:	0	0	1	1	2	5	7	9	12
dM:	0	0	0	0	0	0	0	0	0
kM:	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Normal:	30	34	37	44	46	49	48	48	50
Med.-gesamt/PAMs:	30/0	34/0	38/1	46/2	49/3	56/7	59/11	64/16	71/21
%-PAMs:	0	0	2,6	4,3	6,1	12,5	18,6	25,0	29,6
	10. Woche	11. Woche	12. Woche	13. Woche	14. Woche	15. Woche	16. Woche	17. Woche	18. Woche
dT2h1w:	3	4	4	4	4	5	5	5	5
dT1h2w:	1	2	2	2	2	2	2	2	2
dT2h2w:	0	1	1	1	3	3	3	3	4
ZT:	1	1	1	1	1	1	1	1	1
MT:	0	1	1	1	1	1	1	2	2
Kv:	6	7	7	8	8	9	9	9	13
Kd:	13	17	18	20	22	25	25	28	36
dM:	0	0	1	1	1	1	1	1	3
kM:	0	0	0	0	0	0	0	1	1
Normal:	49	51	49	43	43	42	40	38	34
Med.-Gesamt/PAMs:	73/24	84/33	84/35	81/38	85/42	89/47	87/47	90/52	101/67
%-PAMs:	32,9	39,3	41,7	46,9	49,4	52,8	54,0	57,8	66,3

Tab. 5.23 H₂O-Kontroll-Studie (RNAi; GESAMT)									
	1. Woche	2. Woche	3. Woche	4. Woche	5. Woche	6. Woche	7. Woche	8. Woche	9. Woche
dT2h1w:	0	0	0	0	0	0	0	0	0
dT1h2w:	0	0	0	0	0	0	0	0	0
dT2h2w:	0	0	0	0	0	0	1	1	1
ZT:	0	0	0	0	1	1	1	1	1
MT:	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Kv:	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Kd:	0	0	0	0	0	0	0	0	0
dM:	0	0	0	0	0	0	0	0	0
kM:	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Normal:	30	32	37	41	44	50	57	62	72
Med.-gesamt /PAMs:	30/0	32/0	37/0	41/0	45/1	51/1	59/2	64/2	74/2
%-PAMs:	0	0	0	0	2,2	2,0	3,4	3,1	2,7
	10. Woche	11. Woche	12. Woche	13. Woche	14. Woche	15. Woche	16. Woche	17. Woche	18. Woche
dT2h1w:	0	0	1	1	1	1	1	1	1
dT1h2w:	0	0	0	0	0	0	0	0	0
dT2h2w:	1	1	1	1	1	1	1	1	1
ZT:	1	1	1	1	2	2	2	2	3
MT:	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Kv:	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Kd:	0	0	0	0	0	0	0	1	1
dM:	0	0	0	0	0	0	0	0	0
kM:	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Normal:	81	90	101	109	119	131	139	143	150
Med.-Gesamt/PAMs:	83/2	92/2	104/3	112/3	123/4	135/4	143/4	148/5	156/6
%-PAMs:	2,4	2,2	2,9	2,7	3,3	3,0	2,8	3,4	3,8

Tab. 5.24 H₂O-Kontroll-Studie (Morpholino; GESAMT)									
	1. Woche	2. Woche	3. Woche	4. Woche	5. Woche	6. Woche	7. Woche	8. Woche	9. Woche
dT2h1w:	0	0	0	0	0	0	0	0	0
dT1h2w:	0	0	0	0	0	0	0	1	1
dT2h2w:	0	0	0	0	0	0	1	1	1
ZT:	0	0	0	0	0	0	0	0	0
MT:	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Kv:	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Kd:	0	0	0	0	0	0	0	0	0
dM:	0	0	0	0	0	0	0	0	0
kM:	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Normal:	30	31	36	39	44	49	55	62	67
Med.-gesamt/PAMs:	30/0	31/0	36/0	39/0	44/0	49/0	56/1	64/2	69/2
%-PAMs:	0	0	0	0	0	0	1,8	3,1	2,9
	10. Woche	11. Woche	12. Woche	13. Woche	14. Woche	15. Woche	16. Woche	17. Woche	18. Woche
dT2h1w:	0	0	0	0	0	0	0	0	0
dT1h2w:	1	1	1	1	1	1	1	1	1
dT2h2w:	1	1	1	1	1	1	1	1	1
ZT:	0	0	1	1	1	1	1	2	2
MT:	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Kv:	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Kd:	0	0	0	0	0	0	0	0	0
dM:	0	0	0	0	0	0	0	0	0
kM:	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Normal:	74	82	94	106	115	124	128	133	143
Med.-Gesamt/PAMs:	76/2	84/2	97/3	109/3	118/3	127/3	131/3	137/4	147/4
%-PAMs:	2,6	2,4	3,1	2,8	2,5	2,4	2,3	2,9	2,7

Tab. 5.25 RNAi-Kontroll-Studie (RNAi; GESAMT)									
	1. Woche	2. Woche	3. Woche	4. Woche	5. Woche	6. Woche	7. Woche	8. Woche	9. Woche
dT2h1w:	0	0	0	0	1	1	1	1	1
dT1h2w:	0	0	0	0	0	0	0	0	0
dT2h2w:	0	0	0	0	0	0	0	0	1
ZT:	0	1	1	1	1	1	1	1	1
MT:	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Kv:	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Kd:	0	0	0	0	0	0	0	0	0
dM:	0	0	0	0	0	0	0	0	0
kM:	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Normal:	30	31	35	40	44	49	55	60	65
Med.-gesamt/PAMs:	30/0	32/1	36/1	41/1	46/2	51/2	57/2	62/2	68/3
%-PAMs:	0	3,1	2,8	2,4	4,3	3,9	3,5	3,2	4,4
	10. Woche	11. Woche	12. Woche	13. Woche	14. Woche	15. Woche	16. Woche	17. Woche	18. Woche
dT2h1w:	1	1	1	1	1	1	1	1	1
dT1h2w:	0	0	0	0	0	0	0	0	0
dT2h2w:	1	1	1	1	1	1	1	1	1
ZT:	1	2	2	2	2	2	2	3	3
MT:	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Kv:	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Kd:	1	1	1	1	1	1	1	1	2
dM:	0	0	0	0	0	0	0	0	0
kM:	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Normal:	72	81	91	100	109	117	123	134	144
Med.-Gesamt/PAMs:	76/4	86/5	96/5	105/5	114/5	122/5	128/5	140/6	151/7
%-PAMs:	5,3	5,8	5,2	4,8	4,4	4,1	3,9	4,3	4,6

Tab. 5.26 Sense-Kontroll-Studie (Morpholino; GESAMT)									
	1. Woche	2. Woche	3. Woche	4. Woche	5. Woche	6. Woche	7. Woche	8. Woche	9. Woche
dT2h1w:	0	0	0	0	0	0	0	0	0
dT1h2w:	0	0	0	0	0	0	0	0	0
dT2h2w:	0	0	0	0	0	0	0	1	1
ZT:	0	0	0	0	0	1	1	1	1
MT:	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Kv:	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Kd:	0	0	0	0	0	0	0	0	0
dM:	0	0	0	0	0	0	0	0	0
kM:	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Normal:	30	33	38	42	45	49	53	58	65
Med.-gesamt/PAMs:	30/0	33/0	38/0	42/0	45/0	50/1	54/1	60/2	67/2
%-PAMs:	0	0	0	0	0	2,0	1,9	3,3	3,0
	10. Woche	11. Woche	12. Woche	13. Woche	14. Woche	15. Woche	16. Woche	17. Woche	18. Woche
dT2h1w:	0	0	0	0	0	0	0	0	0
dT1h2w:	0	0	0	0	0	0	0	0	0
dT2h2w:	1	1	1	1	1	1	1	1	1
ZT:	2	2	2	2	3	3	4	4	4
MT:	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Kv:	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Kd:	0	0	0	0	0	0	0	1	1
dM:	0	0	0	0	0	0	0	0	0
kM:	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Normal:	72	80	89	97	106	111	118	125	137
Med.-Gesamt/PAMs:	75/3	83/3	92/3	100/3	110/4	115/4	123/5	131/6	143/6
%-PAMs:	4,0	3,6	3,3	3,0	3,6	3,5	4,1	4,6	4,2

6. LITERATURVERZEICHNIS

- AERNE, B.L., C.D. BAADER & V. SCHMID (1995):** Life stage and tissue-specific expression of the homeobox gene *Cnox-1-Pc* of the hydrozoan *Podocoryne carnea*. *Developmental Biology* 169: 547-556.
- AGRAWAL, S., J. GOODCHILD, M.P. CIVEIRA, P.S. SARIN & P. ZAMECNIK (1989):** Phosphoroamidate, phosphorothioate, and methylphosphonate analogs of oligodeoxynucleotides: inhibitors of replication of human immunodeficiency virus. *Nucleosides Nucleotides & Nucleic Acids* 8: 819-823.
- AGRAWAL, S., J. TEMSAMANI & J.Y. TANG (1991):** Pharmacokinetics, bio-distribution, and stability of oligodeoxynucleotide phosphorothioates in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 7595-7599.
- AL-KAFF, N.S., S.N. COVEY, M.M. KREIKE, A.M. PAGE, R. PINDLER & P.J. DALE (1998):** Transcriptional and posttranslational plant gene silencing in response to a pathogen. *Science* 279: 2113-2115.
- AKAM, M. (1989):** Hox and HOM: Homologous gene clusters in insects and vertebrates. *Cell* 57: 347-349.
- AKAM, M. (1995):** Hox genes and the evolution of diverse body plans. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 349: 313-319.
- ARORA, V., M.L. CATE, C. GHOSH & P.L. IVERSEN (2002):** Phosphorodiamidate morpholino antisense oligomers inhibit expression of human cytochrome P450 3A4 and alter selected drug metabolism. *Drug Metabolism and Disposition* vol. 30, no. 7: 757-762.
- AVEROF, M. & M. AKAM (1993):** HOM/Hox genes of *Artemia*: Implications for the origin of insect and crustacean body plans. *Current Biology* 3: 73-78.
- AVEROF, M., R. DAWES & D. FERRIER (1996):** Diversification of arthropod Hox genes as a paradigm for the evolution of gene functions. *Sem. Cell. Dev. Biol.* 7: 539-551.
- AVEROF, M. & N.H. PATEL (1997):** Crustacean appendage evolution associated with changes in Hox gene expression. *Nature* 388: 682-686.
- BARON, A., M.S. FEATHERSTONE, R.E. HILL, A. HAIL, B. GALLIOT & D. DUBOULE (1987):** Hox-1.6: A mouse homeo-box-containing gene member of the Hox-1 complex. *EMBO Journal* 6: 2977-2986.
- BARTELS, J.L., M.T. MURTHA & F.H. RUDDLE (1993):** Multiple Hox/HOM-class homeoboxes in Plathelminthes. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 2: 143-151.
- BEEMAN, R.W., J.J. STUART, M.S. HAAS & R.E. DENELL (1989):** Genetic analysis of the homeotic gene complex (HOM-C) in the beetle *Tribolium castaneum*. *Dev. Biol.* 133:196-209.
- BERNSTEIN, E., A.A. CAUDY, S.M. HAMMOND & G.J. HANNON (2001):** Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* 409: 363-366.
- BILLETER, M., Y.Q. QUIAN, G. OTTING, M. MÜLLER, W.G. GEHRING & WÜTHRICH (1993):** Determination of the nuclear magnetic resonance solution structure of an *antennapedia* homeodomain-DNA complex. *Journal Mol. Biol.* 234: 1084-1097.
- BODE, H.R., (2001):** The role of Hox genes in axial patterning in Hydra. *American Zoologist*: vol. 41, no. 3: 621-628.
- BOGARD, D., M.F. UTSET, A. AWGULEWITSCH, T. MIKI, C.P. HART & F.H. RUDDLE (1989):** The developmental expression pattern of new murine homeobox gene: Hox-2.5. *Developmental Biology* 133: 537-549.

- BOSHER, J.M., P. DUFOURCQ, S.SOOKHAREEA & M. LABOUESSE (1999):** RNA interference can target pre-mRNA: Consequences for gene expression in a *Caenorhabditis elegans* operon. *Genetics* 153: 1245-1256.
- BREIER, G., G.R. DRESSLER & P. GRUSS (1988):** Primary structure and developmental expression pattern of Hox 3.1, a member of the murine Hox 3 homeo box gene cluster. *EMBO Journal* 7: 1329-1336.
- BRIDGE, D.M., N.A. STOVER & R.E. STEELE (2000):** Expression of a novel receptor tyrosine kinase and a *paired*-like homeobox gene provides evidence of differences in patterning at the oral and aboral ends of *Hydra*. *Developmental Biology* 220: 253-262.
- BROOK, N.M., J. GARCIA-FERNÁNDEZ & P.W.H. HOLLAND (1998):** The ParaHox gene cluster is an evolutionary sister of the Hox gene cluster. *Nature* 392: 920-922.
- BROWN, T.A. (1999):** Moderne Genetik. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, 2. Auflage.
- BÚCAN, M., T. YANG-FENG, A.M. COLBERG-POLEY, D.J. WOLGEMUTH, D.-L. GUENET, U. FRANCKE & H. LEHRACH (1986):** Genetic and cytogenetic localisation of the homeo box containing genes of mouse chromosome 6 and human chromosome 7. *EMBO Journal* 5: 2899-2905.
- BÜRGLIN, T.R. (1994):** A comprehensive classification of homeobox genes. pp 25-71. Guidebook to the homeobox genes. D. DUBOULE (ed.) Oxford University Press, Oxford.
- BÜTSCHLI, O. (1884):** Bemerkungen zur Gastraea-Theorie. *Morph. Jahrbuch* 9: 415-427.
- BÜTSCHLI, O. (1910):** Vorlesung über vergleichende Anatomie. 1. Lieferung. Leipzig.
- CALVO, R., J. WEST, W. FRANKLIN, P. ERICKSON, L. BEMIS, E. LI, B. HELFRICH, P. BUNN, J. ROCHE, E. BRAMBILLA, R. ROSELL, R.M. GEMMILL & H.A. DRABKIN (2000):** Altered Hox and WNT7A expression in human lung cancer. *PNAS*, vol.: 97, no.: 23: 12776-12781.
- CARTWRIGHT, P., M. DICK & L.W. BUSS (1993):** HOM/Hox type homeoboxes in the chelicerate *Limulus polyphemus*. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 2: 185-192.
- CARTWRIGHT, P., J. BOWSER & L.W. BUSS (1999):** Expression of a Hox gene, *Cnox-2*, and the division of labor in a colonial hydroid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 2183-2186.
- CARTWRIGHT, P. & L.W. BUSS (1999):** Colony integration and the expression of the *Hox* gene, *Cnox-2*, in *Hydractinia symbiolongicarpus* (Cnidaria: Hydrozoa). *Journal of Experimental Zoology (Mol. Dev. Evol.)* 285: 57-62.
- CASTRO, L.F.C. & P.W.H. HOLLAND (2003):** Chromosomal mapping of ANTP class homeobox genes in *amphioxus*: piecing together ancestral genomes. *Evol. & Dev.* vol.: 5: 459-465.
- CHANG, E.H., Z. YU, K. SHINOZUKA, G. ZON, W.D. WILSON & A. STREKOWSKA (1989):** Cooperative inhibition of *ras* p21 protein synthesis with phosphorus-modified antisense oligonucleotides. *Anticancer Drug Des.* 4: 221-232.
- COGONI, C. & G. MACINO (1999):** Gene silencing in *Neurospora crassa* requires a protein homologous to RNA-dependent RNA polymerase. *Nature* 399: 166-169.
- COGONI, C. & G. MACINO (2000):** Post-transcriptional gene silencing across kingdoms. *Genes Development* 10: 638-643.
- COLLINS, A.G. (1998):** Evaluating multiple alternative hypotheses for the origin of bilateria: An analysis of 18S rRNA molecular evidence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 15458-15463.
- COULIER, F., C. POPOVICI, R. VILLET & D. BIRNBAUM (2000):** MetaHox gene clusters. *Journal of Experimental Zoology* 288: 345-351.
- COUZIN, J. (2002):** Breakthrough of the year: Small RNAs make big Splash. *Science*: 298: 2296.

- CRIBBS, D.L., M.A. PULTZ, D. JOHNSON, M. MAZZULLA & T.C. KAUFMANN (1992):** Structural complexity and evolutionary conservation of the *Drosophila* homeotic gene *proboscipedia*. *Oxford University Press* 11: 1437-1449.
- DALMAY, T., R. HORSEFIELD, T.H. BRAUNSTEIN & D.C. BAULCOMBE (2001):** SDE3 encodes an RNA helicase required for post-transcriptional gene silencing in *Arabidopsis*. *EMBO Journal* 20: 2069-2078.
- DAVID, C. N. & H. M. MACWILLIAMS (1978):** Regulation of the self-renewal probability in hydra stem cell clones. *PNAS*, vol. 75, no. 2: 886-890.
- DEGNAN, B.M., S.M. DEGNAN, A. GIUSTI & MORSE D.E. (1995):** A hox/hom homeobox gene in sponges. *Gene* 155: 175-177.
- DENELL, R.E., S.J. BROWN & R.W. BEEMAN (1996):** Evolution of the organization and function of insect homeotic complexes. *Semin. Cell Dev. Biol.* 7:527-538.
- DESPLAN, C., J. THEIS & P.H. O'FARRELL (1985):** The *Drosophila* developmental gene engrailed encodes a sequence specific DNA binding activity. *Nature* 318: 630-635.
- DESPLAN, C., J. THEIS & P.H. O'FARRELL (1988):** The sequence specificity of homeodomain-DNA interaction. *Cell* 54: 1081-1090.
- DIAS, N. & C.A. STEIN (2003):** Antisense oligonucleotides: Basic concepts and mechanisms. *Molecular Cancer Therapeutics* vol. 1: 347-355.
- DICK, M.H. & L.W. BUSS (1994):** A PCR-based survey of homeobox genes in *Ctenodrilus serratus* (Annelida: Polychaeta). *Mol. Phyl. Evol.* 3: 146-158.
- DIEDERICH, R.J., A.M. PATTATUCCI & T.C. KAUFMANN (1991):** Developmental and evolutionary implications of labial, Deformed and engrailed expression in the *Drosophila* head. *Development* 113: 273-281.
- DOLECKI, G.J., G. WANG & T. HUMPHEREYS (1988):** Stage- and tissue-specific expression of two homeobox genes in sea urchin embryos and adults. *Nucl. Acid. Res.* 16: 11542-11558.
- DUBOULE, D. (1994):** Guidebook to the homeobox genes. Oxford University Press, Oxford.
- DUNCAN, I. (1987):** The bithorax complex. *Annu. Rev. Genet.* 21: 285-319.
- ELBASHIR, S.M., J. HARBORTH, W. LENDECKEL, A. YALCIN, K. WEBER & T. TUSCHL (2001a):** Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 411: 494-498.
- ELBASHIR, S.M., W. LENDECKEL & T. TUSCHL (2001b):** RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Development* 15: 188-200.
- ENDER, A. (1997):** Untersuchungen zur Evolutionsgenetik des athekaten Hydrozoons *Eleutheria dichotoma* (QUATREFAGES, 1842). Univ. Diss., Frankfurt a. M..
- ENDER, A. & B. SCHIERWATER (2003):** Placozoa are not derived cnidarians: Evidence from molecular morphology. *Mol. Biol. Evol.* 20 (1): 130-134.
- ENDL, I., J.U. LOHMANN & T.C.G. BOSCH (1999):** Head-specific gene expression in *Hydra*: Complexity of DNA-protein interactions at the promotor of *ks1* is inversely correlated to the head activation potential. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 1445-1450.
- FERRIER, D.E.K. & P.W.H. HOLLAND (2001a):** Ancient origin of the Hox gene cluster. *Nature Reviews Genetics* 2: 33-38.
- FERRIER, D.E.K. & P.W.H. HOLLAND (2001b):** Sipunculan ParaHox genes. *Evolution & Development* vol. 3, no. 4: 263-270.
- FERRIER, D.E.K. & P.W.H. HOLLAND (2002):** *Ciona intestinalis* ParaHox genes: evolution of Hox/ParaHox cluster integrity, developmental mode, and temporal colinearity. *Mol. Phylogenet. Evol.* 24: 412-417.

- FINNERTY, J.R. (1998):** Homeoboxes in sea anemones and other non-bilaterian animals: implications for the evolution of the Hox cluster and the zootype. *Curr. Dev. Biol.* 40: 212-251.
- FINNERTY, J.R. (2003):** The origins of axial patterning in the metazoa: how old is bilateral symmetry? *Int. J. Dev. Biol.* 47: 523-529.
- FINNERTY, J.R., V.A. MASTER, S. IRVINE, M.J. KOURAKIS, S. WARRINER & M.Q. MARTINDALE (1998):** Homeobox genes in the Ctenophora: identification of *paired*-type and Hox homologues in the tentaculate ctenophore, *Beroë ovata*. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* 5 (4): 249-258.
- FINNERTY, J.R. & M.Q. MARTINDALE (1997):** Homeoboxes in sea anemones (Cnidaria: Anthozoa): a PCR-based survey of *Nematostella vectensis* and *Metridium senile*. *Biological Bulletin* 193: 62-76.
- FINNERTY, J.R. & M.Q. MARTINDALE (1998):** The evolution of the Hox cluster: Insights from outgroups. *Curr. Opin. In Genet. & Dev.* 8: 681-687.
- FINNERTY, J.R. & M.Q. MARTINDALE (1999):** Ancient origins of axial patterning genes: Hox genes and ParaHox genes in the cnidaria. *Evolution & Development* 1: 16-23.
- FINNERTY, J.R., D. PAULSON, P. BURTON, K. PANG & M.Q. MARTINDALE (2003):** Early evolution of a homeobox gene: the parahox gene *Gsx* in the Cnidaria and the Bilateria. *Evolution & Development* 5 (4):331-45.
- FIRE, A., S. XU, M.K. MONTGOMERY, S.A. KOSTAS, S.E. DRIVER & C.C. MELLO (1998):** Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391: 806-811.
- FRÖBIUS, A.C., G. GENIKHOVICH, U. KÜRN, F. ANTON-ERXLEBEN & T.C.G. BOSCH (2003):** Expression of developmental genes during early embryogenesis of hydra. *Dev. Genes Evol.* 213: 445-455.
- GALDERISI, U., M. CIPOLLARO, M.A. MELONE, G. IACOMINO, G. DI BERNARDO, G. GALANO, R. CONTRUFO, V. ZAPPÀ & A. CASCINO (1996):** Myotonic dystrophy: antisense oligonucleotide inhibition of DMPK gene expression in vitro. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 221: 750-754.
- GALL, J.G. & M.L. PARDUE (1969):** Formation and detection of RNA-DNA hybrid molecules in cytological preparations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 63: 378-383.
- GALLIOT, B. (2000):** Conserved and divergent genes in apex and axis development of cnidarians. *Current Opinion in Genetics & Development* 10 (6):629-637.
- GALLIOT, B. & D. MILLER (2000):** Origin of anterior patterning. How old is our head? *Trends Genet.* 16 (1):1-5.
- GALLIOT, B. & V. SCHMID (2002):** Cnidarians as a model system for understanding evolution and regeneration. *Int. J. Dev. Biol.* 46: 39-48.
- GARCIA-FERNÁNDEZ, J., J. BAGUÑÀ & E. SALÓ (1991):** Planarian homeobox genes: Cloning, sequence analysis and expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 7338-7342.
- GARCIA-FERNÁNDEZ, J. & P.W.H. HOLLAND (1994):** Archetypal organisation of the amphioxus Hox gene cluster. *Nature* 370: 563-566.
- GAUCHAT, D., F. MAZET, C. BERNEY, M. SCHUMMER, S. KREGER, J. PAWLOWSKI & B. GALLIOT (2000):** Evolution of *Antp*-class genes and differential expression of *Hydra Hox/paraHox* genes in anterior patterning. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 97, no. 9: 4493-4498.
- GEHRING, W.J., Y. HIROMI (1986):** Homeotic genes and the homeobox. *Annual Review Genetics* 20: 147-173.

- GEHRING, W.J., M. MÜLLER, M. AFFOLTER, A. PERCIVAL-SMITH, M. BILLETER, Y.Q. QIAN, G. OTTING & K. WÜTHRICH (1990): The structure of the homeodomain and its functional implications. *Trends in Genetics* 6: 323-329.
- GEHRING, W.J., M. AFFOLTER & T. BÜRGLIN (1994): Homeodomain proteins. *Annu. Rev. Biochem.* 63: 487-526.
- GEHRING, W.J. (1998): Master control genes in development and evolution: The homeobox story. Yale University Press, New Haven and London.
- GEHRING, W.J. & IKEO, K. (1999): *Pax 6*. Mastering eye morphogenesis and eye evolution. *Trends in Genetics* 15: 371-377.
- GILES, R.V., C.J. RUDELL, D.G. SPILLER, J.A. GREEN & D.M. TIDD (1995): Single base discrimination for ribonuclease-H-dependent antisense effects within intact human leukaemia cells. *Nucl. Acids Res.* 23: 954-961.
- GRAHAM, A., N. PAPALOPULU & R. KRUMLAUF (1989): The murine and *Drosophila* homeobox gene complexes have common features of organization and expression. *Cell* 57: 367-378.
- GRELL, K.G. (1971a): Über den Ursprung der Metazoen. *Mikrokosmos* 60 (4): 97-102.
- GRELL, K.G. (1971b): Embryonalentwicklung bei *Trichoplax adhaerens*. F.E. SCHULZE. *Naturwissenschaften* 58 (11): 570.
- GRELL, K.G. (1971c): *Trichoplax adhaerens* F.E. SCHULZE und die Entstehung der Metazoen. *Naturwissensch. Rundschau* 24 (4): 160-161.
- GRELL, K.G. (1972): Eibildung und Furchung von *Trichoplax adhaerens* F.E. SCHULZE (Placozoa). *Z. Morphol. Tiere* 73: 295-310.
- GRELL, K.G. (1974): Vom Einzeller zum Vielzeller. Hundert Jahre Gastraea-Theorie. *Biologie in unserer Zeit* 4: 65-71.
- GRELL, K.G. (1979): Die Gastraea-Theorie. *Med.-hist. Journal* 14: 275-291.
- GRELL, K.G. & G. BENWITZ (1971): Die Ultrastruktur von *Trichoplax adhaerens* F.E. SCHULZE. *Cytobiol.* 4 (2): 216-240.
- GRELL, K.G. & G. BENWITZ (1974a): Spezifische Verbindungsstrukturen der Faserzellen von *Trichoplax adhaerens* F.E. SCHULZE. *Z. Naturforsch.* 29c: 790.
- GRELL, K.G. & G. BENWITZ (1974b): Elektronenmikroskopische Beobachtungen über das Wachstum der Eizelle und die Bildung der "Befruchtungsmembran" von *Trichoplax adhaerens* F.E. SCHULZE (Placozoa). *Z. Morphol. Tiere* 79: 295-310.
- GRELL, K.G. & G. BENWITZ (1981): Ergänzende Untersuchungen zur Ultrastruktur von *Trichoplax adhaerens* F.E. SCHULZE (Placozoa). *Zoomorph.* 98 (1): 47-67.
- GRELL, K.G. & LÓPEZ-UCHOTERENA (1987): A new record of *Trichoplax adhaerens* F.E. SCHULZE (phylum placozoa) in the mexican caribbean sea. *An. Inst. Cienc. del Mar y Limnol. Univ. Nal. Autón.*, Mexico, 14 (2): 255-256.
- GRELL, K.G. & A. RUTHMANN (1991): *Placozoa. Microscopic anatomy of invertebrates*, vol. 2, Wiley-Liss, New York: 13-27.
- GRIMM, C. (2002): Experimentelle Untersuchungen zur Funktion von Hox-Genen im metagenetischen Lebenszyklus des Hydrozoon *Eleutheria dichotoma*. Diplomarbeit, J.W. GOETHE-Universität, Frankfurt am Main.
- GRÖGER, H., P. CALLAERTS, W.J. GEHRING & V. SCHMID (1999): Gene duplication and recruitment of a specific tropomyosin to striated muscle cells in the jellyfish *Podocoryne carnea*. *Journal Exp. Zool.* 285: 378-386.
- GUILLERMO, O., M. VISPO, A. MAILHOS, C. MARTINEZ, B. SOZA-PINEDA, W. FIELITZ & R. EHRlich (1992): Homeoboxes in flatworms. *Gene* 121: 337-342.

- HADRYN, H., B. SCHIERWATER & W. MROWKA (1990):** The feeding behaviour of a semi-sessile hydromedusa and how it is affected by the mode of reproduction. *Animal Behaviour* 40: 935-944.
- HAMMOND, S.M., E. BERNSTEIN, D. BEACH & G.J. HANNON (2000):** An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptal gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature* 404: 293-296.
- HART, C.P., A. AWGULEWITSCH, A. FAINSOD, W. MCGINNIS & F.H. RUDDLE (1985):** Homeo box gene complex on mouse chromosome 11: Molecular cloning, expression in embryogenesis and homology to human homeo box locus. *Cell* 43: 9-18.
- HARTH, G., P.C. ZAMECNIK, J.Y. TANG, D. TABATADZE & M.A. HORWITZ (2000):** Treatment of *Mycobacterium tuberculosis* with antisense oligonucleotides to glutamine synthetase mRNA inhibits glutamine synthetase activity, formation of the poly-L-glutamate/glutamine cell wall structure, and bacterial replication. *PNAS*, vol. 97, no. 1: 418-423.
- HARTLAUB, C. (1886):** Wissenschaftliche Mittheilung. Über den Bau der *Eleutheria* QUATREFAGES. *Zool. Anz.* 9: 706-711.
- HAUENSCHILD, C. (1956):** Experimentelle Untersuchungen über die Entstehung asexueller Klone bei der Hydromeduse *Eleutheria dichotoma*. *Zeitschrift für Naturforschung*. Band 11b, Heft 7.
- HAUENSCHILD, C. (1957a):** Ergänzende Mitteilung über die asexuellen Medusenklone bei *Eleutheria dichotoma*. *Zeitschrift für Naturforschung*. Band 12 b, Heft 6.
- HAUENSCHILD, C. (1957b):** Versuche über die Wanderung der Nesselzellen bei der Meduse von *Eleutheria dichotoma*. *Zeitschrift für Naturforschung*. Band 12 b, Heft 7.
- HAYWARD, D.C., J. CATMULL, J.S. REECE-HOYES, H. BERGHAMMER, H. DODD, S. J. HANN, D.J. MILLER & E.E. BALL (2001):** Gene structure and larval expression of *cnox-2Am* from the coral *Acropora millepora*. *Dev. Genes Evol.* 211:10-19.
- HÉLÈNE, C. & J.J. TOULUME (1990):** Specific regulation of gene expression by antisense, sense and antigene nucleic acids. *Biochim. Biophys. Acta* 1049: 99-125.
- HENNING, W. (2002):** Genetik. Springer Verlag, Berlin.
- HINCKS, T. (1861):** On *Clavatella*, a new genus of corynoid polypes, and its reproduction. *Ann. Mag. Nat. Hist.* 7: 73-81.
- HOEY, T. & M. LEWINE (1988):** Divergent homeobox proteins recognize similar DNA sequences in *Drosophila*. *Nature* 332: 858-861.
- HOLLAND, P.W.H. (1992):** Homeobox genes in vertebrate evolution. *BioEssays* 14: 267-272.
- HOLLAND, P.W.H. & B.L. HOGAN (1988):** Expression of homeobox genes during mouse development: A review. *Genes Dev.* 2: 773-782.
- HOLLAND, P.W.H., J. GARCIA-FERNANDEZ, N.A. WILLIAMS & A. SIDOW (1994):** Gene duplications and the origins of vertebrate development. *Dev. Suppl.*: 125-133.
- HSIEH-LI, H.M., D.P. WITTE, J.C. SZUCSIK, M. WEINSTEIN, H. LI & S.S. POTTER (1995):** *Gsh2*, a murine homeobox gene expressed in the developing brain. *Mech. Dev.* 50: 177-186.
- HUNTER, C.P. (1999):** A touch of elegance with RNAi. *Current Biology* 9: 440-442.
- HUNTER, C.P. (2000):** Gene silencing: Shrinking the black box of RNAi. *Curr. Biol.* 10: 137-140.
- IVERSEN, P., J. MATA, W. TRACEWELL & G. ZON (1994):** Pharmacokinetics of an antisense phosphorothioate oligodeoxynucleotide against *rev* from human immunodeficiency virus type 1 in the adult male rat following single injections and continuous infusion. *Antisense Res. Dev.* 4: 43-52.

- JAKOB, W. (2001):** Experimentelle Untersuchungen zur Inhibition von Hox-Genen in dem athekaten Hydrozoon *Eleutheria dichotoma* (QUATREFAGES, 1842). Diplomarbeit, J.W. GOETHE-Universität, Frankfurt am Main.
- JAKOB, W., S. SAGASSER, S. DELLAPORTA, P.W.H. HOLLAND, K. KUHN & B. SCHIERWATER (2004):** The *Trox-2* Hox/ParaHox gene of *Trichoplax* (Placozoa) marks an epithelial boundary. *Development Genes and Evolution* 214: 170-175.
- KAPADIA, S.B., A. BRIDEAU-ANDERSEN & F.V. CHISARI (2003):** Interference of hepatitis C virus RNA replication by short interfering RNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*: 100:2014-2018.
- KAPPEN, C., K. SCHUGHART & F.H. RUDDLE (1993):** Early evolutionary origin of major homeodomain sequence classes. *Genomics* 18: 54-70.
- KAUFMANN, T.C., M. SEEGER & G. OLSEN (1990):** Molecular and genetic organization of the *antennapedia* gene complex of *Drosophila melanogaster*. *Adv. Genet.* 27: 309-362.
- KENNERDELL, J.R. & R.W. CARTHEW (1998):** Use of dsRNA-mediated genetic interference to demonstrate that *frizzled* and *frizzled 2* act in wingless pathway. *Cell* 95: 1017-1026.
- KESSEL, M., F. SCHULZE, M. FIBI & P. GRUSS (1987):** Primary structure and nuclear localization of a murine homeo domain protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 5306-5310.
- KETTING, R.F. & R.H.A. PLASTERK (2000):** A genetic link between co-suppression and RNA interference in *C. elegans*. *Nature* 404: 296-298.
- KENYON, C. & B. WANG (1991):** A cluster of *antennapedia*-class homeobox genes in a nonsegmented animal. *Science* 253: 516-517.
- KIM, S.K., L. SELLERI, J.S. LEE, A.Y. ZHANG, X. GU, Y. JACOBS & M.L. CLEARY (2002):** Pbx1 inactivation disrupts pancreas development and in *lpf1*-deficient mice promotes diabetes mellitus. *Nat Genet.*, 30 (4):430-435.
- KISSINGER, C.R., B. LIU, E. MARTIN-BLANCO, T.B. KORNBERG & C.O. PABO (1990):** Crystal structure of an engrailed homeodomain-DNA complex at 2.8 Å resolution: a framework for understanding homeodomain-DNA interactions. *Cell* 63: 579-590.
- KNOLL, A.H. & S.B. CAROLL (1999):** Early animal evolution: emerging views from comparative biology and geology. *Science* 284: 2129-2137.
- KONG, X.C., P. BARZAGHI & M.A. RUEGG (2004):** Inhibition of synapse assembly in mammalian muscle *in vivo* by RNA interference. *EMBO Journal* 5: 183-188.
- KOURAKIS, M.J. & M.Q. MARTINDALE (2000):** Combined-method phylogenetic analysis of Hox and ParaHox genes of the metazoan. *Journal of Experimental Zoology* 288 (2): 175-191.
- KROIHER, M. (1999):** In *Hydra magnipapillata* the activator of protein kinase C δ 8 causes multiple head formation along the body axis only when accompanied by feeding, but heavy feeding alone is sufficient to cause multiple head formation. *International Journal Developmental Biology* 43: 817-821.
- KROIHER, M. (2000):** Morphological chimeras of larvae and adults in a hydrozoan – insights into the control of pattern formation and morphogenesis. *Int. J. Dev. Biol.* 44: 861-866.
- KRUMBACH, T. (1907):** Beiträge zur Kenntnis der Meduse *Eleutheria (Clavatella)* aus dem Golfe von Triest. Inaugural-Dissertation. Wilh. G. Korn, Breslau.
- KRUSE, M., A. MIKOC, H. CETKOVIC, V. GAMULIN, B. RINKEVICH, I.M. MULLER, W.E. MULLER (1994):** Molecular evidence for the presence of a developmental gene in the lowest animals: identification of a homeobox-like gene in the marine sponge *Geodia cydonium*. *Mech. Aging. Dev.* 77: 43-54.
- KUHLMANN, M. & W. NELLEN (2004):** RNAinterferenz. *Biologie unserer Zeit* nr.3:142-150.
- KUHN, K. (1997):** Evolution von HOM/Hox-Genen: Isolation und Klassifizierung von Homeoboxgenen diploblastischer Organismen. Univ. Diss., Frankfurt a.M..

- KUHN, K., B. STREIT & B. SCHIERWATER (1996): Homeobox genes in the cnidarian *Eleutheria dichotoma*: Evolutionary implications for the origin of *Antennapedia*-class (HOM/Hox) genes. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 6: 30-38.
- KUHN, K., B. STREIT & B. SCHIERWATER (1999): Isolation of Hox genes from the scyphozoan *Cassiopeia xamachana*: implications for the early evolution of Hox genes. *Experimental Zoology* 285 (1): 63-75.
- KUMAR, M. & G.G. CARMICHAEL (1998): Antisense RNA: Function and fate of duplex RNA in cells of higher eukaryotes. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62: 1415-1434.
- KUTADA, S., T. MIYASHITA, S. TANAKA & J.C. REED (1993): Investigations of antisense oligonucleotides targeted against *bcl-2* RNAs. *Antisense Res. Dev.* 3: 157-169.
- LACOUNT, D.J., S. BRUSE, K.L. HILL & J.E. DONELSON (2000): Double-stranded RNA interference in *trypanosoma brucei* using head-to-head promoters. *Mol. Biochem. Parasitol.* 111: 67-76.
- LENGERICH, H. (1923): Vergleichende Morphologie der Eleutheriden. Beiträge zur Kenntnis der Eleutheriden II. *Zool. Jahrbuch Anat.* 44: 311-388.
- LEWIN, B. (1998): Molekularbiologie der Gene. Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg.
- LEWIS, E.B. (1978): A gene complex controlling segmentation in *Drosophila melanogaster*. *Nature* 276: 565-570.
- LI, H., P.S. ZEITLER, M.T. VALERIUS, K. SMALL & S.S. POTTER (1996): *Gsh-1*, an orphan Hox gene, is required for normal pituitary development. *EMBO Journal* 15: 714-724.
- LI, Y.X., M.J. FARRELL, R. LIU, N. MOHANTY & M.L. KIRBY (2000): Double-stranded RNA injektion produces null phenotypes in zebrafish. *Developmental Biology* 217: 394-405.
- LIPARDI, C., Q. WEI & B.M. PATERSON (2001): RNAi as random degradative PCR. siRNA primers convert mRNA into dsRNA that are degraded to generate new siRNAs. *Cell* 107: 297-307.
- LOHMANN, J.U., I. ENDL & T.C.G. BOSCH (1999): Silencing of developmental genes in *Hydra*. *Developmental Biology* 214: 211-214.
- LUKE, G.N., L.F.C. CASTRO, K. MCLAY, C. BIRD, A. COULSON & P.W.H. HOLLAND (2003): Dispersal of NK homeobox gene clusters in *amphioxus* and humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100: 5292-5295.
- MALICKI, J., K. SCHUGHART & MCGINNIS W. (1990): Mouse *Hox 2.2* specific segmental identity in *Drosophila* embryos and larvae. *Cell* 63: 961-967.
- MARTENS, H., J. NOVOTNY, J. OBERSTRASS, T.L. STECK, P. POSTLETHWAIT & W. NELLEN (2002): RNAi in *Dictyostelium*: the role of RNA-directed RNA polymerases and double-stranded RNase. *Mol. Biol. Cell.* 13: 445-453.
- MARTENS, H. & W. NELLEN (2002): Epigenetisches Genesilencing: RNA Interferenz und Antisense RNA. *Biospektrum* 4/2002 - 8. Jahrgang: 351-354.
- MARTINELLI, C. & J. SPRING (2003): Distinct expression patterns of the two T-box homologues *Brachyury* and *Tbx2/3* in the placozoan *Trichoplax adhaerens*. *Development Genes and Evolution* 213: 492-499.
- MARTINELLI, C. & J. SPRING (2004): Expression pattern of the homeobox gene *Not* in the basal metazoan *Trichoplax adhaerens*. *Gene expression patterns* vol. 5, no. 5: 443-447.
- MASUDA-NAKAGAWA, L.M., H. GRÖGER, B.L. AERNE & V. SCHMID (2000): The HOX-like gene *Cnox-2-Pc* is expressed at the anterior region in all life cycle stages of the jellyfish *Podocoryne carnea*. *Development Genes and Evolution* 210: 151-156.
- MCCAFFREY, A.P., L. MEUSE, M. KARIMI, C.H. CONTAG & M.A. KAY (2003): A potent and specific morpholino antisense inhibitor of hepatitis C translation in mice. *Hepatology* 38: 503-508.

- MCGINNIS, N., M.A. KUZIORA, M. REGULSKI & W. MCGINNIS (1990):** Human *Hox-4.2* and *Drosophila Deformed* encode similar regulatory specificities in *Drosophila* embryos and larvae. *Cell* 63: 969-976.
- MCGINNIS, W., M. LEVINE, E. HAFEN, A. KURIOWA & W.J. GEHRING (1984a):** A conserved DNA sequence in homeotic genes of the *Drosophila antennapedia* and *bithorax* complex. *Nature* 308: 428-433.
- MCGINNIS, W., R.L. GARBER, J. WIRZ, A. KURIOWA & W.J. GEHRING (1984b):** A homologous protein-coding sequence in *Drosophila* homeotic genes and its conservation in other metazoans. *Cell* 37: 403-408.
- MCGINNIS, W., C.P. HART, W.J. GEHRING & F.H. RUDDLE (1984c):** Molecular cloning and chromosome mapping of a mouse DNA sequence homologous to homeotic genes of *Drosophila*. *Cell* 38: 675-680.
- MCGINNIS, W. & R. KRUMLAUF (1992):** Homeobox genes and axial patterning. *Cell* 68: 283-302.
- MILJKOVIC, M., F. MAZET & B. GALLIOT (2002):** Cnidarian and Bilaterian Promoters Can Direct GFP Expression in Transfected Hydra. *Developmental Biology* 246: 377-390.
- MINET, A., B. RUBIN, R.P. TUCKER, S. BAUMGARTNER & R. CHIQUET-EHRISMANN (1999):** Teneurin-1, a vertebrate homologue of the *Drosophila* pair-rule gene *ten-m*, is a neuronal protein with a novel type of heparin-binding domain. *Journal Cell Sci.* 112: 2019-2032.
- MINGUILLÓN, C., D.E.K. FERRIER, C. CEBRIÁN & J. GARCIA-FERNÁNDEZ (2002):** Gene duplications in the prototypical cephalochordate *amphioxus*. *Gene* 287: 121-128.
- MISQUITA, L. & B.M. PATERSON (1999):** Targeted disruption of gene function in *Drosophila* by RNA interference (RNA-i): A role for nautilus in embryonic somatic muscle formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 1451-1456.
- MOKADY, O., M.H. DICK, D. LACKSCHEWITZ, B. SCHIERWATER & L.W. BUSS (1998):** Over one-half billion years of head conservation? Expression of an *ems* class gene in *Hydractinia symbiolongicarpus* (Cnidaria: Hydrozoa). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 3673-3678.
- MONTCELLI, F.S. (1893):** *Treptoplax reptans* n. g. sp. – *Atti Accad. Lincei Rend.* (5),II:39-40.
- MONTCELLI, F.S. (1893):** Adeltotaca zoological. 2. *Treptoplax reptans* Montic.. *Mitt. Zool. Stat. Neapel* 12: 444-462.
- MONTGOMERY, M.K. & A. FIRE (1998):** Double-stranded RNA as a mediator in sequence-specific genetic silencing and co-suppression. *Trends in Genetics* 14: 255-258.
- MONTGOMERY, M.K., S. XU & A. FIRE (1998):** RNA as a target of double-stranded RNA-mediated genetic interference in *Caenorhabditis elegans*. *PNAS, USA* 95: 15502-15507.
- MORCOS, P.A. (2000):** Gene switching: analyzing a broad range of mutations using steric block antisense oligonucleotides. *Methods Enzymol.* 313:174-89.
- MORCOS, P.A. (2001):** Achieving efficient delivery of morpholino oligos in cultured cells. *Genesis* 30: 94-102.
- MÜLLER, P., N. YANZE, V. SCHMID & J. SPRING (1999):** The homeobox gene *Otx* of the jellyfish *Podocoryne carnea*: role of a head gene in striated muscle and evolution. *Developmental Biology* 216: 582-593.
- MÜLLER, W.A. & M. HASSEL (1998):** Entwicklungsbiologie der Tiere und des Menschen. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg und New York.
- MÜLLER, W.E.G. (1998):** Origin of Metazoa: sponges as living fossils. *Naturwiss.* 85: 11-25.
- MURTHA, M.T., J.F. LECKMANN & F.H. RUDDLE (1991):** Detection of homeobox genes in development and evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 10711-10715.

- NAITO, M., H. ISHIGURO, T. FUJISAWA & Y. KUROSAWA (1993): Presence of eight distinct homeobox-containing genes in cnidarians. *FEBS Letters* 333: 271-274.
- NAUMOV, D.V. (1967): Hydroids and hydromedusae of the USSR. *IPST Press*, Jerusalem.
- NECKERS, L., L. WHITESELL, A. ROSOLEN & D.A. GESELOWITZ (1992): Antisense inhibition of oncogene expression. *Crit. Rev. Oncogen.* 3: 175-231.
- NELLEMANN, C., K. ABELL, A. NORREMOLLE, T. LOKKEGAARD, B. NAVAR, C. ROPKE, J. RYGAARD, S.A. SORENSEN & L. HASHOLT (2000): Inhibition of Huntingtin synthesis by antisense oligodeoxyribonucleotides. *Mol. Cell Neuroscience.* 16: 313-323.
- NGÔ, H., C. TSCHUDI, K. GULL & E. ULLU (1998): Double-stranded RNA induces mRNA degradation in *Trypanosoma brucei*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 14687-14692.
- OATES, A.C., A.E.E. BRUCE & R.K. HO (2000): Too much interference: Injection of double-stranded RNA has nonspecific effects in the zebrafish embryo. *Developmental Biology* 224: 20-28.
- ODENWALD, W.F., C.F. TAYLOR, F.J. PALMER-HILL, V. FRIEDRICH, M. TANI & R.A. LAZZARINI (1987): Expression of a homeo domain protein in non-contact-inhibited cultured cells and postmitotic neurons. *Genes Development* 1: 482-496.
- OH, S.H., B.I. YEH & S.H. KIM (1995): Inhibition of HBV replication by antisense oligodeoxyribonucleotides in HepG2 cells transfected with a cloned HBV DNA. *Yonsei Med. J.* 36: 527-533.
- OLIVER, G., M. VISPO, A. MAILHOS, C. MARTINEZ, B. SOSA-PINEDA, W. FIELITZ & R. EHRlich (1992): Homeoboxes in flatworms. *Gene* 121: 337-342.
- PAN, T.-L., H. GRÖGER, V. SCHMID & J. SPRING (1998): A toxin homology domain in an astacin-like metalloproteinase of the jellyfish *Podocoryne carnea* with a dual role in digestion and development. *Dev. Genes Evol.* 208: 259-266.
- PARTRIDGE, M., A. VINCENT, P. MATTHEWS, J. PUMA, D. STEIN & J. SUMMERTON (1996): A simple method for delivering morpholino antisense oligos into the cytoplasm of cells. *Antisense Nuc. Acid Drug Dev.* 6: 169.
- PEARCE, V.B. (1989): Stalking the wild placozoan: Biogeography and ecology of *Trichoplax* in the pacific. *American Zoologist.* 29: 175A.
- PEARSON, B. (1991): Re: formamide/membranes for hybridisations. USENET, *Newsgroup bionet. Molbio. Methods-reagents*.
- PENNISI, E. (2000): An Integrative Science Finds a Home. *Science* vol. 287, 5453: 570-572.
- PETERSON, K.J. & D.J. EERNISSE (2001): Animal phylogeny and the ancestry of bilaterians: inferences from morphology and 18S rDNA gene sequence. *Evol. & Dev.* 3:170-205.
- PHIPPS, K.M., A. MARTINEZ, J. LU, B.A. HEINZ & G. ZHAO (2004): Small interfering RNA molecules as potential anti-human rhinovirus agents: *in vitro* potency, specificity, and mechanism. *Antiviral Res.* 61: 49-55.
- PINEDA, D., J. GONZALEZ, P. CALLAERTS, K. IKEO, W. J. GEHRING & E. SALO (2000): Searching for the prototypic eye genetic network: *Sine oculis* is essential for eye regeneration in planarians. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97 (9): 4525-4529.
- POLLARD, S.L. & P.W.H. HOLLAND (2000): Evidence for 14 homeobox gene clusters in human genome ancestry. *Current Biology* 10: 1059-1062.
- POPODI, E., J.C. KISSINGER, M.E. ANDREWS & R.A. RAFF (1996): Sea urchin genes: Insights into the ancestral Hox cluster. *Mol. Biol. Evol.* 13: 1078-1086.
- QUATREFAGES, A. (1842): Mémoire sur l'Éleutherie dichotome (*Eleutheria dichotoma* Nob.) nouveau genre de Rayonnés, voisin de hydres. *Annales des Sc. Nat. Série II* 18: 270.

- RAFF, R.A. (1996):** The shape of life. Genes, development and the evolution of animal form. University of Chicago Press, Chicago.
- RAMCHANDANI, S., A.R. MACLEOD, M. PINARD, E. VON HOFE & M. SZYF (1997):** Inhibition of tumorigenesis by a cytosine-DNA, methyltransferase, anti-sense oligodesoxynucleotide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 684-689.
- REGULSKI, M., N. MCGINNIS, R. CHADWICK & W. MCGINNIS (1987):** Developmental and molecular analysis of *Deformed*; a homeotic gene controlling *Drosophila* head development. *The EMBO Journal*, vol. 6, no. 3: 767-777.
- RONSHAUGEN, M., N. MCGINNIS & W. MCGINNIS (2002):** Hox protein mutation and macro-evolution of the insects body plan. *Nature* 415 (6874): 848-849.
- RUBIN, M.R., L.E. TOTH, M.D. PATEL, P. D'EUSTACHIO & M.C. NGUYEN-HUU (1986):** A mouse homeo box gene is expressed in spermatocytes and embryos. *Science* 233: 663-667
- RUSCH, D.B. & T.C. KAUFMAN (2000):** Regulation of *proboscipedia* in *Drosophila* by homeotic selector genes. *Genetics* 156: 183-194.
- RUSSEL, SIR F.S. (1953):** The medusae of the British isle. *Cambridge University Press*, vol. 1, XIII.
- RUTHMANN, A. (1977):** Cell differentiation, DNA content and chromosomes of *Trichoplax adhaerens* F.E. SCHULZE. *Cytobiology* 15: 58-64.
- RUTHMANN, A. & H. WENDEROTH (1975):** Der DNA-Gehalt der Zellen bei dem primitiven Metazoon *Trichoplax adhaerens* F.E. SCHULZE. *Cytobiology* 10 (3): 421-431.
- RUTHMANN, A., K.G. GRELL & G. BENWITZ (1981):** DNA content and fragmentation of the egg nucleus of *Trichoplax adhaerens*. *Z. Naturforsch.* 36c (7-8): 564-567.
- RUTHMANN, A., G. BEHRENDT & R. WAHL (1986):** The ventral epithelium of *Trichoplax adhaerens* (Placozoa): Cytoskeletal structures, cell contacts and endocytosis. *Zoomorphology* 106 (2): 115-122.
- RYAN, J.F. & J.R. FINNERTY (2003):** *CnidBase*: The cnidarian evolutionary genomics database. *Nucleic Acids Research* vol. 31, no. 1: 159-163.
- SAIKI, R.K., S.J. SCHARF, F. FABONA, K.B. MULLIS, G.T. HORN, H.A. EHRLICH & N. ARNHEIM (1985):** Enzymatic amplification of globin genomic sequences and restriction site analysis of sickle cell anemia. *Science* 230: 1350-1354.
- SAIKI, R.K., D.H. GELFANG, S. STOFFEL, S.J. SCHARF, R. HIGUCCI, G.T. HORN, K.B. MULLIS & H.A. EHRLICH (1988):** Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487-491.
- SALSER, S.J. & C. KENYON (1994):** Patterning *C. elegans*: Homeotic cluster genes, cell fates and cell migrations. *Trends in Genetics* 10:159-164.
- SAMBROOK, J., E.F. FRITSCH & T. MANIATIS (1989):** Molecular cloning: A Laboratory Manual, Second Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- SÁNCHEZ ALVARADO, A. & P.A. NEWMARK (1999):** Double-stranded RNA specifically disrupts gene expression during planarian regeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 5049-5054.
- SCHIERWATER, B. (1989a):** Experimentelle Studien zu den energetischen Kosten der Fortpflanzung bei sexuellem versus vegetativem Modus an *Eleutheria dichotoma* (Athecata, Hydrozoa) und *Stylaria lacustris* (Naididae, Oligochaeta). Dissertation, Braunschweig.
- SCHIERWATER, B. (1989b):** Allometric changes during growth and reproduction in *Eleutheria dichotoma* (Hydrozoa, Athecata) and the problem of estimating body size in a microscopic animal. *Journal of Morphology* 200: 255-267.

- SCHIERWATER, B. (1995):** Developmental genes as a potential tool in population ecology of complex life cycles? *Experientia* 51: 539-544.
- SCHIERWATER, B. & G. TRAGER. (1987):** Don't eat if Neptune is angry. *Biol. Bulletin* 173: 433.
- SCHIERWATER, B. & C. HAUENSCHILD (1990):** The position and consequences of a vegetative mode of reproduction in the life cycle of a hydromedusa and an oligochaete worm. *Advances in Invertebrate Reproduction*, vol. 5: 37-42.
- SCHIERWATER, B., M.T. MURTHA, M.H. DICK, F.H. RUDDLE & L.W. BUSS (1991):** Homeoboxes in cnidarians. *Journal of Experimental Zoology* 260: 413-416.
- SCHIERWATER, B., B. PIEKOS & W. BUSS (1992):** Hydroid stolonial contractions mediated by contractile vacuoles. *Journal of Experimental Biology* 162: 1-21.
- SCHIERWATER, B. & H. HADRYN (1998):** Environmental factors and metagenesis in the hydroid *Eleutheria dichotoma*. *Invertebrate Reproduction and Development* 34: 139-148.
- SCHIERWATER, B. & K. KUHN (1998):** Homology of Hox genes and the zootype concept in early metazoan evolution. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 9: 375-381.
- SCHIERWATER, B. & R. DESALLE (2001):** Current problems with the zootype and early evolution of Hox genes. *Journal of Experimental Zoology, (Mol. Dev. Evol.)* 291: 169-174.
- SCHIERWATER, B., S. DELLAPORTA & R. DESALLE (2002):** Is the evolution of *Cnox-2* Hox/ParaHox genes multicolored and polygenealogical? *Mol. Phyl. Evol.* 24: 374-378.
- SCHLINGENSIEPEN, R., W. BRYSCH & K.H. SCHLINGENPIEPEN (1997):** Antisense - from technologie to therapy. Blackwell Wissenschafts-Verlag GmbH, Berlin.
- SCHNEUWLY, S., R. KLEMENZ & W.J. GEHRING (1987):** Redesigning of the body plan of *Drosophila* by ectopic expression of the homeotic gene *Antennapedia*. *Nature* 325: 816-818.
- SCHUBERT, F.R., K. NIESELT-STRUWE & P. GRUSS (1993):** The antennapedia-type homeobox genes have evolved from three precursors separated early in metazoan evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 143-147.
- SCHUBOTZ, H. (1912):** Ist *Trichoplax* die umgewandelte Planula einer Hydromeduse? *Zool. Anz.* 39: 582-585.
- SCHULZE, F.E. (1883):** *Trichoplax adhaerens*, nov. gen., nov. spec. *Zool. Anz.* 6: 92-97.
- SCHULZE, F.E. (1891):** Über *Trichoplax adhaerens*. *Physik. Abh. Kgl. Akad. Wiss. Berlin*: 1-23.
- SCHUMMER, M., I. SCHEURLEN, C. SCHALLER & B. GALLIOT (1992):** HOM/Hox homeobox genes are present in *hydra* (*Chlorohydra viridissima*) and are differentially expressed during regeneration. *EMBO Journal* 11: 1815-1823.
- SCHWARZACHER, T. & P. HESLOP-HARRISON (2000):** Practical *in situ* hybridization. The bath press, bath, United Kingdom.
- SCOTT, M.P. & A.J. WEINER (1984):** Structural relationships among genes that control development: Sequence homology between the *Antennapedia*, *Ultrabithorax*, and *fushi tarazu* loci of *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 4115-4119.
- SCOTT, M.P. & P.H. O'FARRALL (1986):** Spatial programming of gene expression in early *Drosophila* embryogenesis. *Annu. Rev. Cell. Biol.* 2: 49-80.
- SCOTT, M.P. & S.B. CARROLL (1987):** The segmentation and homeotic gene network in early *Drosophila* development. *Cell* 51: 689-698.
- SCOTT, M.P., J.W. TAMKUN & G.W. HARTZELL (1989):** The structure and function of the homeodomain. *Biochemica et Biophysica Acta* 989: 25-38.
- SEIMIYA, M., H. ISHIGURO, K.MIURA, Y. WATANABE & Y. KUROSAWA (1994):** Homeobox-containing genes in the most primitive metazoa, the sponges. *European Journal of Biochemistry* 221: 219-225.

- SHANKLAND, M. & E.C. SEAVER (2000):** Evolution of the bilaterian body plan; What have we learned from annelids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 4434-4437.
- SHARMA, H.W. & R. NARAYANAN (1995):** The therapeutic potential of antisense oligonucleotides. *BioEssays*, vol. 17, no. 12: 1055-1063.
- SHENK, M.A., H.R. BODE & R.E. STEELE (1993a):** Expression of *Cnox-2*, a HOM/Hox homeobox gene in *hydra*, is correlated with axial pattern formation. *Development* 117: 657-667.
- SHENK, M.A., L. GEE, R.E. STEELE & H.R. BODE (1993b):** Expression of *Cnox-2*, a HOM/Hox gene, is suppressed during head formation in *hydra*. *Develop. Biology* 160: 108-118.
- SHIMELL, M.J., E.L. FERGUSON, S.R. CHILDS & M.B. O'CONNOR (1991):** The *Drosophila* dorsal-ventral patterning gene *tolloid* is related to human bone morphogenetic protein 1. *Cell* 67: 469-481.
- SIJEN, T., J. FLEENOR, F. SIMMER, K.L. THIJSSSEN, S. PARRISH, J.N. MOL & A. FIRE (2001):** On the role of RNA amplification in dsRNA-triggered gene silencing. *Cell* 107: 465-476.
- SIJEN, T. & R.H. PLASTERK (2003):** Transposon silencing in the *Caenorhabditis elegans* germ line by natural RNAi. *Nature* 426: 310-314.
- SLACK, J.M.W., P.W.H. HOLLAND & C.F. GRAHAM (1993):** The zootype and the phylotypic stage. *Nature* 361: 490-492.
- SMARDON, A., J.M. SPOERKE, S.C. STACEY, M.E. KLEIN, N. MACKIN & E.M. MAINE (2000):** EGO-1 is related to RNA-directed RNA polymerase and functions in germ-line development and RNA interference in *C. elegans*. *Current Biology* 10: 169-178.
- SMITH, K.M., L. GEE & H.R. BODE (2000):** HyAlx, an aristaless-related gene, is involved in tentacle formation in *hydra*. *Development* 127: 4743-4752.
- SPEARMAN, M., W.R. TAYLOR, A.H. GREENBERG & J.A. WRIGHT (1994):** Antisense-oligodeoxyribonucleotide inhibition of TGF-beta 1 gene expression and alterations in the growth and malignant properties of mouse fibrosarcoma cells. *Gene* 149: 25-29.
- SPIROV, A.V., T. BOWLER & J. REINITZ (2000):** HOX Pro: a specialized database for clusters and networks of homeobox genes. *Nucleic Acids Research*, vol. 28, no. 1: 337-340.
- SPRING, J. (2002):** Genome duplication strikes back. *Nature genetics* vol. 31: 128-129.
- STEIN, C. & J. COHEN (1989):** Phosphorothioate oligodeoxyribonucleotide analogues. In: *Oligodeoxynucleotides: Antisense inhibitors of gene expression*, (ed. J. Cohen): 97-117. London: Macmillan.
- STEIN, C.A. & Y.C. CHENG (1993):** Antisense oligonucleotides as therapeutic agents- Is the bullet really magical? *Science* 261: 1004-1012.
- STEPKOWSKI, S.M., X. QU, M.E. WANG, L.TIAN, W.CHEN, E.V. WANCEWICZ, J.F. JOHNSTON, C.F. BENNETT & B.P. MONIA (2000):** Inhibition of C-raf expression by antisense oligonucleotides extends heart allograft survival in rats. *Transplantation* 70: 656-661.
- STUART, J.J., S.J. BROWN, R.W. BEEMAN & R.E. DENELL (1991):** A deficiency of the homeotic complex of the beetle *Tribolium*. *Nature* 350: 72-74.
- SUMMERTON, J. & D. (1999):** The case for RNase-H-independent antisense oligos. *Biochimica et Biophysica Acta* 1489: 141.
- SUMMERTON, J., D. STEIN, S.B. HUANG, P. MATTHEWS, D. WELLER & M. PARTRIDGE (1997):** Morpholino and phosphorothioate antisense oligomers compared in cell-free and cell-system. *Antisense Nuc. Acid Drug Dev.* 7: 63.
- SUMMERTON, J. & D. WELLER (1997):** Morpholino antisense oligomers: design, preparation and properties. *Antisense Nuc. Acid Drug Dev.* 7: 187.

- SYED, T. & B. SCHIERWATER (2002a):** The evolution of the placozoa: A new morphological model. *Senckenbergiana lethaea* 82 (1): 315-324.
- SYED, T. & B. SCHIERWATER (2002b):** *Trichoplax adhaerens*: discovered as a missing link, forgotten as a hydrozoan, and re-discovered as a key of metazoan evolution. *Vie et Milieu/Life & Environment* 52 (4): 177-187.
- SZUCSIK, J.C., D.P. WITTE, H. LI, S.K. PIXLEY, K.M. SMALL & S.S. POTTER (1997):** Altered forebrain and hindbrain development in mice mutant for *Gsh-2* homeobox gene. *Developmental Biology* vol.191, no. 2: 230-242.
- TABARA, H., M. SARKISSIAN, W.G. KELLY, J. FLEENOR, A. GRISHOK, L. TIMMONS, A. FIRE & C.C. MELLO (1999):** The *rde-1* gene, RNA interference, and transposon silencing in *C. elegans*. *Cell* 99: 123-132.
- TALLAFUSS, A., & L. BALLY-CUIF (2002):** Formation of the head-trunk boundary in the animal body plan: an evolutionary perspective. *Gene*, in press..
- TAUTZ, D. (1994):** Evolutionary analysis of genes involved in early embryonic pattern formation in *Drosophila*. In: SCHIERWATER B., STREIT B., WAGNER G.P., DESALLE R. (Eds.) *Molecular Ecology and Evolution: Approaches and Applications*. Birkhäuser, Basel: 525-536.
- TAYLOR, M.F., J.D. PAULASKIS, D.D. WELLER & L. KOBZIK (1996):** *In vitro* efficacy of morpholino-modified antisense oligomers directed against tumor necrosis factor- α mRNA. *Journal of Biological Chemistry* vol. 271, no. 29: 17445-17452.
- THIEMANN, M. & A. RUTHMANN (1988):** *Trichoplax adhaerens* F.E. SCHULZE (Placozoa) - The formation of swarmer. *Z. Naturforsch.* 43c (11): 955-957.
- THIEMANN, M. & A. RUTHMANN (1990):** Spherical forms of *Trichoplax adhaerens*. *Zoomorphology* 110: 37-45.
- THIEMANN, M. & A. RUTHMANN (1991):** Alternative modes of asexual reproduction in *Trichoplax adhaerens* (Placozoa). *Zoomorphol.* 110 (3): 165-174.
- TIMMONS, L. & A. FIRE (1998):** Specific interference by ingested dsRNA. *Nature* 395: 854.
- TORTORA, G., R. CAPUTO, V. DAMIANO, R. BIANCO, S. PEPE, A.R. BIANCO, Z. JIANG, S. AGRAWAL & F. CIARDIELLO (1997):** Synergistic inhibition of human cancer cell growth by cytotoxic drugs and mixed backbone antisense oligonucleotide targeting protein kinase A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 12586-12591.
- TUSCHL, T., P.D. ZAMORE, R. LEHMANN, D.P. BARTEL & P.A. SHARP (1999):** Targeted mRNA degradation by double-stranded RNA in vitro. *Genes Development* 13: 3191-3197.
- UTSET, M.F., A. AWGULEWITSCH, F.H. RUDDLE & W. MCGINNIS (1987):** Region-specific expression of two mouse homeo box genes. *Science* 235: 1379-1382.
- VATTEM, K.M., K.A. STASCHKE & R.C. WEK (2001):** Mechanism of activation of the double-stranded RNA-dependent protein kinase PKR: role of dimerization and cellular localization in the stimulation of PKR phosphorylation of eukaryotic initiation factor-2 (eIF2). *European Journal of Biochemistry* 268:3674-3684.
- VERDEL, A., S. JIA, S. GERBER, T. SUGIYAMA, S. GYGI, S.I.S. GREWAL & D. MOAZED (2004):** RNAi-mediated targeting of heterochromatin by the RITS complex. *Science* 303: 672-676.
- WAGNER, R.W. (1994):** Gene inhibition using antisense oligodesoxynucleotides. *Nature* 372: 333-335.
- WAGNER, G.P. (1996):** Homology, Hox genes, and developmental integration. *American Zoology* 36: 4-13.
- WAGNER, R.W., M.D. MATTEUCCI, J.G. LEWIS, A.J. GUTIERREZ, C. MOULDS & C. FROEHLER (1993):** Antisense gene inhibition by oligonucleotides containing C-5 propyne pyrimidines. *Science* vol. 260: 1510-1513.

- WAHL, G.M., M. STERN & G.R. STARK (1979):** Efficient transfer of large DNA fragments from agarose gels to diazobenzyloxymethyl-paper and rapid hybridization by using dextran sulfate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 3683-3687.
- WANG, B.B., M.M. MÜLLER-IMMERGLÜCK, J. AUSTIN, N.T. ROBINSON, A. CHISHOLM & C. KENYON (1993):** A homeotic gene cluster patterns the anterior body axis of *Caenorhabditis elegans*. *Cell* 74: 29-42.
- WARGELIUS, A., S. ELLINGSEN & A. FJOSE (1999):** Double-stranded RNA induces specific developmental defects in zebrafish embryos. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 263: 156-161.
- WEBER, E. (1980):** Grundriss der Biologischen Statistik. Gustav Fischer Verlag, Jena.
- WEISS, B., L. ZHOU, S. ZHANG & Z. QIN (1993):** Antisense oligonucleotides inhibits *D2* dopamine receptor-mediated behavior and *D2* messenger RNA. *Neuroscience* 55: 607-612.
- WIANNY, F. & M. ZERNICKA-GOETZ (2000):** Specific interference with gene function by double-stranded RNA in early mouse development. *Nature Cell Biology* 2: 70-75.
- WILLIAMS, G.C. (1975):** *Sex and Evolution*. Princeton University Press, Princeton, New Jersey.
- WOLBERGER, C., A.K. VERSHON, B. LIU, A.D. JOHNSON & C.O. PABO (1991):** Crystal structure of a *MAT-alpha-2* homeodomain-operator complex suggests a general model for homeodomain-DNA interactions. *Cell* 67: 517-528.
- WOOLF, T.M., D.A. MELTON & C.B.G. JENNINGS (1992):** Specificity of antisense oligonucleotides in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 7305-7309.
- WU, X., V. VASISHT, D. KOSMAN, J. REINITZ & S. SMALL (2001):** Thoracic patterning by the *Drosophila* gap gene hunchback. *Dev. Biol.* 237 (1): 79-92.
- YANZE, N., H. GRÖGER, P. MÜLLER & V. SCHMID (1999):** Reversible inactivation of cell-type-specific regulatory and structural genes in migrating isolated striated muscle cells of jellyfish. *Developmental Biology* 213: 194-201.
- YANZE, N., J. SPRING, C. SCHMIDLI & V. SCHMID (2001):** Conservation of Hox/ParaHox-related genes in the early development of a cnidarian. *Developmental Biology* 236: 89-98.
- YOFFE, K.B., A.S. MANOUKIAN, E.L. WILDER, A.H. BRAND & N. PERRIMON (1995):** Evidence for engrailed-independent wingless autoregulation in *Drosophila*. *Dev. Biol.* 170 (2): 636-650.
- ZAMECNIK, P.C. & STEVENSON M.L. (1978):** Inhibition of Rous sarcoma viral RNA translation by a specific oligodeoxyribonucleotide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75:285-288.
- ZAMORE, P.D., TUSCHL, P.A. SHARP & D.P. BARTEL (2000):** RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell* 101: 25-33.
- ZHANG, J. & M. NEI (1996):** Evolution of antennapedia-class homeobox genes. *Genetics* 142: 295-303.
- ZHAO, Z., Y. CAO, M. LI & A. MENG (2001):** Double-stranded RNA injection produces nonspecific defects in zebrafish. *Developmental Biology* 229: 215-223.

7. DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater, Herrn Professor Dr. Bernd SCHIERWATER für die Überlassung des Themas, die kompetente Betreuung, die Bereitstellung der erforderlichen wissenschaftlichen Ausrüstung sowie für seine stete Diskussionsbereitschaft. Die Gewährung materieller und wissenschaftlicher Freiräume bei der Wahl verschiedenster Arbeitstechniken und Materialien sowie die großzügige Verfügung neuester Labortechniken und Arbeitsmethoden möchte ich besonders anerkennen. Die Entwicklung meiner selbständigen wissenschaftlichen Arbeitsweise wurde hierdurch in speziellem Maße gefördert.

Herrn Professor Dr. Heiner LEHMANN schulde ich Dank für die Bereitstellung seines Labors und der erforderlichen Materialien beim Anfertigen der Semi-Dünnschnitte. Frau StudRef¹ Isabell HILSCHER danke ich für die Hilfe bei der Herstellung der Präparate. Ebenso danke ich Frau StudRef¹ Isabell HILSCHER, Herrn Dr. "Hansi" FAUTER und Herrn Dr. Allen COLLINS für das kritische Korrekturlesen des Manuskripts und für die innovativen Diskussionen und Ideenbeiträge während der gesamten Studie. Frau Angie FAUST danke ich für ihr kompetentes und konstruktives Engagement sowie ihrer Hilfe beim täglichen Ringen mit Institutsproblemen aller Art. Frau Jutta BUNNENBERG, Frau Nicole BARTKOWIAK, Frau Anke BÜHRMANN und Frau Marie RUST gebührt ein dickes Dankeschön für die zuverlässige Pflege und Kultivierung der Tiere und für die Unterstützung im Labor. Herrn Dr. "Hansi" FAUTER schulde ich großen Dank für die Hilfe bei den statistischen Tests sowie bei allen Excel- und Word-Problemen. Herrn Thorsten HEINS danke ich für seinen kreativen und engagierten Beistand bei allen computertechnischen Problemen. Des Weiteren bedanke ich mich bei allen ehemaligen und aktuellen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Tierökologie und Zellbiologie für jedwede Hilfe und für die anregenden Diskussionen, die diese Studie mitgetragen haben. Nicht zuletzt danke ich Herrn Professor Dr. Stephen DELLAPORTA für die Gastfreundschaft im Zuge meines dreimonatigen Aufenthaltes in seinem Labor an der Yale-University in New Haven/USA. Insbesondere die Arbeiten am "in situ"-Protokoll wurden dort entscheidend vorangetrieben.

Finanzieller Beistand wurde mir durch ein Stipendium nach dem Graduiertenförderungsgesetz des Landes Niedersachsen (**GradFög**) und einem Aufstockungsstipendium des Deutschen Akademischen Austauschdienstes (**DAAD**) zuteil. Die Forschungsarbeiten wurden unterstützt durch das **Human Frontier Science Programm** (RGP0221/2001-M).

Im privaten Umfeld danke ich den Jungs der Hannoverschen Burschenschaft TEUTONIA für die Bereitstellung eines Zimmers und der ideellen Unterstützung in der Kellerkneipe.

Der größte Dank gebührt aber ohne Zweifel meinen Eltern, ohne deren finanzielle und geistige Unterstützung, während meiner gesamten Studien- und Promotionszeit, diese Arbeit in dieser Weise niemals hätte entstehen können. VIELEN DANK FÜR ALLES!

8. LEBENS LAUF**Persönliche Daten:**

Wolfgang JAKOB
64658 Fürth/Krumbach
Erbacherstr. 113

Geburtsdatum: 13.11.1971
Geburtsort: Heidelberg
Vater: Albert JAKOB, selbständiger Kaufmann
Mutter: Brigitte JAKOB, geb. SCHAAB, Kaufm. Angestellte
Staatsangehörigkeit: Deutsch
Familienstand: Ledig

Schulischer Werdegang:

1978-1982 Müller-Gutenbrunn Grundschule in Fürth/Odw.
1982-1992 Martin-Luther-Gymnasium in Rimbach/Odw.
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

1992-1993 Zivildienst im Katholischen Pfarramt in Fürth/Odw.

Hochschulausbildung:

08/1995 Immatrikulation an der Johann-Wolfgang-GOETHE-Universität Frankfurt am Main. Fachbereich: Biologie
09/1997 Diplom-Biologen-Vorprüfung, Note: "sehr gut"
03/1998 - 04/1998 Praktikum am Max-Planck-Institut für Biophysik in Ff./Main unter Leitung von Prof. Dr. H. MICHEL
02/2000 Diplom-Biologen-Hauptprüfung, Note: "sehr gut"
04/2000 - 01/2001 Diplomarbeit extern am Institut für Tierökologie und Zell-Biologie, Tierärztliche Hochschule Hannover, Note: "sehr gut"
06/2001 Beginn der Promotionsarbeit am Institut für Tierökologie und Zellbiologie, Tierärztliche Hochschule Hannover
09/2001 – 12/2001 Aufenthalt im Zuge der Promotionsarbeit an der Yale-Universität, Dept.of Mol.Cell & Dev.Biology (New Haven/USA) unter Leitung von Prof. Dr. S. DELLAPORTA
06/2001 – 11/2003 Stipendiat der Niedersächsischen Graduiertenförderung (GradFög)

Publikationsliste:

1. **JAKOB, W., S. SAGASSER, S. DELLAPORTA, P.W.H. HOLLAND, K. KUHN & B. SCHIERWATER (2004):** The *Trox-2* Hox/ParaHox gene of *Trichoplax* (Placozoa) marks an epithelial boundary. *Development Genes and Evolution* 214: 170-175.

Poster:

1. **JAKOB, W., C. GRIMM & B. SCHIERWATER:** Functional studies on *Cnox* genes in the hydrozoan *Eleutheria dichotoma* (Hydrozoa, Cnidaria).
2. **JAKOB, W. & B. SCHIERWATER:** Inhibition and expression studies on the *Cnox-1* Hox gene in the hydrozoan *Eleutheria dichotoma* (Hydrozoa, Cnidaria).