2 Material und Methoden

2.1 Hälterung und Zucht der Tiere

Adulte Tiere der Art *Dendrobaena veneta* (Rosa, 1886) wurden aus Angelläden bezogen und nach Wilcke (1967) und Sims & Gerard (1985) bestimmt. Für die Zucht von *D. veneta* wurden etwa 100 Tiere in einen zur Hälfte mit feuchter Blumenerde gefüllten Plastikeimer eingesetzt, der mit Gaze verschlossen wurde. Die Tiere wurden einmal pro Woche mit gefrorenem Spinat und Haferflocken gefüttert. Für die Probennahme wurden von dieser Stammzucht 40 geschlechtsreife Tiere entnommen und auf zwei zu einem Viertel mit Erde befüllte Plastikeimer aufgeteilt. Die beiden Eimer wurden anschließend über einen Zeitraum von 40 Tagen täglich auf Kokons untersucht und die gefundenen Kokons entnommen und mit feuchter Erde bedeckt in Petrischalen bis zur Präparation gelagert. Die Zucht und Lagerung der Kokons fand bei 15° C statt.

Für die Zucht von Tubificiden wurden Tiere aus dem Teltowkanal bei Berlin und aus Zoohandlungen beschafft. Die Tiere wurden in einem Aquarium mit sterilisiertem Sand vom Probenort am Teltowkanal gehalten. Um eine Anreicherung von Stickstoffverbindungen aus Nahrungsabfällen und Kot im Auqarium zu vermeiden, wurde das Wasser wöchentlich gewechselt und der Sand mit einem Wasserstrahl durchgespült. Aufschwimmende Kokons wurden aus dem Spülwasser filtriert und in das Aquarium zurückgesetzt.

Tubificiden treten in der Regel in Lebensgemeinschaften verschiedener Arten und Gattungen auf (Wachs 1967b). Sowohl in den Proben aus dem Teltowkanal als auch in den gekauften Tubificidenproben traten die *Tubifex*-Arten *T. tubifex* (Müller, 1774) und *T. ignotus* (Stolc, 1886) sowie *Limnodrilus hoffmeisteri* Claparéde, 1862, *L. udekemianus* Claparéde, 1862 und *L. claparedeianus* Ratzel, 1868 auf. Die Bestimmung der Arten wurde nach Wachs (1967a) und Brinkhurst (1971) durchgeführt. Die Arten der beiden Gattungen ließen sich nur unter dem Lichtmikroskop eindeutig identifizieren, so dass für den Ansatz einer Zucht keine ausreichende Anzahl an Tieren durchbestimmt werden konnte. Deshalb wurden Zuchten mit nach Gattungen sortierten Tieren angesetzt. Die Tiere wurden in Glasschälchen mit einem Durchmesser von 5 cm, deren Boden mit etwa 2 cm Sediment gefüllt war, gehältert. Im Abstand von zwei Tagen wurde das Sediment auf Kokons untersucht und die gefundenen Kokons in weiteren Glasschälchen mit wenigen Millimetern Sediment untergebracht. Alle Gefäße wurden über eine Umwälzpumpe und ein Schlauchsystem mit fließendem Wasser aus einem Vorratsbehälter versorgt.

2.2 Konfokale Laserscanmikroskopie (CLSM)

Für die Antikörpermarkierung der transitorischen Nephridien wurden Embryonen und Entwicklungsstadien von *D. veneta* aus Kokons mit einem Alter von 1 bis 30 Tagen nach

der Kokonablage präpariert. Die äußere Form und Größe der Embryonen wurde fotografisch unter dem Binokular dokumentiert. Entsprechend der unterschiedlichen Entwicklungsgeschwindigkeiten und -phasen wurden Altersstufen zwischen dem 5. und 16. Tag im Abstand von einem Tag ausgesucht, während für den Zeitraum vom 16. bis zum 30. Tag eine Altersabstufung von 3 Tagen gewählt wurde. Von *Tubifex* sp. wurden Entwicklungsstadien der Stadien 14 bis 19 entsprechend der Staging-Tabelle von Shimizu (1982) für die Antikörpermarkierung ausgesucht.

Zur Präparation wurden die Kokons mit Leitungswasser abgespült und in eine mit Leitungswasser gefüllte Petrischale gelegt. Mit einer Augenschere wurden die Kokons aufgeschnitten und die herauspräparierten Entwicklungsstadien nach dem Fotografieren sofort in Fixativ überführt.

Die Fluoreszenzmarkierung der transitorischen Nephridien wurde mit Antikörpern gegen acetyliertes α-Tubulin durchgeführt, an die ein sekundärer, mit dem Fluoreszenzfarbstoff gelabelter, Antikörper gebunden wurde. Zusätzlich wurde eine Färbung mit fluoreszenzmarkiertem Phalloidin durchgeführt, um die Lage und Morphologie der Muskulatur als Referenzsystem für die Lageeinordnung zu nutzen.

Zur Fixierung wurde auf Eis gekühltes, frisch angesetztes 4% Paraformalaldehyd in 0,01 M Phosphatpuffer pH 7,2 (PB) verwendet. Die Proben wurden 12 Stunden bei 4° C fixiert. Danach wurde das Fixativ über einen Zeitraum von 6 Stunden dreimal mit 0,01 M PB ausgewaschen und nach dem dritten Auswaschen auf Raumtemperatur gebracht. Anschließend wurden die Tiere für 2 Stunden in einer Präinkubationslösung aus 50 ml 0,01 M PB, 125 mg BSA und 50 µl Triton gelagert. Für die Inkubation mit dem ersten Antikörper wurde der Antikörper T6793 (Sigma, monoclonal anti acetylated α-tubulin mouse) im Verhältnis 1:200 mit 0,01 M PB gemischt. Die Inkubation fand über Nacht (12 h) bei Raumtemperatur statt. Die Antikörper wurden dreimal im Abstand von jeweils 2 Stunden mit 0,01 M PB ausgewaschen. Anschließend wurde eine zweistündige Präinkubation in einer Lösung aus 50 ml 0,01 M PB und 50 µl Triton durchgeführt. Für die sekundäre Markierung wurde ein mit dem Farbstoff ALEXA 568 markierter goat anti mouse IgG Antikörper (Molecular Probes A 11004) im Verhältnis 1:500 mit 0,01 M PB gemischt. Die Proben wurden für 12 Stunden mit dem sekundären Antikörper inkubiert und anschließend dreimal mit 0,01 M PB im Abstand von 30 min ausgewaschen. Die markierten Proben wurden mit Citifluor CFPVOH eingedeckelt und bis zur Untersuchung bei Raumtemperatur unter Lichtabschluß aufbewahrt.

Für die Doppelmarkierung der transitorischen Nephridien und der Muskulatur wurden Stadien der Entwicklungstage 5 bis 16 von *D. veneta* entsprechend dem vorhergehenden Protokoll präpariert, als sekundärer Antikörper für die Tubulinmarkierung wurden jedoch FITC-gelabelte goat anti mouse IgG Antikörper (Sigma F-0257) im Verhältnis 1:500 verwendet. Nach dem Auswaschen des sekundären Antikörpers wurden die Proben mit TRITC-gelabeltem Phalloidin (Sigma P1951), mit einer Konzentration von 1:100 in

0,01 M PB für 30 min inkubiert. Anschließend wurden sie mit 0,01M PB ausgewaschen. Das Auswaschen wurde jeweils nach 10 und 30 min wiederholt. Die Proben wurden mit Citifluor CFPVOH eingedeckelt.

Die Präparate wurden an einem Zeiss LSM 410 und einem Leica TCS SPE Laserscanmikroskop untersucht. Aus den fotografierten Bilderstapeln wurden mit den Software-Paketen ImageJ und Voxx2 Projektionen und Volume-Renderings erstellt.

2.3 Rasterelektronenmikroskopie (REM)

Für die Rasterelektronenmikroskopie wurden Entwicklungsstadien von *D. veneta* in 2,5 % Glutaraldehyd in 0,01M PB (pH 7,2) für eine Stunde bei 4° C fixiert. Das Fixativ wurde anschließend mit dem Phosphatpuffer in mehreren Waschschritten ausgewaschen, wobei der Puffer nach 10 min, 60 min, 4 h und 24 h jeweils dreimal ersetzt wurde. Die Nachfixierung fand mit 1 %igem OsO_4 in 0,01 M PB über 40 min statt. Danach wurden die Proben über eine aufsteigende Acetonreihe in reines Aceton überführt, das anschließend durch 100 %igen Ethanol ersetzt wurde. Die Proben wurden mit einem Balzer CPD 030 Critical Point Dryer mit CO_2 getrocknet und mit einem Balzer Union SCD Sputter Coater mit Gold beschichtet. Zur Analyse der Präparate stand ein FEI Quanta 200 Rasterelektronenmikroskop zur Verfügung.

2.4 Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)

D. veneta Von *D. veneta* wurden Entwicklungsstadien des 5. bis 16. Tages nach der Kokonablage mit 2,5 % Glutaraldehyd in 0,01 M PB (pH 7,2) bei 4° C für 60 min fixiert. Anschließend wurde das Fixativ mit 0,01 M PB ausgewaschen und der 0,01 M PB nach 10 min, 60 min, 4 h und 24 h wiederholt ausgetauscht. Die Nachfixierung der Proben fand mit 1 %igen OsO_4 in 0,01 M PB bei 4° C statt. Danach wurden die Proben in einer aufsteigenden Acetonreihe in reines Aceton überführt. Als letzte Schritte der Acetonreihe wurde getrocknetes 100 %iges Aceton verwendet, in dem die Proben dreimal jeweils für 15 min verblieben. Anschließend wurden die Präparate über eine Aceton-Propylenoxid-Lösung im Verhältnis 1:1 in reines Propylenoxid überführt. Für die Infiltration und Einbettung der Proben wurde Araldit M mit BDMA als Polymerisationsstarter im Verhältnis Araldit M : Araldit Härter : BDMA = 10 : 10 : 0,6 benutzt. Das Araldit wurde über 7 Tage bei 60° C ausgehärtet.

Von einem 6 und einem 10 Tage alten Entwicklungsstadium wurden mit Reichert Ultracut S und Leica EM UC6 Mikrotomen Serien von Ultradünschnitten mit einer silbergrauen Interferenz (Schnittdicke ca. 60 - 70 nm) angefertigt. Die Schnitte wurden auf mit Formvar befilmten Single Slot Grids aufgefangen und mit einem Phoenix-Kontrastierer

(Prototyp FU Berlin) bei Raumtemperatur 30 min in 2 % Uranylacetat und 20 min in Bleicitrat nach Reynolds (1963) kontrastiert.

***Tubifex* sp.** Von *Tubifex* sp. wurden Entwicklungsstadien des 3. bis 11. Tages fixiert. Als Fixativ wurde 4° C kaltes 2,5 %iges Glutaraldehyd in 0,01 M PB (pH 7,2) verwendet. Nach 120 min wurde das Fixativ mit 0,01 M PB ausgewaschen. Anschließend wurden die Proben im Abstand von 10 min, 60 min und 24 h weiteren Waschschritten unterzogen. Zur Nachfixierung wurden die Proben für 10 min in eine 1 %ige Lösung von OsO_4 in 0,01 M PB gebracht. Die Präparate wurden entsprechend der Präparation von *D. veneta* in Araldit überführt und eingebettet. Von einem Stadium 15 (nach Shimizu 1982) wurden Ultradünnschnitte angefertigt, die auf Formvar-befilmte Single Slot Grids aufgenommen wurden. Vor der Kontrastierung wurden die Schnitte mit OsO_4 nachfixiert. Dazu wurden die Schnitte in eine Grid Staining Plate (nach Hiraoka, EMS Science Services) eingesteckt und jeweils ein Tropfen 1 %iger OsO_4 Lösung in H_2O auf die befilmte Seite der Grids gegeben. Die Lösung wurde nach 10 min mit einer Pipette abgezogen und durch einen Tropfen H_2O ersetzt. Danach wurde die Grid Staining Plate mehrfach in ein Becherglas mit H_2O getaucht und die Grids anschließend mit Filterpapier getrocknet. Anschließend wurden die Schnitte entsprechend den Präparaten von *D. veneta* mit Uranylacetat und Bleicitrat kontrastiert.

Alle Schnittserien wurden mit einem Philips CM120 Biotwin Elektronenmikroskop untersucht. Die fotografischen Aufnahmen erfolgten auf Ditabis Imaging Plates, die mit einem Ditabis Micron IP Scanner digital ausgelesen wurden.

2.5 3D Rekonstruktionen aus TEM Schnittserien

Für die 3D Rekonstruktionen wurden die Bildserien mit der Software[1] Adobe Photoshop und IMOD aligniert und die Umrisse der Zellen und Kerne sowie weiterer Strukturen in Adobe Illustrator nachgezeichnet. Von den Nephridien der untersuchten Stadien von *D. veneta* und *Tubifex* sp. wurden 3D-Modelle entweder mit dem Programmpaket IMOD oder dem Modelling-Programm Blender erstellt. Zum Import der Konturdaten in Blender und zur Erstellung des 3D Oberflächengitters wurde das Skript MorphMesh verwendet. Die Rekonstruktionen wurden als Grundlage für Schnitt- und Projektionszeichnungen genommen. Als Kontrolle wurde die Rekonstruktion eines Nephridiums von *D. veneta* zusätzlich von Hand durch Ausmessen der elektronenmikroskopischen Fotografien durchgeführt.

[1] Eine Liste der verwendeten Software befindet sich im Anhang, S. 83