

Konservierte und divergente Aspekte der *twist*-, *snail*- und *concertina*-
Funktion im Käfer *Tribolium castaneum*

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität zu Köln

vorgelegt von

Cornelia von Levetzow

aus Lauchhammer

Köln, 2008

Berichtersteller:

Herr Professor Dr. Siegfried Roth

Frau Professor Dr. Maria Leptin

Tag der mündlichen Prüfung:

02. Juni 2008

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Die Embryonalentwicklung von <i>Drosophila</i> und <i>Tribolium</i> im Vergleich	2
1.2. Die dorsoventrale Musterbildung von <i>Drosophila</i> und <i>Tribolium</i> im Vergleich	4
1.3. Konservierte und divergente Aspekte von <i>Tw</i> und <i>Sna</i>	9
1.4. Die Mesoderminvagination von <i>Drosophila</i> und <i>Tribolium</i> im Vergleich	13
1.5. Die genetische Kontrolle der Ventralfurchenbildung bei <i>Drosophila</i>	16
1.6. Zielsetzung	18
2. Material und Methoden	19
2.1. Lösungen und Chemikalien	19
2.2. Molekularbiologische Arbeiten	21
2.2.1. Klonierungen und benutzte Marker Gene	21
2.2.2. DNA-Isolierung	21
2.2.3. DNA-Sequenzierung	21
2.2.4. Transformation elektrokompenter Zellen	22
2.2.5. Nachweis positiver Klone	22
2.2.6. Synthetisierung von doppelsträngiger RNA und <i>in situ</i> Sonden	22
2.3. Embryologische Arbeiten	23
2.3.1. Tierhaltung	23
2.3.2. Fixierung von Embryonen	23
2.3.3. RNAi Arbeiten	23
2.3.4. <i>In situ</i> Hybridisierung und Immunohistochemie	25
2.3.5. Kutikulapräparation	25
2.3.6. Konfokalmikroskopie	26
2.3.7. Einbetten der Embryonen in Araldit	26
3. Ergebnisse	27
3.1. Funktionelle Analysen des <i>twist</i> - und <i>snail</i> - RNAi-Phänotyps bei <i>Tribolium</i>	27
3.1.1. Die gegenseitige Regulation von <i>twi</i> und <i>sna</i> bei <i>Tribolium</i>	29
3.1.2. Die Morphologie von <i>twi</i> - und <i>sna</i> - RNAi-Embryonen	32
3.1.3. Das Mesoderm in <i>twi</i> - und <i>sna</i> - RNAi-Embryonen	36

3.1.4. Die Auswirkungen des <i>twi</i> - bzw. <i>sna</i> -Verlustes	
auf lateral ektodermal exprimierte Gene	39
3.1.4.1. <i>Tc-sim</i> in <i>twi</i> - und <i>sna</i> -RNAi-Embryonen	39
3.1.4.2. <i>Tc-Delta</i> in <i>twi</i> - und <i>sna</i> -RNAi-Embryonen	42
3.1.4.3. <i>Tc-rhomboid</i> und <i>Tc-EGFR</i> in <i>twi</i> - und <i>sna</i> -RNAi-Embryonen	44
3.1.4.4. <i>Tc-vnd</i> in <i>twi</i> - und <i>sna</i> -RNAi-Embryonen	46
3.1.4.5. Die Entwicklung des Nervensystems in <i>twi</i> - und <i>sna</i> -RNAi-Embryonen	48
3.1.4.6. <i>Tc-sog</i> in <i>twi</i> -RNAi-Embryonen	49
3.3.4.7. <i>Tc-cactus</i> und Tc-Dorsal in <i>twi</i> -RNAi Embryonen	50
3.2. Analyse des <i>twi+sog</i> RNAi-Phänotyps	53
3.2.1. <i>Tc-pannier</i> in <i>twi+sog</i> -RNAi-Embryonen	54
3.2.2. <i>Tc-sna</i> in <i>twi+sog</i> -RNAi-Embryonen	54
3.2.3. <i>Tc-sim</i> in <i>twi+sog</i> -RNAi-Embryonen	55
3.3. Die Funktion von <i>concertina (cta)</i> bei <i>Tribolium</i>	57
3.3.1. Die Morphologie von <i>cta</i> -RNAi-Embryonen	58
3.3.2. Expressionsstudien verschiedener Markergene in <i>cta</i> -RNAi-Embryonen	62
3.3.2.1. <i>Tc-twi</i> Expression in <i>cta</i> -RNAi-Embryonen	62
3.3.2.2. <i>Tc-pnr</i> und <i>Tc-iro</i> in <i>cta</i> -RNAi-Embryonen	65
3.3.2.3. <i>Tc-zerknüllt</i> in <i>cta</i> -RNAi-Embryonen	68
4. Diskussion	69
4.1. Die Funktionen von <i>Tc-twi</i> und <i>Tc-sna</i> während der Mesoderminternalisierung	69
4.2. Konsequenzen eines <i>Tc-twi</i> - bzw. <i>Tc-sna</i> -Verlustes auf die Musterbildung entlang der DV-Achse	72
4.2.1. <i>Tc-twi</i> ist für die Terminierung der Tc-Dorsal-Kernaufnahme verantwortlich	72
4.2.2. Tc-Sna als potentieller Aktivator	73

4.2.3. Der Notch/Delta-Signalweges könnte die Positionierungs- bzw. Aktivierungsprozesse in der DV-Musterbildung von <i>Tribolium</i> beeinflussen	75
4.2.4. Unterschiede im EGF-Signalsystem zwischen <i>Drosophila</i> und <i>Tribolium</i>	77
4.2.5. Der Sog/Dpp-Signalweg bei <i>Tribolium</i> ist unabhängiger von Tc-Dorsal als bei <i>Drosophila</i>	78
4.2.6. Die Entwicklung des Nervensystems bei <i>Tribolium</i> erfolgt unabhängig vom Mesoderm	80
4.3. Ein Modell zur Twi- und Sna-Funktion bei <i>Tribolium</i>	81
4.4. Die Funktion von Concertina bei <i>Tribolium</i>	83
5. Zusammenfassung/Abstract	85
6. Literaturverzeichnis	87
7. Allgemeine Abkürzungen	97
Danksagung	98
Erklärung	99
Lebenslauf	100

1. Einleitung

Morphologische Veränderungen und das Auftreten neuer Funktionen führten zur Evolution komplexer Organismen. Evolution findet häufig aufgrund von Modifikationen in den Interaktionen von entwicklungssteuernden Genen statt. Es ist daher nicht immer möglich, Rückschlüsse über den Ursprung morphologischer Veränderungen durch den Vergleich von Körperbauplänen verschiedener Organismen zu gewinnen. Vielmehr ist es notwendig die Evolution von Entwicklungsprozessen zu verstehen.

Durch die großen Fortschritte im Bereich der Entwicklungsgenetik und die daraus resultierende Verbindung der beiden Disziplinen Evolution und Entwicklungsbiologie war ein Fundament geschaffen, die genetische Kontrolle der Entwicklung zu untersuchen und somit Änderungen in Struktur und Funktion des Körperbauplans durch entwicklungsbiologische Evolution zu erklären.

Der Vergleich regulatorischer Mechanismen auf genetischer Ebene ermöglicht, spezifische Änderungen, welche zu Unterschieden in Morphogenese und Musterinformation führen, zu untersuchen. Dabei zeigt sich, dass regulatorische Gene und ihre Funktion in der Entwicklung häufig zwischen weit entfernten Spezies konserviert sind. Dies wirft jedoch die Frage auf, wie Organismen mit annähernd gleichen Genen so unterschiedlich sein können.

Um die Variation in Entwicklungsvorgängen zu studieren, ist es von Bedeutung, phylogenetisch nahe stehende Spezies zu betrachten. Vergleichende Studien der Insektenentwicklung bilden aufgrund der detaillierten Kenntnisse des regulatorischen Netzwerkes der frühen Achsenbildung in der höheren Diptere *Drosophila melanogaster* (*Dm*) einen guten Ansatzpunkt. Um Fragestellungen wie z.B. nach Abwandlungen im Mechanismus der dorsoventralen Musterbildung auf dem Weg zu höheren Dipteren zu bearbeiten, hat sich der Mehlkäfer *Tribolium castaneum* (*Tc*), dessen Entwicklung sich vor 284 bis 275 Millionen Jahren von *Drosophila* trennte (Savard et al., 2006), als neuer Modellorganismus bewährt.

Tribolium bietet dabei die Vorzüge einer leichten Haltung und einer kurzen Generationszeit. Des Weiteren stehen molekulare und entwicklungsbiologische Techniken, wie z.B. parentale RNAi (Bucher et al., 2002) und Keimbahntransformation (Berghammer et al., 1999) sowie die *Tribolium*-Genom-Sequenz (Richards et al. 2008) zur Verfügung.

Tribolium gehört, wie auch *Drosophila*, zu den holometabolen Insekten, vollzieht also eine komplette Metarmorphose. Allerdings verläuft seine Embryogenese nach dem Kurz- bzw. Intermediärtypus (Tautz 2002), welcher eigentlich für hemimetabole Insekten, die die Gruppe der „primitiveren Insekten“ repräsentieren, typisch ist. Somit ist *Tribolium* ontogenetisch der

basaleren Entwicklungsart zuzuordnen, die eher dem Grundtypus der Insektenentwicklung entspricht (Sander 1975).

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit vergleichenden Betrachtungen der dorsoventralen Musterbildung von *Drosophila* und *Tribolium*, wobei das Hauptaugenmerk auf die Mesodermbildung, die ihr zugrunde liegenden genetischen Faktoren und ihren Einfluss auf die weitere dorsoventrale Musterbildung gelegt wird.

1.1. Die Embryonalentwicklung von *Drosophila* und *Tribolium* im Vergleich

Der größte sichtbare Unterschied zwischen den Embryonen verschiedener Insektenordnungen besteht in der Art der Keimstreiformung. Die Klassifikation in Kurzkeim- und Langkeiminsekten unterscheidet, ob die Keimanlagen nach dem Blastodermstadium einen sekundären Wachstumsprozess durchlaufen oder nicht.

Bei Langkeiminsekten, wie den *Dipteren*, zu denen auch *Drosophila* gehört, werden alle Segmente bereits im synzytialen Blastoderm vor der Zellularisierung angelegt (Abb.1.1). Dies bedeutet, dass Transkriptionsfaktoren frei diffundieren können und so eine Gradientenbildung in dieser nicht-zellularisierten Umgebung möglich ist. In Intermediär- und Kurzkeiminsekten werden stattdessen nur Kopf- und thorakale Segmente im Blastoderm angelegt, wohingegen die posterioren Segmente sukzessiv durch sekundäre Wachstumsprozesse entstehen (Sommer und Tautz 1993; Patel et al., 1994) (Abb.1.1).

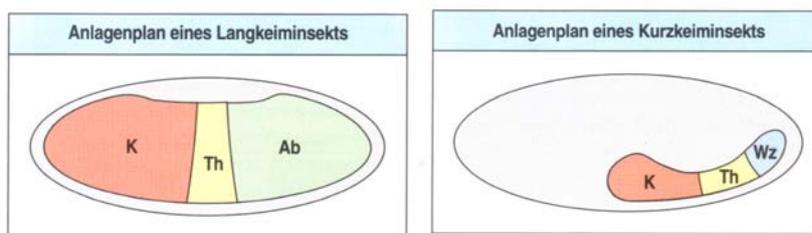


Abb.1.1:
Die unterschiedlichen Anlagepläne von Langkeiminsekten, wie *Drosophila*, und Kurzkeiminsekten, wie *Tribolium*.
(Abb. nach Wolpert, Entwicklungsbiologie, 1999)

Die Tatsache, dass beim Käfer (Coleoptera) *Tribolium* der größte Anteil der Musterbildung in der zellularisierten Umgebung der posterior angelegten Wachstumszone stattfindet, führt zu der Frage, wie die Steuerung der Musterbildung hier erfolgt.

Kurzkeim- und Langkeiminsekten entwickeln sich unterschiedlich schnell. Während *Drosophila* innerhalb eines Tages die komplette Embryogenese durchläuft, benötigt *Tribolium* circa vier Tage dafür (Handel et al., 2000). Das bedeutet, dass die

Embryonalentwicklung bei *Drosophila* und die damit verbundenen morphogenetischen Bewegungen eine hohe Präzision und Koordination erfordern (Handel et al., 2005).

Ein weiterer Unterschied zwischen der Embryonalentwicklung von *Drosophila* und *Tribolium* besteht in der Verteilung von embryonalem Gewebe und Hüllgewebe. Während bei *Drosophila* nur ein sehr kleiner dorsaler Teil des Embryos extra-embryonales Gewebe bildet (die Amnioserosa) (Campos-Ortega und Hartenstein, 1997), bildet ein sehr großer Anteil der anteriordorsalen Zellen im *Tribolium*-Ei die so genannte Serosa (Handel et al., 2000). Aus der posteriorventralen Region des *Tribolium*-Eies entwickeln sich das Amnion und der eigentliche Embryo (Handel et al., 2000). Dies ist der erste Differenzierungsschritt im *Tribolium*-Embryo, welcher als differenziertes Blastoderm bezeichnet (Abb.1.2B). Die Existenz der zwei extraembryonalen Hüllen Serosa und Amnion ist wichtig für das Verständnis der späteren morphogenetischen Bewegungen während der Embryonalentwicklung von *Tribolium* (Handel et al., 2000).

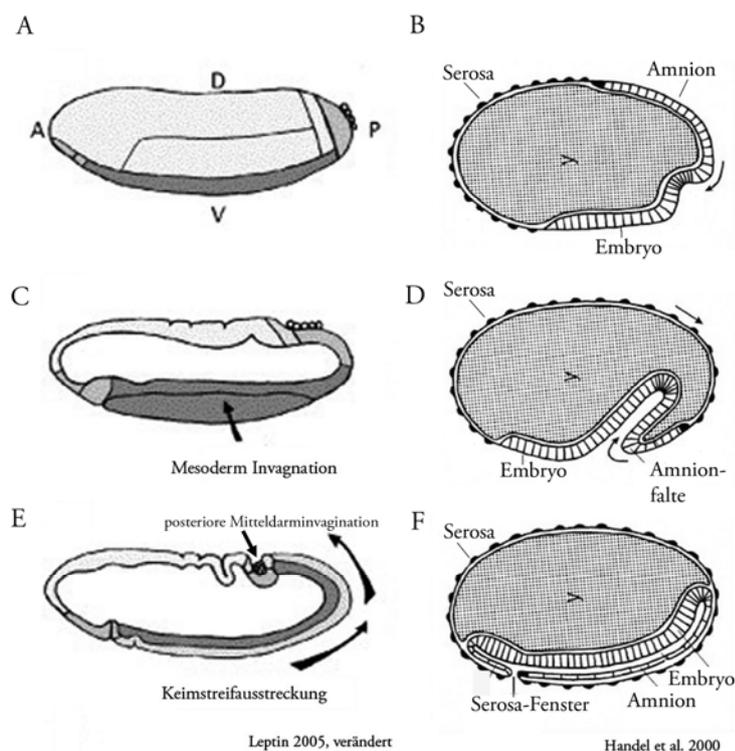


Abb.1.2:

Vergleich der Embryoanlage und der Gastrulationsbewegungen von *Drosophila* und *Tribolium* (die gegenüberliegenden Schemata entsprechen nicht direkt vergleichbaren Stadien, sondern sollen nur die Unterschiede verdeutlichen)

Während bei *Drosophila* (links) der Embryo das gesamte Ei ausfüllt (A), bildet sich der *Tribolium*-Embryo posteriorventral (B). Dabei bewegen sich die extraembryonalen Membranen Amnion und Serosa über den Embryo (D).

Bei *Drosophila* kommt es fast zeitgleich zur Mesoderm- und posterioren Mitteldarminvagination (C,E). Im *Tribolium*-Embryo bildet die Serosa eine kontinuierliche äußere Hülle (F). Das Amnion bedeckt den Embryo ventral (F).

Im Verlauf der Gastrulation bewegen sich Serosa und Amnion über das posteriore Ende des *Tribolium*-Embryos, wodurch die posteriore Amnionfalte gebildet wird (Abb.1.2D). In einem weniger starken Ausmaß erfolgt dies auch anterior, wodurch die anteriore Amnionfalte entsteht. Die ventralen Kuppen der Amnionfalten bilden das Serosafenster, welches sich bald

darauf schließt, wodurch eine kontinuierliche äußere Hülle, die Serosa, und eine innere, ventrale Hülle, das Amnion, entstanden sind (Abb.1.2F).

1.2. Die dorsoventrale Musterbildung von *Drosophila* und *Tribolium* im Vergleich

Bei *Drosophila* wird die Dorsoventralpolarität durch eine komplexe Kaskade, an der hauptsächlich maternale Gene beteiligt sind im Perivitellinspalt, außerhalb des Eies etabliert und über den Toll-Signalweg in den Embryo übermittelt (Govind 1999; Moussian und Roth 2005). Die ausschließlich ventrale Aktivierung des ubiquitär in den Membranen des Blastodermembryos vorkommenden Toll-Rezeptors durch seinen Liganden Spätzle (Morisato und Anderson 1994; DeLotto et al., 2001) führt zum Kern-Import von Dorsal (Roth et al., 1989; Stein et al., 1991). Dorsal gehört zur rel/NF- κ B-Familie von Transkriptionsfaktoren (TF) und ist vor der Toll-Aktivierung gebunden an Cactus, einem I κ B-Homolog, gleichmäßig im Zytoplasma des Embryos verteilt (Belvin und Anderson 1996; Bergmann et al., 1996). Durch den aktivierten Toll-Rezeptor kommt es zur Weiterleitung des Signals über Pelle und Tube, was zur Phosphorylierung von Cactus führt (Belvin et al., 1995). Hieraus resultiert der Abbau von Cactus, die Komplexbildung mit Dorsal geht verloren, und Dorsal kann in die Zellkerne gelangen (Abb.1.3) (Belvin und Anderson 1996; Bergmann et al., 1996). Da die Aktivierung des Toll-Rezeptors graduell von ventral nach dorsal abnimmt, entstehen unterschiedliche Konzentrationen von Dorsal in den Zellkernen (Rusch und Levine 1994). Als Resultat ist Dorsal im dorsalen Bereich des Embryos ausschließlich im Zytoplasma vorhanden, während in ventralen Kernen die höchsten Dorsal-Konzentrationen vorliegen (Roth et al., 1989; Rushlow et al., 1989; Steward 1989).

Dieser Kerngradient des Dorsal-TF unterteilt den Embryo entlang der dorsoventralen (DV) Achse. Abhängig von den unterschiedlichen Dorsal-Kernkonzentrationen und dessen spezifischer kombinatorischer Bindung mit anderen TF an regulatorische Regionen, kommt es zur Aktivierung bzw. Reprimierung zygotischer Gene, die das Schicksal der Zellen, in denen sie exprimiert werden, festlegen (Abb.1.4). Dadurch wird die Differenzierung zum Mesoderm, Neuroektoderm und dorsalen Ektoderm initiiert (Roth et al., 1989; Roth und Schupbach 1994; Stathopoulos und Levine 2002).

Die Zielgene von Dorsal wurden aufgrund der Charakterisierung ihrer regulatorischen Regionen, die für die konzentrationsabhängige Antwort auf den Dorsal-Gradienten verantwortlich sind, in drei Klassen eingeteilt (Stathopoulos und Levine, 2002).

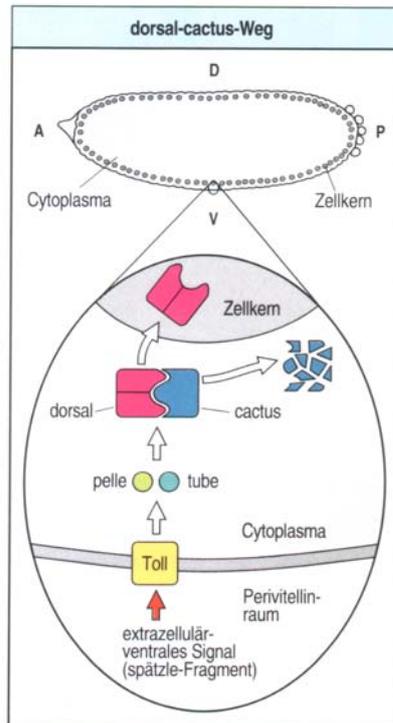


Abb.1.3: Mechanismus, welcher zum Kerntransport von Dorsal führt

Die Aktivierung von Toll auf der ventralen Seite des Eies führt zum Abbau des Cactus-Proteins, wodurch Dorsal in die ventralen Blastodermkerne gelangen kann, während es dorsal im Zytoplasma verbleibt.

(Abb. nach Wolpert, Entwicklungsbiologie, Spektrum 1999)

In den ventralen Regionen kommt es zum Einen zur Aktivierung des Typ-I-Dorsal Zielgenes *twist* (*twi*), dessen Produkt, ein „basic Helix-Loop-Helix“ (bHLH)-Transkriptionsfaktor, ein Aktivator für mesodermale Gene - inklusive *twi* selbst - ist (Thisse et al., 1987). Zum Anderen kommt es zur Aktivierung von *snail* (*sna*) (ebenfalls ein Typ-I-Dorsal Zielgen), welches für die Aufrechterhaltung der mesodermalen Grenzen zuständig ist (Leptin 1991). *Sna* ist ein TF der Zinkfingerklasse und hauptsächlich für die Reprimierung ventrolateral exprimierter Gene im Mesoderm zuständig (Kosman et al., 1991; Leptin 1991; Hemavathy et al., 1997). *Twi* und *sna* können nur in der ventralen Regionen exprimiert werden, da ihre regulatorischen Regionen nur niederaffine Dorsal-Bindestellen aufweisen (Jiang et al., 1991; Pan et al., 1991). *Sna* wird außerdem von *Twi* aktiviert, was zum Einen durch funktionelle Analysen von *twi*-Mutanten (Leptin 1991) und zum Anderen durch Bindestellen für bHLH-Transkriptionsfaktoren im *Sna*-Promotor nachgewiesen wurde (Ip et al., 1992; Ip et al., 1992; Kasai et al., 1992). Im Fall von *sna* führt diese kooperative Aktivierung von Dorsal und *Twi* zu einer scharfen Grenze der *sna*-Expression zum benachbarten Mesektoderm, wohingegen die *twi*-Expression graduell abnimmt und sich bis in das Ektoderm erstreckt (Leptin 1991).

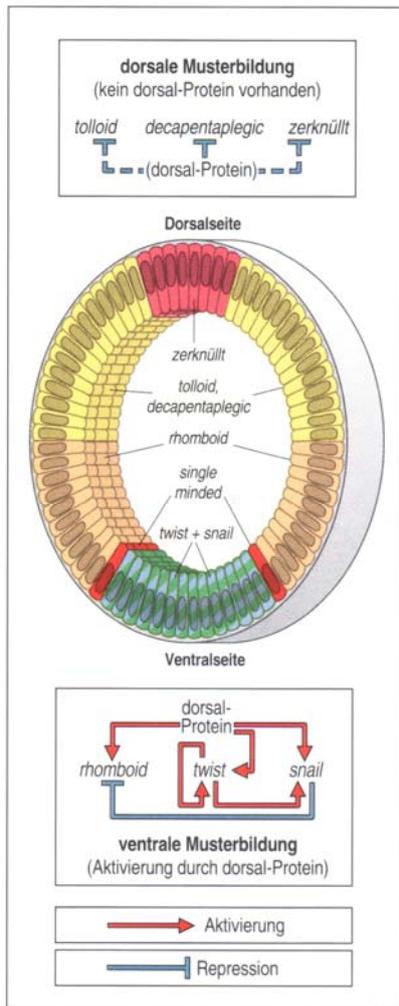


Abb.1.4: Querschnitt eines *Drosophila*-Embryos im Blastodermstadium, und die Genregulationskaskade, die aufgrund des etablierten Dorsal-Gradienten zur Musterbildung im Embryo führt;

Ventral (blau/grün): Mesoderm
 Ventral (rot): Mesektoderm
 Lateral (orange): Neuroektoderm
 Lateral (gelb): Dorsales Ektoderm
 Dorsal (rot): Amnioserosa

(Abb. nach Wolpert, Entwicklungsbiologie, Spektrum, 1999)

Die Aktivierung des Selektorgens *single minded* (*sim*) (Typ-II-Dorsal-Zielgen) in einer einzelnen Zelllinie direkt angrenzend an die *sna*-Expression spezifiziert das Mesektoderm, welches nach der Invagination des Mesoderms die ventrale Mittellinie bildet (Crews et al., 1988; Crews et al., 1992).

Aus den lateral gelegenen Regionen des *Drosophila*-Embryos entsteht das Neuroektoderm. In diesem Bereich werden durch eine höhere Bindeaffinität für Dorsal, Typ-II-Zielgene wie z.B. *rhomboid* (*rho*) (Ip et al., 1992), *short gastrulation* (*sog*) (Biehs et al., 1996) und *brinker* (Jazwinska et al., 1999) aktiviert. Durch die ventrale Reprimierung dieser Gene durch *Sna* kommt es zu einer Expression in zwei lateralen Streifen (Ip et al., 1992). Dorsal-Typ-III-Zielgene, wie *zerknüllt* (*zen*) und der BMP (Bone Morphogenetic Protein) ähnliche Faktor *decapentaplegic* (*dpp*) werden von Dorsal reprimiert, weshalb sie nur auf der dorsalen Seite aktiviert sind.

Ein sekundärer *Dpp*-Gradient spezifiziert das dorsale Ektoderm und die extraembryonale Amnioserosa (Doyle et al., 1989; Ferguson und Anderson 1992). *Sog* fungiert in lateralen,

neuroektodermalen Regionen als Dpp-Inhibitor, indem es durch die Komplexbildung mit Dpp, dessen Rezeptorbindung verhindert (Srinivasan et al., 2002). Das BMP-System ist hochkonserviert und für die DV-Musterbildung im Ektoderm von Vertebraten notwendig (Ferguson 1996). Allerdings wurde eine Initiierung dieses BMP-Musterbildungsprozesses mittels des rel/NF- κ B-TF-Gradienten bisher nur bei *Drosophila* und *Tribolium* gefunden (van der Zee et al., 2006).

Insgesamt reguliert Dorsal die Expression von etwa 50 Genen entlang der dorsoventralen Achse, und mindestens die Hälfte dieser Gene kodieren selbst Transkriptionsfaktoren oder Signalkomponenten, die zur Aktivierung der Notch-, EGF-, FGF- und TGF β - Signalwege führen (Stathopoulos und Levine 2002). In den letzten Jahren war es -unter Anwendung von Mikroarray-Analysen und Techniken der Bioinformatik-, möglich, weitere TF, die zusammen mit Dorsal an regulatorische Regionen binden, zu identifizieren. Mindestens die Hälfte der gewebespezifischen, regulatorischen Regionen, die Bindestellen für Dorsal aufweisen, besitzen auch Bindestellen für Twi und/oder Sna (Stathopoulos und Levine 2002; Markstein et al., 2004). Diese kombinatorische Bindung führt somit zu noch mehr Komplexität und Kontrolle und hebt die äußerst wichtige Rolle der Gene *twi* und *sna* im gesamten DV-Musterbildungsprozess heraus.

Es stellt sich natürlich die Frage inwieweit dieser sehr gut verstandene dorsoventrale Musterbildungsprozess von *Drosophila* auch in primitiveren Insekten vorhanden ist.

Bei *Tribolium*-Embryonen existiert zwar auch ein Tc-Dorsal-Gradient, dieser zeigt jedoch einen deutlich dynamischeren Prozess der Gradientenbildung. Der zunächst uniformen schwachen Tc-Dorsal-Kernaufnahme folgt eine Gradienten-Verfeinerung auf einen schmalen Streifen entlang der ventralen Mittellinie (Chen et al., 2000). Im differenzierten Blastodermstadium ist Tc-Dorsal nicht mehr zu detektieren (Chen et al., 2000). Tc-Dorsal wird zwar nicht in der Wachstumszone exprimiert, jedoch konnte gezeigt werden, dass sich die innere und die äußere Schicht der Wachstumszone schon während der Gastrulation bilden (Nunes da Fonseca et al., 2008). Anteriore Segmente scheinen als eine Art Schablone für die DV-Musterbildung von posterioren Segmenten zu fungieren (Nunes da Fonseca et al., 2008). Somit ist die DV-Musterbildung in der Wachstumszone nicht unabhängig vom frühen Tc-Dorsal-Gradienten.

Die wahrscheinlichen Dorsal-Zielgene *twi* und *sna* werden bei *Tribolium* ebenfalls ventral exprimiert, allerdings ist die zeitliche Überlappung mit dem Tc-Dorsal-Gradienten reduziert, was eine größere Autonomie auf der zygotischen Genexpressionsebene vermuten lässt

(Sommer und Tautz 1994; Chen et al., 2000). Im Gegensatz zu *Drosophila* zeigen typische *Dm*-Typ-II-Dorsal Zielgene, wie z.B. *sog* und *rho* eine zunächst ventrale Expressionsdomäne in *Tc*-Blastodermembryonen (van der Zee 2006; van der Zee et al., 2006), was eine Repressorfunktion von *Tc*-Sna gegenüber diesen Genen im Blastoderm ausschließt.

Im Gegensatz zu *Drosophila*, wo *zen* und *dpp* direkt von Dorsal reprimiert werden, werden *Tc-zen* und *Tc-dpp* bei *Tribolium* nicht von *Tc*-Dorsal reprimiert, was einen Verlust der Repressorfunktion von *Tc*-Dorsal nahe legt (Chen et al., 2000). Interessanterweise führten RNAi-Experimente mit *Tc-sog* zum vollständigen Verlust des Nervensystems (van der Zee et al., 2006). Diese Situation ist vergleichbar mit Vertebraten, in welchen das Sog Ortholog Chordin für die Inhibierung der Anti-neurogenen Effekte des BMP-Systems benötigt wird. Bei *Drosophila* führt der Verlust von *sog* lediglich zu geringen Nervensystemdefekten, da *brinker*, ein anderes Dorsal-Zielgen, Dpp direkt inhibiert (Jazwinska et al., 1999). *Brinker* wurde zwar im *Tribolium* Genom gefunden, zeigt allerdings keine Expression und keinen RNAi-Effekt in Embryonen (Fonseca und Roth, persönliche Kommunikation).

Das Sog/Dpp-System bei *Tribolium* hat außerdem einen Einfluss auf die anteriore Mesodermanlage. *Tc-dpp*-RNAi führt dabei zu einer Vergrößerung der anterioren *Tc-twi* Expression, während *Tc-sog*-RNAi diese verkleinert (van der Zee et al., 2006). Ein solcher Einfluss des BMP-Systems auf *twi* existiert bei *Drosophila* nicht. Somit zeigt dieses Beispiel, wie das zygotische Musterbildungssystem (BMP/Chordin in Vertebraten und Sog/Dpp bei *Tribolium*) teilweise durch den maternalen Dorsal-Gradienten bei *Drosophila* ersetzt wurde, und dass *Drosophila* somit einen eher abgeleiteten Zustand repräsentiert.

Ferner konnte gezeigt werden, dass *Tc-zen*, trotz funktioneller Konservierung, größtenteils im anteriorposterioren System, und nicht, wie bei *Drosophila* im dorsoventralen Musterbildungssystem fungiert (van der Zee et al., 2005). Somit muss es auch hier regulatorische Veränderungen auf dem Weg zur intensiven DV-Musterbildungskontrolle von Dorsal bei *Drosophila* gegeben haben.

Sowohl der *Tc*-Toll-Rezeptor als auch *Tc*-Cactus werden zygotisch und nicht, wie bei *Drosophila*, maternal exprimiert (Maxton Kuchenmeister et al., 1999; Chen et al., 2000; Nunes da Fonseca et al., 2008). Ihre Expression wird durch einen Rückkopplungsmechanismus mit *Tc*-Dorsal reguliert (Nunes da Fonseca et al., 2008). Zusammen mit der Unabhängigkeit des zygotischen Musterbildungssystems vom maternalen System, könnte dies die Erklärung für die oft größere regulatorische Kapazität von Kurzkeiminsekten gegenüber *Drosophila* liefern (Roth, 2004).

Studien an der niederen Diptere *Anopheles gambiae*, deren evolutionäre Distanz zur höheren Diptere *Drosophila* circa 200 Millionen Jahre beträgt (Gailey et al., 2006), haben gezeigt, dass auch hier intensive Veränderungen in der Expression regulatorischer, für die Musterbildung des dorsalen Ektoderms verantwortlicher Gene, stattgefunden haben (Goltsev et al., 2007).

Wie diese Beispiele zeigen, ist die Kenntnis der Musterbildungsregulation vieler Organismen wichtig, um evolutionäre Veränderungen in der DV-Musterbildung nachvollziehen zu können.

1.3. Konservierte und divergente Aspekte von *Twi* und *Sna*

Da sich die vorliegende Arbeit hauptsächlich mit der Funktion von *twi* und *sna* bei *Tribolium* auseinandersetzt, soll im Folgenden intensiv auf diese Gene eingegangen werden.

- **Twist**

Die Existenz des Mesoderms ist charakteristisch für bilaterale, symmetrische Tiere. Bei *Drosophila* wurde *twi* als die Schlüsselkomponente für die Mesodermentwicklung identifiziert (Simpson 1983; Thisse et al., 1987; Leptin 1991). *Drosophila-twi*-Mutanten bilden kein Mesoderm (Leptin und Grunewald 1990).

Twi ist ebenfalls für den Invaginationprozess nötig, in dessen Verlauf das zukünftige Mesoderm ins Innere des Embryos gelangt. In *Drosophila-twi*-Mutanten bildet sich eine enge und instabile Furche, durch die aber keine ventralen Zellen in den Embryo gelangen (Leptin und Grunewald 1990). Diese morphogenetische Rest-Aktivität ist wohl ein Resultat der frühen *Twi* unabhängigen *sna*-Expression (Ip et al., 1994), da nur Doppelmutanten keinerlei mesodermspezifischen Zellformänderungen durchlaufen (Leptin und Grunewald 1990).

Komponenten, die von *Twi* aktiviert werden und in der Kontrollkaskade, die zur Ventralfurcbildung führt, eine Rolle spielen, sind *folded gastrulation (fog)* und das kürzlich identifizierte Gen *t48* (Costa et al., 1994; Dawes-Hoang et al., 2005; Kolsch et al., 2007). Beide agieren in parallelen Signalwegen, die letztendlich zur Modifikation des Aktin-Zytoskelettes und somit zur Bildung der Ventralfurche führen.

Neben seiner Funktion als frühe Mesodermdeterminante bei *Drosophila*, spielt *twi* ebenso in späteren Stadien der Mesodermdifferenzierung, wie z.B. bei der Musterbildung innerhalb des Mesoderms und der Differenzierung der adulten Muskulatur, eine Rolle (Bate et al., 1991; Bate und Rushton 1993).

Bisher sind elf verschiedene Zielgene von Twi sicher identifiziert worden, u.a. *sna*, *tinman*, *Mef-2* sowie die micro-RNA *mir1* (Ip et al., 1992; Lee et al., 1997; Yin et al., 1997; Cripps et al., 1998; Gajewski et al., 1998; Biemar et al., 2005; Sokol und Ambros 2005).

Kürzlich konnte durch Kombination von ChIP-on-chip-Experimenten (Chromatin Immunoprecipitation gefolgt von Mikroarray-Analysen) mit Expressionstudien in *twi*-Mutanten gezeigt werden, dass Twi an weitaus mehr regulatorische Regionen bindet, als bisher angenommen wurde (Sandmann et al., 2007). Dazu gehören komplette Genkassetten, die Prozesse wie Zellproliferation, Zellwanderung und Morphogenese regulieren.

Aufgrund seiner Schlüsselfunktion während der Mesodermdifferenzierung und -invagination bei *Drosophila* wurden Homologe in großer Zahl in Metazoen identifiziert. Diese erstrecken sich von Primaten: Menschen (Wang et al., 1997), Affen (Gachot-Neveu et al., 2002); Nagetieren: Maus und Ratte (Wolf et al., 1991; Bloch-Zupan et al., 2001) über Vögel: Huhn (Tavares et al., 2001); Amphibien: *Xenopus* (Hopwood et al., 1989); Fische: Zebrafisch (Morin-Kensicki und Eisen 1997); Cephalochordaten: Lanzettfischchen (Yasui et al., 1998); Nematoden: *Caenorhabditis elegans* (Harfe et al., 1998) und Anneliden: Blutegel (Soto et al., 1997) zu Mollusken (Nederbragt et al., 2002).

Expressionsstudien und Mutantanalysen haben gezeigt, dass alle bisher identifizierten Twi-Proteine in Aspekte der Mesodermdifferenzierung involviert sind, aber bei keinem konnte eine vergleichbar wichtige und frühe Rolle während der Mesodermbildung und -invagination wie bei *Drosophila* festgestellt werden (Handel et al., 2005).

In der Maus, wie auch im Nematoden, ist *twi* erst nach der Gastrulation detektierbar und *twi*-Funktionsverlustmutanten deuten auf eine normale Gastrulation und Mesodermspezifizierung in diesen Spezies hin (Wolf et al., 1991; Chen und Behringer 1995; Gitelman 1997; Harfe et al., 1998; Corsi et al., 2000). In einigen Spezies ist *twi* außerdem in nicht-mesodermalem Gewebe, wie der Neuralleiste exprimiert (Gitelman 1997). Ferner konnte *twi*-Expression in einer kleinen Anzahl neuronenhähnlicher Zellen in *Caenorhabditis elegans* festgestellt werden (Harfe et al., 1998).

Ferner ist Twi an der Regulation verschiedenster Signalwege beteiligt. So zeigen Mutationen im FGF-Rezeptor im Menschen den gleichen Phänotyp wie Mutationen in *twi* (Wilkie und Morriss-Kay 2001). In Mäusen und in Menschen trägt Twi zur Tumormetastase bei, indem es den epithelial-mesenchymalen Gewebeübergang (EMT) erleichtert (Yang et al., 2004). Außerdem spielt Twi eine Rolle in der Zellproliferation und Apoptose. Humanes *twi* (*H-twi*) wurde als potentiell Onkogen klassifiziert, da es Zellkulturen in einem proliferativen Stadium hält (Maestro et al., 1999). Ektopische Expression von *H-twi* bei *Drosophila* führte

interessanterweise zur Proliferationsinduktion und inhibierte p53-abhängige Apoptose (Gullaud et al., 2003).

Erste Expressionstudien bei *Tribolium castaneum* (Handel et al., 2005), *Anopheles gambiae* (Goltsev et al., 2007) und auch *Apis mellifera* (Fan 2001) sprechen für eine ebenso frühe Funktion von *twi* in der Mesodermspezifizierung wie bei *Drosophila melanogaster*, was auf eine phylogenetisch alte Funktion von *twi* innerhalb der holometabolen Insektenembryogenese schließen lässt. (Handel et al., 2005).

- **Snail**

Genau wie *twi* wurde auch *sna* bei *Drosophila* als Mesodermdeterminante mit essentiellen Funktionen während der Embryogenese identifiziert (Simpson 1983; Grau et al., 1984; Leptin 1991).

Wie schon in Kapitel 1.2. beschrieben, fungiert *sna* in der Mesodermanlage als Repressor für Gene, die im angrenzenden Mesektoderm sowie im Ektoderm exprimiert werden (Leptin 1991). Dabei konnte für die regulatorischen Regionen von *sim* und *rho* eine direkte Bindung von *Sna* nachgewiesen werden (Ip et al., 1992; Kasai et al., 1992).

Weitere relevante Gene, die in *sna*-Mutanten dereprimiert werden, sind *sog* und *Delta* (Ip und Gridley 2002).

In *sna*-Mutanten findet keine Invagination des Mesodermprimordiums statt, und alle weiteren Merkmale der Mesodermmorphogenese unterbleiben (Leptin und Grunewald 1990).

Es stellt sich natürlich die Frage, ob der *Drosophila-sna*-Phänotyp vor allem durch die Derepression lateral exprimierter Gene im Mesodermprimordium zustande kommt. Zwar konnte gezeigt werden, dass eine hypomorphe *sna*-Mutante zwar zu Derepression von *sim* und *rho* führt, aber die ventrale Invagination des Mesoderms nicht stark beeinflusst (Hemavathy et al., 1997). Allerdings hat eine detailliertere Analyse dieses *sna*-Allels ergeben, dass die Mesoderminvagination wie auch dessen Ausbreitung nach der Invagination beeinträchtigt sind (Seher 2004). Dies führt zu der Annahme, dass es sich beim *sna*-Phänotyp um einen additiven Effekt handelt.

Seit der Isolation von *sna* aus *Drosophila* vor mehr als 20 Jahren, wurden über 50 Familienmitglieder in Metazoen beschrieben (Nieto 2002). So hat eine frühe Duplikation eines einzigen *sna*-Genes im Metazoen Vorfahren sehr wahrscheinlich zu den zwei Genen *sna* und *scratch* geführt (Manzanares et al., 2001), wobei *scratch* keine Rolle in der Mesodermbildung zukommt. Unabhängige Duplikationen von *sna* in den verschiedenen Gruppen haben die *sna*-Familie weiter vergrößert. So entstanden durch intrachromosomale

Tandemduplikationen bei *Drosophila* die drei Mitglieder *sna*, *escargot* und *worniu* (Morales und Nieto 2004), wobei nur *sna* eine frühe Rolle während der MesodermdeTerminierung zukommt, während *escargot* und *worniu* zusammen mit *sna* in späteren Stadien der Embryogenese für die Entwicklung des Zentralnervensystems (ZNS) wichtig sind (Ashraf et al., 1999).

Als identifizierte Mesodermeterminante bei *Drosophila* ist *sna* von großem Interesse, um den Ursprung dieses dritten Keimblattes nachzuvollziehen. So konnte *sna* in Cnidaria, wie z.B. der Anemone *Nemastostella* (Fritzenwanker et al., 2004), der Koralle *Acropora* (Hayward et al., 2004) und der Qualle *Podocoryne* (Spring et al., 2002) identifiziert werden. Cnidaria bestehen nur aus zwei Keimblättern, und *sna* wird in diesen Organismen hauptsächlich im Endoderm, welches durch die Invagination des Blastoderms gebildet wird, exprimiert.

In Triploblasten, wie z.B. im Mollusken *Patella vulgata* (Lespinet et al., 2002) und in der Spinne *Achaearanea* (Yamazaki et al., 2005) werden *sna*-Homologe nicht im Mesoderm, sondern in ektodermalem Gewebe, welches morphogenetische Bewegungen und Zellformänderungen durchläuft, exprimiert.

Trotz ihres Expressionsmusters gibt es auch keine direkten Beweise dafür, dass *sna*-Familienmitglieder in die Mesodermspezifizierung von Vertebraten involviert sind. Homozygote *sna*-mutante Maus-Embryonen formen z.B. alle drei Keimblätter und exprimieren mesodermale Marker wie *brachyury* (Carver et al., 2001). Der hauptsächliche Defekt dieser Mutanten liegt im Verlust der epithelial-mesenchymalen Transition (EMT).

Verschiedene Studien haben gezeigt, dass *Sna* einen Konvergenzpunkt für unterschiedliche Signalwege, wie z.B. FGF, Wnt, TGF β , BMP und EGF, die an der EMT-Induktion beteiligt sind, darstellt (Barello-Gimeno und Nieto 2005). Allerdings kann *Sna* nicht generell als ein EMT-Regulator bezeichnet werden, da es auch an Zellbewegungen, die kein vollständiges EMT erfordern, beteiligt ist. Dazu gehören z.B. auch die invaginierenden Zellen bei *Drosophila*, in welchen die Zell-Zell-Adhäsion zunächst nur reduziert ist (Oda et al., 1998). In der Maus ist *Snail2* in den Prozess der Zellmigration und reduzierten Zell-Zell-Adhäsion von wundschließenden Zellen involviert (Savagner et al., 2005).

Neben der Abgrenzung der Mesodermanlage gegenüber den lateral liegenden Zellen, kontrolliert *Drosophila*-*Sna* außerdem den Notch-Signalweg während der Gastrulation und beschränkt dadurch die *sim*-Expression auf das Mesektoderm (Cowden und Levine 2002; Morel et al., 2003). In Ascidien etabliert *Sna* die Muskel/Chorda-dorsalis-Grenze, indem es

Brachyury in den Muskeln reprimiert (Fujiwara et al., 1998). *Sna* könnte also eine konservierte Funktion in der Etablierung von Gewebegrenzen zukommen.

Insgesamt lässt sich festhalten, dass die Funktionen von *Sna* als Mesoderm-determinante wohl eher Prozessen wie Zellbewegung und Adhäsion sowie der Festlegung von Gewebegrenzen zuzuordnen sind (Barrallo-Gimeno und Nieto 2005). Für *Drosophila* konnte z.B. gezeigt werden, dass die Funktion von *Sna* während des Invaginationsprozesses darin liegt, subapikale Zellverbindungen aufzulösen (Kolsch et al., 2007).

1.4. Die Mesoderminvagination von *Drosophila* und *Tribolium* im Vergleich

Im Verlauf der Gastrulation kommt es zu einer Reihe komplexer Zellmorphologieänderungen und Zellbewegungen. Die Mesoderminvagination bei *Drosophila* ist der am intensivsten untersuchte Gastrulationsprozess; er beginnt direkt nach der Zellularisierung des *Drosophila*-Embryos mit der Bildung der Ventralfurche, mittels derer das zukünftige Mesoderm invaginiert. So entsteht aus einem einschichtigen Epithel eine mehrschichtige Struktur, in welcher sich das Mesoderm im Inneren des Embryos befindet. Es ist leicht vorstellbar, dass solch ein komplexer Prozess der Koordination von Zellschicksals-Festlegung, Zellzyklus und Zellbewegung bedarf.

Der Prozess der Ventralfurchenbildung bei *Drosophila* beginnt mit apikalen Verengungen (Konstriktionen), die zu einer Abflachung im ventralen Epithel führen (Leptin und Grunewald 1990; Sweeton et al., 1991). Gleichzeitig verändern die Zellkerne ihre Position von apikal nach basal (Abb.1.5B). Die entstandene Vertiefung schreitet so weit fort, dass das gesamte ventrale Epithel synchron in das Innere des Embryos gelangt und eine röhrenförmige Gestalt annimmt (Abb.1.5C). Dieser Zellverband verändert kurz darauf seine epithelialen zu mesenchymalen Eigenschaften, die Zellen beginnen sich zu teilen und breiten sich auf dem nun ventral angrenzenden Ektoderm aus (Abb.1.5D) (Leptin und Grunewald 1990).

Der Prozess der Mesoderminvagination erfolgt zellautonom und ist ein sehr schneller- und damit sehr effizienter-Vorgang von nur ca. 15 Minuten Dauer (Leptin und Grunewald 1990; Sweeton et al., 1991; Leptin und Roth 1994).

Parallel zur Ventralfurchenbildung finden ähnliche Zellformänderungen am posterioren Ende des Embryos statt und führen zur posterioren Mitteldarminvagination (Sweeton et al., 1991).

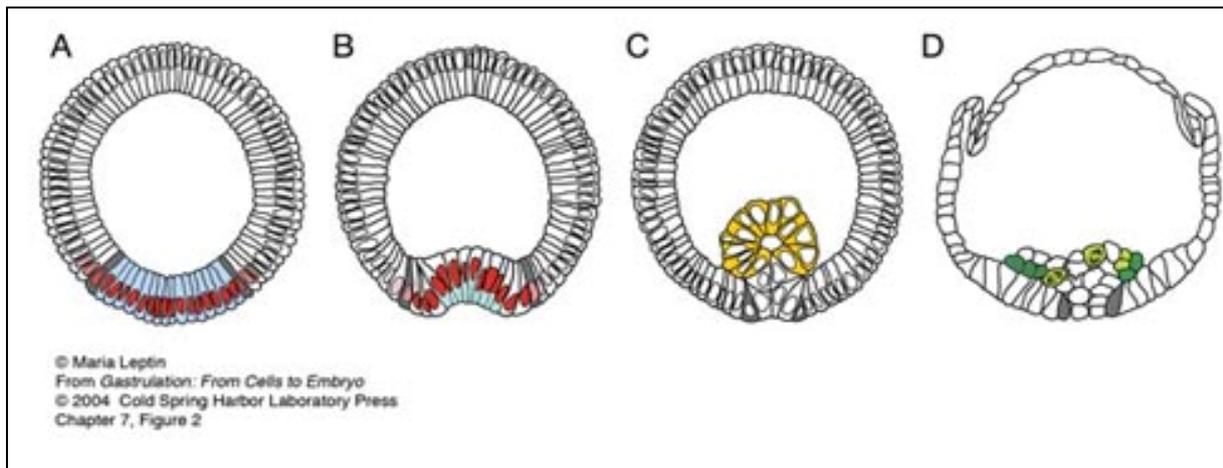


Abb.1.5: Zeichnungen von *Drosophila*-Embryo-Querschnitten in vier aufeinanderfolgenden Stadien der Mesoderminternalisierung

A: Blastoderm aus einschichtigem Epithel, blau: die *sna*-Expression überlappt genau mit der Domäne, die invaginieren wird, rot: die *Tw*-Expression in den Zellkernen reicht etwas über den Rand des prospektiven Mesoderms hinaus.

B: Konstriktion der ventralen Zellen, und Bewegung der Zellkerne nach basal, hellblau: *fog*-Expression.

C: Das ventrale Epithel ist invaginiert, behält aber zunächst die epitheliale Struktur.

D: Die invaginierten Zellen bekommen eine mesenchymale Struktur, beginnen sich zu teilen und dissoziieren auf dem darunterliegenden Ektoderm.

(Abb. nach Leptin, 2005)

Die Analyse der Mesoderminternalisierung im Kurzkeimsekt *Tribolium* zeigte viele Gemeinsamkeiten, aber auch Unterschiede zum Invaginationsprozess bei *Drosophila*.

Wie bei *Drosophila* bilden sich auch bei *Tribolium* apikale Konstriktionen im ventralen Epithel und die Kerne bewegen sich zur basalen Zellseite (Handel et al., 2005). Während das Mesoderm bei *Drosophila* vollständig invaginiert ist, bevor es zu einer massiven Keimstreifausstreckung kommt, erfolgt die Ventralfurchenbildung bei *Tribolium* parallel zu einer beachtlichen Embryoverlängerung (Handel et al., 2000). Im Gegensatz zu *Drosophila* nimmt die Mesoderminvagination von *Tribolium* mit einer Dauer von ca. einer Stunde, deutlich mehr Zeit in Anspruch. Dadurch könnte, im Gegensatz zu *Drosophila*, eine weniger strikte Kontrolle von Zellmorphologieänderungen möglich sein.

Anders als bei *Drosophila* findet die Invagination bei *Tribolium* nicht synchron entlang der anteriorposterioren Achse statt. Während die Ventralfurchenbildung in anterioren Regionen noch ziemlich flach ist und der Eindruck entsteht, das laterale Ektoderm drücke die Furchen in den Embryo (Abb.1.6B1, B2), ist sie in caudalen Regionen schon tief in den Embryo invaginiert (Abb.1.6B4) (Handel et al., 2005). Außerdem zeigt die Ventralfurchenbildung in caudalen Regionen von *Tribolium*-Embryonen eine mehrschichtige Struktur (Abb.1.6B3, B4) (Handel et al., 2005). Da Zellteilungen in der Ventralfurchenbildung sowohl anterior als auch caudal stattfinden,

könnte die unregelmäßige Struktur der caudal invaginierenden Zellen darauf hindeuten, dass diese Zellen mesenchymale Eigenschaften besitzen (Handel et al., 2005). Bei *Drosophila* findet der Übergang von epithelialer zu mesenchymaler Zellstruktur erst nach abgeschlossener Mesoderminvagination statt (Leptin und Grunewald 1990; Sweeton et al., 1991).

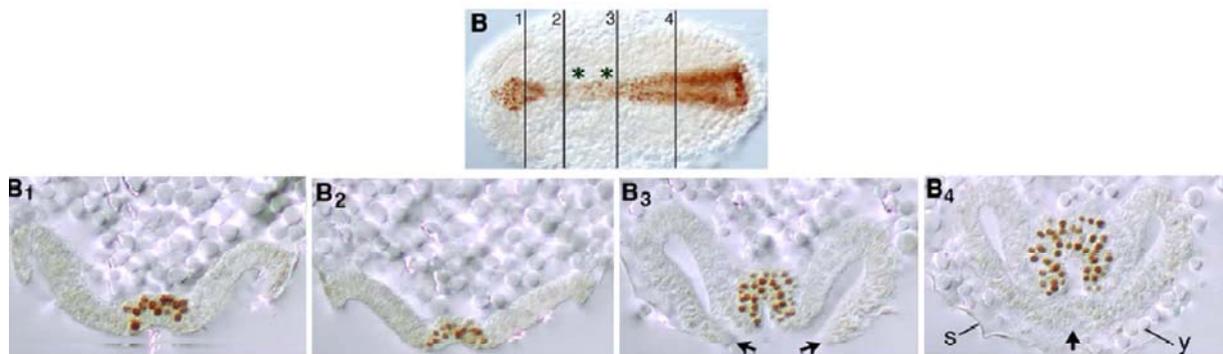


Abb.1.6: Querschnitte an vier verschiedenen Positionen eines gastrulierenden *Tribolium*-Embryos (Positionen in **B** angegeben), braun: Twi-Protein
Der Invaginationsprozess ist caudal (**B4**) wesentlich weiter fortgeschritten als anterior (**B1**). Die Zellen teilen sich schon bei der Invagination und es entsteht eine mehrschichtige Struktur (**B4**). **B3**, Pfeile: Die dorsalen Ausläufer des Ektoderms verbinden sich zum Amnion.
(Abbildung aus Handel et al. 2005).

Zellteilungen finden in der Mesodermanlage von *Tribolium*-Embryonen schon vor der Ventralfurcbildung statt, wohingegen Mitosen zu diesem Zeitpunkt bei *Drosophila* reprimiert werden (Grosshans und Wieschaus 2000; Seher und Leptin 2000; Handel et al., 2005), um eine geordnete Abfolge von Zellformänderungen zu gewährleisten. So sind sich Querschnitte des invaginierenden Mesoderms von *Tribolium*-Embryonen und *Drosophila*-Mutanten, in denen die Reprimierung der Zellteilung aufgehoben wurde, sehr ähnlich. Dies könnte darauf hinweisen, dass die Reprimierung von Mitosen während der Mesoderminvagination eine schnelle und effiziente Invagination in höheren *Dipteren* gewährleistet (Leptin 2005).

Ein weiterer Unterschied ist die früher einsetzende segmentale Modulation der *twi*-Expression bei *Tribolium*. Bei *Drosophila* setzt diese erst nach der Ausbreitung des Mesoderms auf dem Ektoderm ein (Handel et al., 2005).

Tribolium gehört zu den Kurzkeiminssekten, in welchen posteriore Segmente durch einen zweiten Wachstumsprozess geformt werden. Es stellt sich natürlich die Frage, wie sich das Mesoderm in diesen posterioren Segmenten bildet. Es konnte gezeigt werden, dass die

Wachstumszone von *Tribolium* aus drei Schichten besteht, wobei die innere Schicht mesenchymalen Charakter hat und in die mesodermale Schicht des Embryos übergeht. Zwar wird *Tc-twi* hier nur am posterioren Ende der Wachstumszone- und nicht in der gesamten inneren Schicht-exprimiert, jedoch wird die *Tc-twi*-Expression bei der Bildung neuer Segmente wieder initiiert (Handel et al., 2005; Nunes da Fonseca et al., 2008).

1.5. Die genetische Kontrolle der Ventralfurchenbildung bei *Drosophila*

Die Regulation der Ventralfurchenbildung ist ein sehr interessantes Beispiel dafür, wie Signaltransduktion morphogenetische Prozesse auf zellbiologischem Niveau kontrolliert. Bis zur Identifizierung von *T48* (Kolsch et al., 2007) waren nur zwei Faktoren bekannt, die an der Regulation der Ventralfurchenbildung beteiligt sind: der Ligand *Fog* (Costa et al., 1994) und das G- α -Protein *Concertina* (*Cta*) (Parks und Wieschaus 1991). Das direkte *Twi*-Zielgen *fog* reguliert die Synchronität, mit der die Zellen der Ventralfurche und die des posterior invaginierenden Mitteldarms ihre apikalen Konstriktionen initiieren (Costa et al., 1994). *Fog* bindet an einen bisher nicht identifizierten Rezeptor, an welchen ein G-Protein gekoppelt ist, wobei *Cta* die α -Untereinheit dieses G-Proteins bildet (Parks und Wieschaus 1991). G-Proteine gelten als Mediatoren der Zell-Zell-Kommunikation zwischen membrangebundenen Rezeptoren und intrazellulären Effektoren. *Drosophila-cta*-Mutanten zeigen den gleichen Phänotyp wie *fog*-Mutanten (wenig koordinierte Zellformänderungen in Ventralfurche und posteriorer Mitteldarmanlage), was es sehr wahrscheinlich macht, dass beide Faktoren innerhalb eines Signalweges agieren (Costa et al., 1994). Da Mutationen in diesen beiden Faktoren sich eher auf die Geschwindigkeit und Effizienz der Ventralfurchenbildung auswirken und sie nicht vollständig verhindern, wie es in *twi*- und *sna*-Mutanten der Fall ist, müssen andere Faktoren ebenfalls eine wichtige Rolle für die Zellmorphogenese in diesem Prozess spielen. Das kürzlich identifizierte *Twi*-Zielgen *T48* ist ein neuer Faktor, der parallel zur *fog/cta*-Kontrollkaskade agiert. *T48/cta*-Doppelmutanten bilden, wie auch *twi*-Mutanten keine Ventralfurche (Kolsch et al., 2007). Die, im Vergleich zur *T48/cta*-Doppelmutante, schwächere Ausprägung des *twi*-Phänotyps in frühen Stadien lässt vermuten, dass *Twi* einen negativen Regulator der Ventralfurchenbildung kontrollieren könnte (Kolsch et al., 2007)

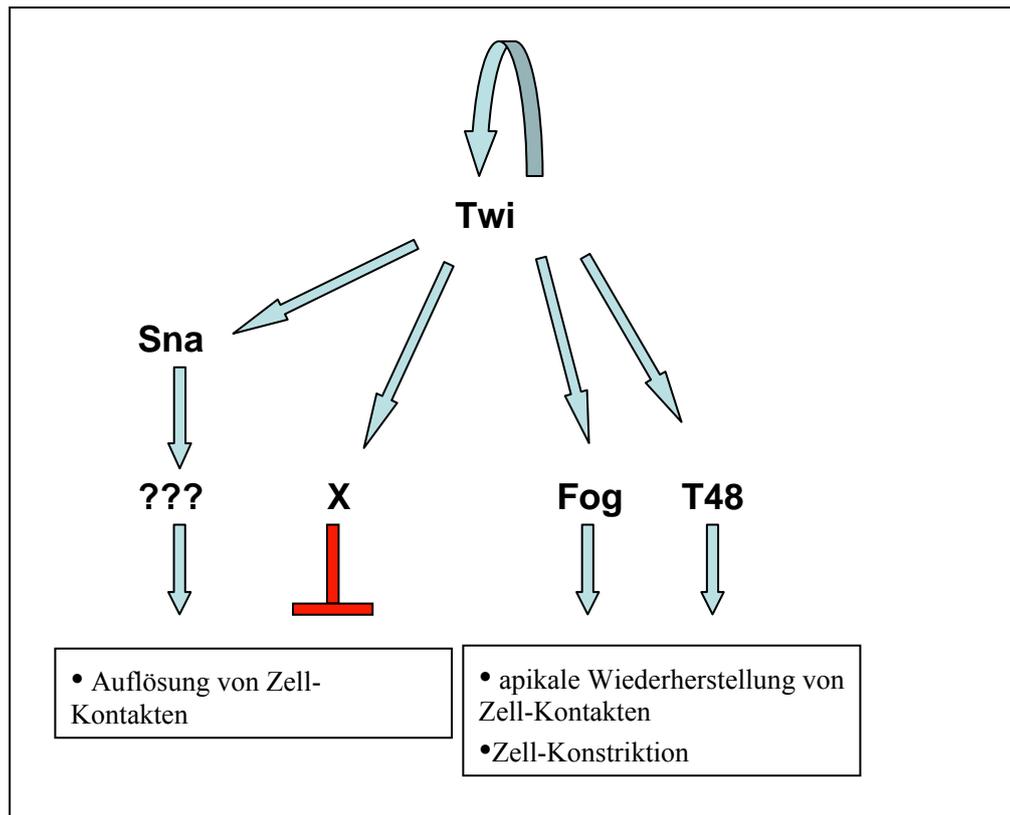


Abb.1.7: *Drosophila*-Twi und dessen Zielgene, welche an der Regulation der Zell-Kontakte und der Umorganisation des Zytoskelettes beteiligt sind.

(Abb. verändert aus Kölsch et al. 2007)

Zeitgleich zu *Drosophila*-T48 wurde die Kinase *Drosophila*-Abelson (Abl) ebenfalls als wichtiger Faktor für die Organisation des apikalen Aktinnetzwerkes in der Zelle identifiziert (Fox und Peifer 2007). Auch hier konnte gezeigt werden, dass in *Abl/cta*-Doppelmutanten die Mesoderminvagination unterbleibt.

Interessanterweise konnte in der niederen Diptere *Anopheles gambiae* gezeigt werden, dass zwar die Initiierung der Mesoderminvagination der von *Drosophila* sehr ähnlich ist, jedoch die Invagination des Mesoderms sehr ungeordnet verläuft und genau wie die bei *Tribolium* mit dem Phänotyp von *Drosophila*-fog-Mutanten vergleichbar ist (Handel et al., 2005; Goltsev et al., 2007). Dies macht deutlich, wie divergent morphogenetische Prozesse schon innerhalb ein und derselben Insektenordnung reguliert werden, und dass es nicht immer einfach ist, Rückschlüsse aus Studien an nur einem Organismus zu ziehen.

1.6. Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war die funktionelle Analyse der Gene *twist*, *snail* und *concertina* im Käfer *Tribolium castaneum*, um zum besseren Verständnis der Entstehung evolutionärer Diversität bei der Mesodermbildung und Gastrulationsbewegung in Insekten beizutragen.

In diesem Kontext sollten die Auswirkungen eines *twi*- bzw. *sna*-Funktionsverlustes auf die Expression anderer DV-Musterbildungsgene untersucht werden.

Ein weiteres Interesse bestand in der Suche nach homologen Genen, die Zellmorphologie-Änderungen, wie sie für die Ventralfurchenbildung benötigt werden, vermitteln.

Die analysierten Funktionen sollen mit denen homologer Gene anderer Organismen verglichen werden. Im Besonderen erfolgt dieser Vergleich mit der Fliege *Drosophila melanogaster*, da hier die Funktion von *twist*, *snail* und *concertina* besonders detailliert beschrieben worden ist.

2. Material und Methoden

2.1. Lösungen und Chemikalien

Hybridisierungslösung:	5×SSC 50% Formamid 50µl/ml Heparin 0,2% Tween20 in H ₂ O (DEPC)
Hybridisierungslösung/DNA:	Hybridisierungslösung mit 100µg/ml Salmon Sperm DNA
Klorix:	Natriumhypochlorit 1:1 in Wasser
Ladepuffer:	0,25% Bromphenol 0,25% Xylan 15% Ficoll
LB-Medium (Luria-Bertani):	1% (w/v) Trypton 0,5% (w/v) Hefe-Extrakt 0,5% (w/v) NaCl
LB-Platten [amp/X-gal]:	LB-Medium mit 1,5% (w/v) Agar [50mg/ml Ampicillin] [10% X-gal (5-Brom-4-chloro-3-indolyl-β-D-Galaktosidase)]
LB Top-Agarose:	LB-Medium mit 0,7% (w/v) Agarose
NBT:	75mg/ml in 70% DMF
PBS:	137mM NaCl 2,7mM KCl

	8mM Na ₂ HPO ₄	
	1,7mM KH ₂ PO ₄	
	pH7,4 mit HCl	
PBST:	PBS mit 0,02% (v/v) Tween20	
PEMS:	0,1M Pipes	6,04g
	2mM MgSO ₄	0,4ml
	1mM EDTA	<u>0,2ml</u>
		200ml pH 6,8
RNA-AP-Puffer:	100mM NaCl	
	50mM MgCl ₂	
	100mM Tris, pH 9,5	
	0,2% Tween20	
SSC:	150mM NaCl	
	15mM NaCitrat	
	pH 7	
TBE (10-fach):	89mM Tris Base	
	89mM Borsäure	
	2mM EDTA	
	pH 8,2	
TE:	10mM Tris/HCl pH8,0	
	0,1mM EDTA	
X-Phosphat:	50mg/ml 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphat in DMF	

Alle Lösungen und Medien wurden mit destilliertem Wasser
(*MilliWaterPurificationSystem Millipore, Eschborn*) angesetzt.

2.2. Molekularbiologische Arbeiten

2.2.1. Klonierungen und benutzte Marker Gene

Die Suche nach möglichen orthologen Sequenzen von *Drosophila* Genen bei *Tribolium*, wurde mit dem *Tribolium*-web-server Köln oder der Baylor's website durchgeführt. Primer Design, RNA-Extraktion mit Trizol (*Invitrogen*) und cDNA-Synthese (*Cloned AMV First Strand Synthesis Kit, Invitrogen*) wurden nach Standardprotokollen der Hersteller durchgeführt.

Alle Fragmente wurden in den TOPO II-Vektor (*Invitrogen*) kloniert. *Tc-elav* wurde mit den Primern Tc-elavfwd GCGATAAAGTCACAGGGCAAT und Tc-elavrev TACTCGGGTTGTTGGCAAAT, T48 mit den Primern Tc-T48fwd ATTCGCCCGAAAGACGAGACT und Tc-T48rev TTCCACTGCGGATTCAGAGTG amplifiziert. *Tc-cta* wurde von R. Fonseca mit Tc-ctafwd TCAAGCTGTGGCGGGATAG und Tc-ctarev CAGTGGATGTTCGTCTCGGGATT kloniert. Alle verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma *Sigma* bezogen.

- Andere verwendete Markergene und ihre Referenzen:

Tc-sim und *Tc-rho*: R.Fonseca

Tc-twi und *Tc-sna*: (Sommer und Tautz 1994)

Tc-dpp und *Tc-sog*: (van der Zee et al., 2006)

Tc-zen und *Tc-pnr*: (van der Zee et al., 2005)

Tc-Ash und *Tc-vnd*: (Wheeler et al., 2003; Wheeler et al., 2005)

Tc-vasa und *Tc-Fgf8*: (Schroder 2006; Beermann und Schröder 2008)

Tc-tin und *Tc-Mef2*: R.Janßen

Tc-iro M.Schoppmeier

2.2.2. DNA-Isolierung

DNA-Fragmente von Interesse wurden möglichst genau mit einer Rasierklinge ausgeschnitten und mit Hilfe des *GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Biosciences)* aufgereinigt. Es wurde nach Anleitung des Herstellers gearbeitet.

2.2.3. DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung erfolgte mittels eines *ABI 3100 Sequencer*. Für eine Sequenzierreaktion wurden ca. 50ng der zu sequenzierenden DNA, 2µl *Big Dye Terminator Ready Reaction Mix*, 4µl 5×Sequenzierpuffer und 1µl des entsprechenden Primers zusammengegeben und mit dH₂O auf 20µl aufgefüllt. Die *Cycle Sequencing* Reaktion erfolgte nach Angaben des Herstellers.

Für die Analyse der Nukleinsäure- und Aminosäuresequenzen wurde das Programm *Lasergene* verwendet.

2.2.4. Transformation elektrokompenter Zellen

Die Transformation elektrokompenter Zellen *E. coli* DH5α F⁻ Φ80d *lacZΔM15 endA1 recA1 hsdR17* (r_k⁻, m_k⁺) *supE44 thi-1 d'gyrA96 Δ(lacZYA-argF)* U169 (Hanahan 1983) wurde mit dem *E. coli* Pulser (*Easyject Prisma, EQUIBIO*) durchgeführt.

Mit Hilfe einer hohen elektrischen Spannung wurden Ligationsprodukte in kompetente Zellen befördert. Der Transformationsansatz enthielt 1-2µl Ligationsansatz und 50µl elektrokompente Zellen und wurde in eine gekühlte „*Gene Pulser Cuvette*“ (*BIO-RAD*) pipettiert und unter Benutzung des Elektroporators einer Spannung von 1,8kV ausgesetzt.

Direkt danach wurde der Ansatz in ca. 500µl SOC-Medium aufgenommen und für eine Stunde bei 37°C auf dem Schüttler inkubiert und zur Selektion auf Agarplatten mit 50µg/µl Ampicilin ausgestrichen, da dort nur Zellen wachsen, die ein Plasmid enthalten.

2.2.5. Nachweis positiver Klone

Eine weitere Selektion erfolgt aufgrund der Zugabe von 100µl X-Gal (2%) und 20µl IPTG (100mM) auf die Platten. Da Zellen mit einem „einligierten“ DNA-Fragment keine β-Galaktosidase produzieren und so X-Gal nicht umsetzen können, bleiben diese weiß. Das Produkt der Zellen, die X-Gal umsetzen, ist blau. Bis sich ein sichtbarer Farbniederschlag gebildet hat, vergehen ca. 15 Stunden, wobei IPTG als Induktor dieser Reaktion wirkt.

Um zu überprüfen, ob die im Vektor enthaltenen Fragmente die richtige Größe besitzen, isoliert man die Plasmide mittels dem *QIA Miniprep Kit (Quiagen)*, schneidet das Fragment mit dem passenden Restriktionsenzym heraus und analysiert die Größe durch Gelelektrophorese.

2.2.6. Synthetisierung von doppelsträngiger RNA und *in situ* Sonden

Doppelsträngige (ds) RNA wurde mit dem *MEGAscript RNAi Kit (Ambion)* nach Angaben des Herstellers synthetisiert. Für die Injektionen von zwei verschiedenen dsRNAs wurden zunächst jeweils gleich große Fragmente hergestellt und als Vorlage für die ds-Synthese benutzt, um so gleiche Konzentrationen im Gemisch zu gewährleisten.

DIG-markierte *in situ* Sonden wurden mit dem *MAXIscript T7/T3 Kit (Ambion)* synthetisiert und mit dem *DIG RNA-Labeling Mix (Roche)* markiert.

2.3. Embryologische Arbeiten

2.3.1. Tierhaltung

Die in unserem Labor gehaltene Population von *Tribolium castaneum* (Coleoptera, Tenebrionidae) ist ein Ableger von M. Klinglers Zucht aus München (Wolff et al., 1998). Die Käfer wurden bei 30°C auf Weizen/Hefe-Futter (5% Bierhefe auf *Diamant extra* Weizen, Typ405) in 10×25cm großen Boxen gehalten. Die Boxen besitzen seitliche Lüftungsschlitze und sind mit einem Deckel verschließbar. Das Weizenmehl wurde außerdem mit *Fumidil B (Sanoti, Frankreich)* versetzt (500mg/Kg). Eine ausreichende Menge einer *Tribolium* Population wurde zur Eiablage von Weizenmehl auf Instantmehl (*Diamant instant*, Typ 405 instant) übertragen, und die Embryonen wurden je nach folgendem Experiment nach 1,5-3h (bei embryonalen Injektionen) bzw. nach zwei bis drei Tagen (für Fixierungen) bei 30°C abgesammelt. Dazu wurden diese durch ein 300µm Sieb (*Retsch*) vom Mehl getrennt.

2.3.2. Fixierung von Embryonen

Nach dem Waschen der Embryonen erfolgte eine zweiminütige Dechorionisierung in 50% Chlorox. Nach mehrfachem Waschen mit dH₂O wurden die Embryonen mit einem feinen Pinsel in das vorbereitete Heptan-Fix Gemisch (5ml Heptan, 4ml PEMS, 1ml 37% Formaldehyd) übertragen und für 20-30min auf dem Schüttler bewegt. Die untere wässrige Phase wird entnommen und durch 8ml Methanol ersetzt. Um die Embryonen von ihrer Vitellinmembran zu trennen wurden diese für eine Minute kräftig geschüttelt.

Anschließend wurde die obere Phase und ein Großteil des Methanols entfernt. Die Embryonen vom Grund des Gefäßes wurden dreimal mit Methanol gewaschen und mit einer abgeschnittenen Pipettenspitze in ein Eppendorfgefäß überführt. Sie konnten so bei -20°C gelagert werden.

Embryonen für Phalloidin-färbungen wurden ohne Methanolschock in PBST übertragen und per Hand mit Nadeln devitellinisiert.

2.3.3. RNAi -Arbeiten

Durch die Injektion von Doppelstrang-RNA (dsRNA) ist es möglich, das durch die RNA repräsentierte Gen zu inhibieren. In den Zellen wird dsRNA in kleine ca. 24bp messende Fragmente zerlegt, die mit speziellen Proteinen komplexieren. Diese Komplexe detektieren die RNAs, welche komplementär zur Sequenz der Fragmente sind, und degenerieren diese. Diese Degeneration bleibt über einen längeren Zeitpunkt erhalten (Yang et al.,2000). Der genaue Mechanismus ist dabei noch nicht ganz verstanden. Die Zerlegung in kleine Fragmente geschieht sehr wahrscheinlich als Reaktion auf virale dsRNA.

Für die Injektionen wurden ca. drei Tage alte weibliche Puppen (Augen und Flügel pigmentiert) gesammelt und jeweils 20-25 Stück auf einem Objektträger aufgereiht. Dabei wurden die Puppen an der Abdomenspitze mit *Fixogum* Alleskleber (*Marabu*) befestigt.

DsRNA mit einer Konzentration von 1-2µg/µl wurden mit 1/10 Vol. Phenol Rot (*Sigma P-0290*) versetzt. Ca. 4µl davon in eine Nadel aufgezogen. Die Nadel wurde in einen Mikromanipulator eingespritzt. Die Injektion erfolgte über Druckluft, die mit einer Spritze per Hand reguliert wird.

Der Objektträger mit den Puppen befand sich auf einem Objektisch eines Stereomikroskopes. Injiziert wurde zwischen das dritte und vierte Abdominalsegment. Die Injektion wurde gestoppt, wenn die Puppen sich aufgrund des gestiegenen Drucks der Haemolymphe streckten. Nach Beendigung der Injektionen wurden die Puppen mit Objektträger auf eine mit Instantmehl gefüllte Petrischale gelegt und in einen 30°C warmen Brutschrank gestellt (Bucher et al.2002).

Die injizierten Puppen wurden täglich kontrolliert und gegebenenfalls mit einem weichen Pinsel vom Kleber befreit. Nach fünf Tagen wurden wildtypische Männchen hinzugegeben. Die im Instantmehl gelegten Eier wurden abgesammelt und für *in situ* Hybridisierungen und Antikörper-Färbungen verwendet.

Für embryonale dsRNA-Injektionen wurden Embryonen nach einer Stunde Ablagedauer abgesammelt. Nach einer weiteren Stunde erfolgte die 30-sekündige Dechorionisierung und das vorsichtige Aufreihen der Eier auf einem Objektträger. Nach einer guten Trocknung der Embryonen wurden diese mit *Voltalef* Öl bedeckt. Die zu verwendende dsRNA wurde für zwei Minuten in einem *Ultrafree-MC 0,45µm Filter Unit (MILLIPORE, amicon)* in einer

Tischzentrifuge (*Roth*) zentrifugiert, um das Verstopfen der feinen Kapillare (*Femto-Jet*, *Eppendorf*, Hamburg) mit kleinen Partikeln zu verhindern.

Für die Injektionen wurde ein *Eppendorf Mikro-Manipulator 5174* (*Eppendorf*, Hamburg), der mit einer Mikro-Injektionseinheit (*Femto-Jet*, *Eppendorf*, Hamburg) verbunden ist, verwendet. Die aufgereihten Embryonen wurden auf drei fixierte Objektträger auf dem Objektisch eines Mikroskops (*Zeiss*, Jena) platziert und anterior injiziert.

2.3.4. *In situ* Hybridisierung und Immunohistochemie

In situ Hybridisierungen wurden wie beschrieben (Sommer und Tautz 1994; van der Zee et al., 2005) durchgeführt, allerdings ohne Proteinase K Behandlung. Für Fluoreszenz *in situ* Hybridisierungen wurde der anti-DIG-POD Antikörper (1:200) (*Roche*) benutzt und über eine Peroxidase- und eine folgende Tyramide-Reaktion detektiert (green-Alexa Fluor 488 Tyramide aus *TSA Kit#2 (T20912)*, *Invitrogen*). Für eine Doppelfärbung mit dem *Hoechst* Farbstoff 33258 wurden die Embryonen, noch vor ihrer Überführung in *Vectashield* Einbettungsmedium (*HI1000*, *Vector Laboratories*), in verdünntem *Hoechst* Farbstoff DAPI (1:1000 in PBST) für 10min auf dem Rad inkubiert. Danach konnte die Farbstoff-Lösung entnommen werden, um anschließend die Embryonen 1×5min in PBST zu waschen.

Antikörperfärbungen wurden wie beschrieben (Roth et al., 1989) durchgeführt.

- Verwendete Antikörper und ihre Verdünnung:

Erstantikörper:

Rabbit-Anti-Tc-OTD	(R. Schröder, Universität zu Tübingen)(1:100)
Mouse-Anti Active MAPK	(Wheeler et al., 2005) (1:1500)
Rat-Anti-Tc-Twi	(J. Cande und M. Levine (UC/Berkeley) (1:100)
Guinea pig-Anti-Dorsal	(J. Cande und M. Levine (UC/Berkeley) (1:100)
Mouse-Anti Phospho-Tyrosin	(1:500)
Rhodamine Phalloidin	(<i>R415-Invitrogen</i>) (1:350)

Zweitantikörper:

Alexa 555 anti-mouse antibody	(<i>Molecular Probes</i>) (1:400)
Alexa 555 anti guinea pig antibody	(<i>Molecular Probes</i>) (1:400)
Alexa569 anti rat antibody	(<i>Molecular Probes</i>) (1:400)

2.3.5. Kutikulapräparation

Eier wurden zur weiteren Entwicklung auf eine „24-well-Platte“ (*Sarstedt*) verteilt und für fünf Tage auf 30°C gehalten, es wurde die Schlüpfrate ausgewertet und einige Tropfen eines 9:1 Milchsäure:Ethanol Gemisches wurden in die Vertiefung gegeben. Nach einer Nacht bei 60°C konnten die Kutikulas unter einem Dunkelfeld Binocular, oder eingebettet für die Lichtmikroskopie, analysiert werden.

2.3.6. Konfokalmikroskopie

Embryonen für Phalloidin-färbungen wurden ohne Methanolschock fixiert und mit Nadeln per Hand devitellinisiert. Nach mehreren Waschungen mit PBS/0,1% Triton und einer zweistündigen Inkubation in PBS/2% Triton, wurden die Embryonen für zwei Stunden in Dunkelheit mit Phalloidin (1:350 in PBS/0,1% Triton) inkubiert. Nach dem Waschen in PBS/0,1% Triton wurden die Embryonen für 10min mit DAPI (1:1000 in PBS/0,1% Triton) inkubiert und darauf folgend gewaschen. Die Embryonen wurden dann mit einem Skalpell longitudinal oder transversal geschnitten, in *Vectashield* (*Vector Laboratories*) eingebettet und unter dem Konfokalmikroskop (*Leica SP*) analysiert.

2.3.7. Einbetten der Embryonen in Araldit

Zum Einbetten der gefärbten Embryonen wurden diese in ein 1,5ml Reaktionsgefäß überführt und dehydriert (schrittweise von 100% PBST, jeweils 5 min in 50% ETOH, 70% ETOH, 100% ETOH, 100% dehydrierter ETOH und 100% dehydriertes Aceton). Danach wurden die Embryonen mit einer abgeschnittenen Pipettenspitze abgenommen in ein 1:1 Gemisch aus Aceton und Araldit überführt und nach zwei Stunden in 100% Araldit eingebettet. Nach einer Nacht bei 60°C wurden die Aralditblöcke mit einem *Leica RM2255 Mikrotom* geschnitten (8µm Schnitte)

3. Ergebnisse

3.1. Funktionelle Analysen des *twist* und *snail* RNAi- Phänotyps bei *Tribolium*

Um die Funktion von *twist* (*twi*) und *snail* (*sna*) bei *Tribolium* zu untersuchen, wurde die RNAi Technik benutzt. Als Negativkontrolle wurden weibliche Puppen mit GFP (Green Fluorescent Protein) -dsRNA injiziert. Die Embryonen der injizierten Weibchen waren, neben 11% unfertilisierten oder unentwickelten Eier, die in allen RNAi Experimenten auftraten, nicht von Wildtyp (Wt)-Embryonen zu unterscheiden.

Um zunächst festzustellen, wie effizient der RNAi-Abbau von *Tc-twi* und *Tc-sna* funktioniert, wurde die potentielle Restexpression von Tc-Twi in *twi*-RNAi-Embryonen und *Tc-sna* in *sna*-RNAi-Embryonen ermittelt.

Während nach *twi*-dsRNA-Injektionen in 83% der Embryonen keinerlei Tc-Twi-Protein mehr zu detektieren war (Abb.1aA-D), zeigten 87% der *sna*-RNAi-Embryonen eine sehr schwache posteriore Restexpression in frühen Stadien und nahezu 100% eine leichte *Tc-sna*-Expression im Nervensystem (Abb.1bA-D).

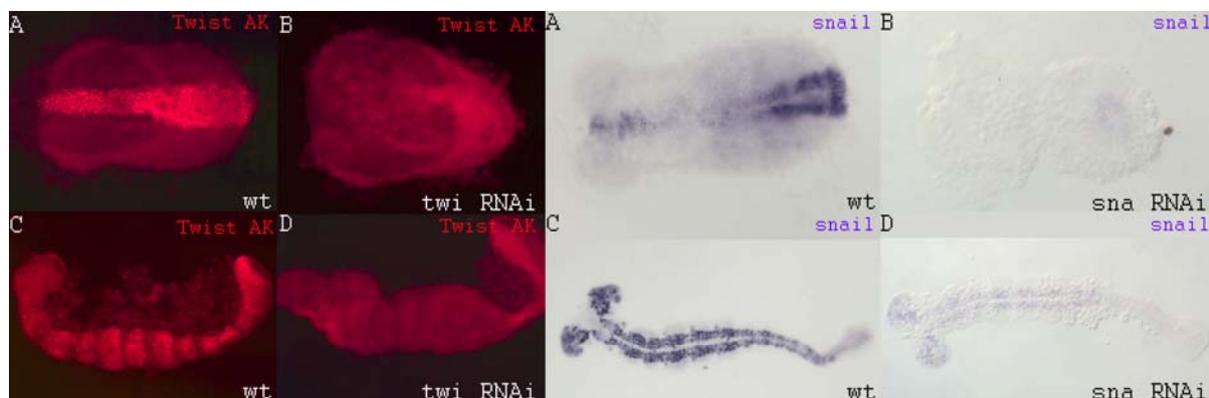


Abb.1a: Tc-Twi (Twi)-Protein ist in *twi* RNAi-Embryonen nicht exprimiert (in allen Abbildungen ist anterior links) (Twist Antikörper AK)

A,B: Ventralansicht gastrulierender Embryonen: Im WT wird Tc-Twi in einem ventralen Streifen exprimiert. In *twi*-RNAi-Embryonen ist kein Tc-Twi detektierbar.

C,D: Während Tc-Twi im elongierenden WT-Embryo (Ventralansicht) in einem segmentalen Muster exprimiert wird, ist in *twi*-RNAi-Embryonen keine Expression feststellbar.

Abb.1b: Eine schwache *Tc-sna* (*sna*)-Expression ist in *sna*-RNAi-Embryonen detektierbar

A,B: Ventralansicht gastrulierender Embryonen: Im WT-Embryo wird *Tc-sna*, neben einer anterioren Domäne, im posterioren Pol und in zwei lateralen Streifen exprimiert. In *sna*-RNAi-Embryonen ist meist eine schwache posteriore *Tc-sna*-Expression vorhanden.

C,D: Im elongierenden WT-Embryo wird *Tc-sna* in den Neuroblasten exprimiert. In *sna*-RNAi-Embryonen ist eine leichte *Tc-sna*-Expression in den Neuroblasten detektierbar.

Die direkte Injektionen von *sna*-dsRNA in frühe Embryonen konnte das Resultat in frühen Stadien verbessern, dennoch kam es hier in 87% der Fälle zu schwacher *Tc-sna*-Expression im Nervensystem. Dies spricht dafür, dass *sna* zu den wenigen Genen bei *Tribolium* gehört, deren vollständiger Abbau durch RNAi schwierig ist. Diese Situation darf bei der weiteren Analyse nicht außer Acht gelassen werden.

Die Expression von *Tc-twi* sowie von *Tc-sna* ist bereits beschrieben worden (Sommer und Tautz 1994; Handel et al., 2005). Sommer und Tautz (1994) konnten nur ein *Tc-sna*-Homolog identifizieren.

Die Position von Tc-Sna in einem „distance-tree“ (Abb.2) bekräftigt dieses Ergebnis . Nur eine der möglichen Sna-Sequenzen bei *Tribolium* gruppiert sich mit den drei Sna-Proteinen aus *Drosophila*: Dm-Sna, Dm-Escargot und Dm-Worniu. Da dieses Ergebnis ebenfalls für Sna aus *Anopheles gambiae* zutrifft, ist eine stattgefunden Duplikation von *sna* in höheren Dipteren wahrscheinlich.

Die Information, dass nur ein *sna*-Homolog bei *Tribolium* existiert, ist wichtig, um Genredundanz in weiteren Ergebnissen auszuschließen.

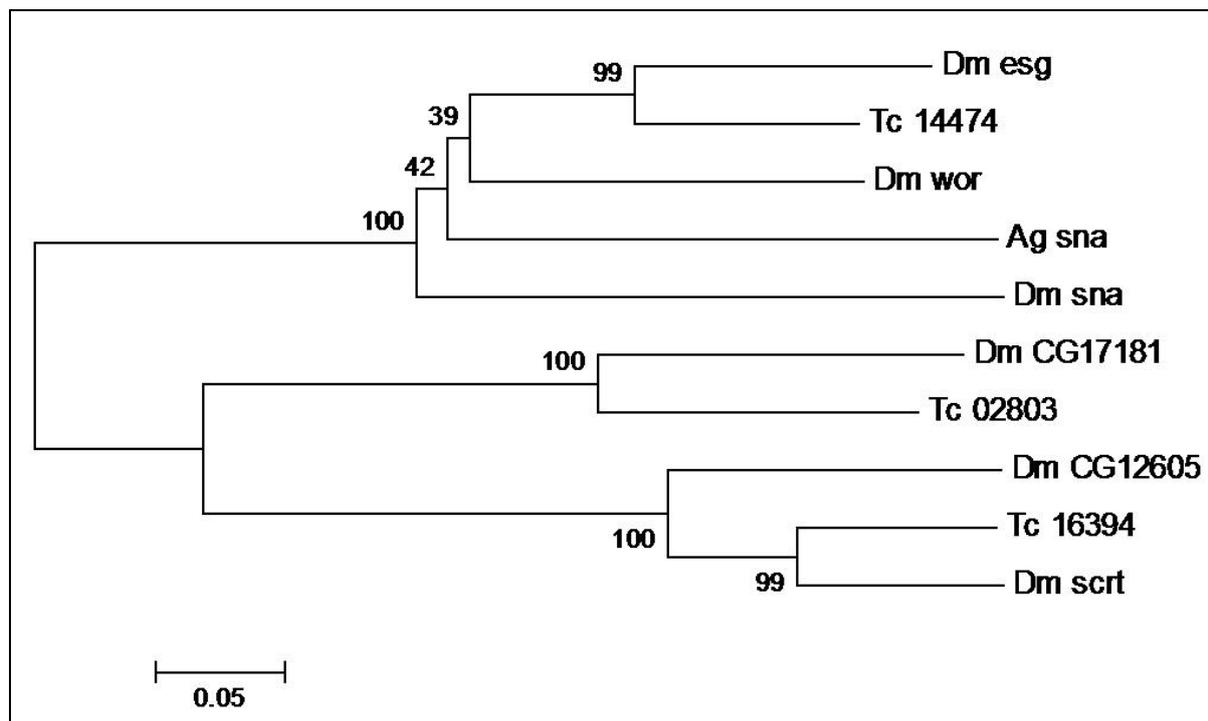


Abb.2: Phylogenetischer Baum für Sna-Homologe

TBLASTN wurde benutzt, um homologe Sequenzen bekannter Dm-Sna-Familienmitglieder im *Tribolium*-Genom zu identifizieren. Sequenzen wurden in die MEGA 3.1 Software geladen. Eine Neighbour-joining Analyse mit 1000 Wiederholungen für die bootstraps wurde durchgeführt. Speziesnamen bzw. Genbanknummern: Dm esg, Dm-wor, Dm-sna, Dm-scr: Escargot, Worniu, Sna und Scratch aus *Drosophila*. Nur jeweils eine homologe Sna-Sequenz konnte bei *Tribolium* (Tc-Glean_14474) sowie *Anopheles* (Ag sna) identifiziert werden. Tc-Glean_16394 gruppiert sich mit Dm-Scratch und Tc-Glean_02803 mit Dm CG17181 (einem Zink-Ion bindendem Protein); Dm CG12605 (Zink-Ion bindendes Protein)

3.1.1. Die gegenseitige Regulation von *twi* und *sna* bei *Tribolium*

Bei *Drosophila* erfolgt die Initiation der *sna*-Expression durch Dorsal und wird von Twi aufrechterhalten. Allerdings ist zu beachten, dass auch die *twi* Expression früher als im Wt in *sna*-Mutanten verschwindet (Leptin 1991; Seher et al., 2007). Die frühe *twi* unabhängige *sna*-Expression ist dafür verantwortlich, dass der *twi*-Phänotyp unterschiedlich zur *twi/sna* Doppelmutante ausfällt.

Im Folgenden wurde untersucht inwieweit *twi* und *sna* sich bei *Tribolium* gegenseitig regulieren, indem die *Tc-twi*-Expression in *sna*-RNAi-Embryonen und die *Tc-sna*-Expression in *twi*-RNAi-Embryonen untersucht und mit der Wt-Expression verglichen wurden.

Tc-twi wird zunächst in einer breiten Domäne entlang der gesamten anteriorposterioren Achse im Blastoderm exprimiert. Im differenzierten Blastoderm verschwindet *Tc-twi* aus der anterioren Region, in der sich die Serosazellen abgrenzen (Abb.3A). Die *Tc-twi*-Expression verengt sich ventral auf exakt jenen Bereich des Embryos, der während der Mesoderminvagination in das Innere des Embryos gelangt (Abb.3C). Schon in diesem Stadium ist eine segmentale Expression von *Tc-twi* zu beobachten, die im gesamten Prozess der Keimstreifausstreckung erhalten bleibt (Abb.3G,I). *Tc-twi* ist bis zum Ende der Keimstreifausstreckung posterior in der Wachstumszone nachweisbar.

Die Expression von *Tc-twi* in *sna*-RNAi-Embryonen bleibt bestehen. Auffällig ist allerdings die posterior vergrößerte Expressionsdomäne von *Tc-twi*, die aufgrund ihrer Unregelmäßigkeit morphologische Veränderungen vermuten lässt. (Abb.3D,F,H,J). Die vergrößerte *Tc-twi*-Expressionsdomäne kann ebenfalls auf eine fehlende Reprimierung von *Tc-Sna* deuten. Durch die Herstellung transgener *Drosophila*-Linien, welche die regulatorische *Tc-twi*-Region vor dem Reporter gen *lacZ* tragen, wurde gezeigt, dass *Drosophila-Sna* *Tc-twi* reprimiert (Handel et al., 2005).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass *Tc-twi* in *sna*-RNAi-Embryonen zunächst unabhängig von *Tc-sna* exprimiert wird, wobei nicht auszuschließen ist, dass *Tc-sna* im sekundären Wachstumsprozess, der von der posterior gelegenen Wachstumszone ausgeht, reprimierend auf *Tc-twi* wirkt.

Die ventrale *Tc-sna*-Expression im Wt beginnt erst in einer fortgeschrittenen Phase der Zellularisierung, zu Beginn des differenzierten Blastoderms. Wie *Tc-twi* wird *Tc-sna* in einer ventralen Domäne exprimiert, wobei die Expression im posterioren Bereich besonders stark ausfällt (Abb.3M). In frühen Keimstreifstadien verschwindet die *Tc-sna*-Expression zunehmend aus thorakalen Bereichen und verfeinert ihre abdominale Expression auf zwei laterale Streifen, die am posterioren Ende zusammentreffen (Abb.3O). In einem späteren

Stadium ist *Tc-sna* nur noch in einer größeren Domäne in der Wachstumszone und in einer kleineren anterioren Domäne detektierbar (Abb.3Q). In mittleren Keimstreifstadien beginnt die zweite Expressionsphase von *Tc-sna* im Ektoderm, in den Kopflappen und im Zentral- sowie peripheren Nervensystem (Abb.3S,U). *Tc-sna* ist ebenfalls bis zum Ende der Keimstreifausstreckung in der Wachstumszone detektierbar (Abb.3S,U,W).

In *twi*-RNAi-Embryonen wird *Tc-sna* in frühen Stadien, vom Blastoderm bis zu jungen Keimstreifstadien, nicht exprimiert (Abb.3N,P,R). Dies bedeutet, dass *twi*-RNAi-Experimente in frühen Stadien einem *twi/sna*-Doppel-Ausfallphänotyp entsprechen. *Tc-sna*-Expression in den Neuroblasten ist von *Tc-twi* unabhängig und zeigt ein wildtypisches Muster (Abb.3T,V). Allerdings findet man in *twi*-RNAi-Embryonen keine *sna*-Expression in der Wachstumszone (Abb.3T,V,X).

Bei der weiteren Analyse ist daher zu beachten, dass *Tc-twi*-Verlust in frühen Stadien gleichzeitig *Tc-sna*-Verlust bedeutet, wohingegen *Tc-twi* von *Tc-sna* weitestgehend unabhängig exprimiert wird.

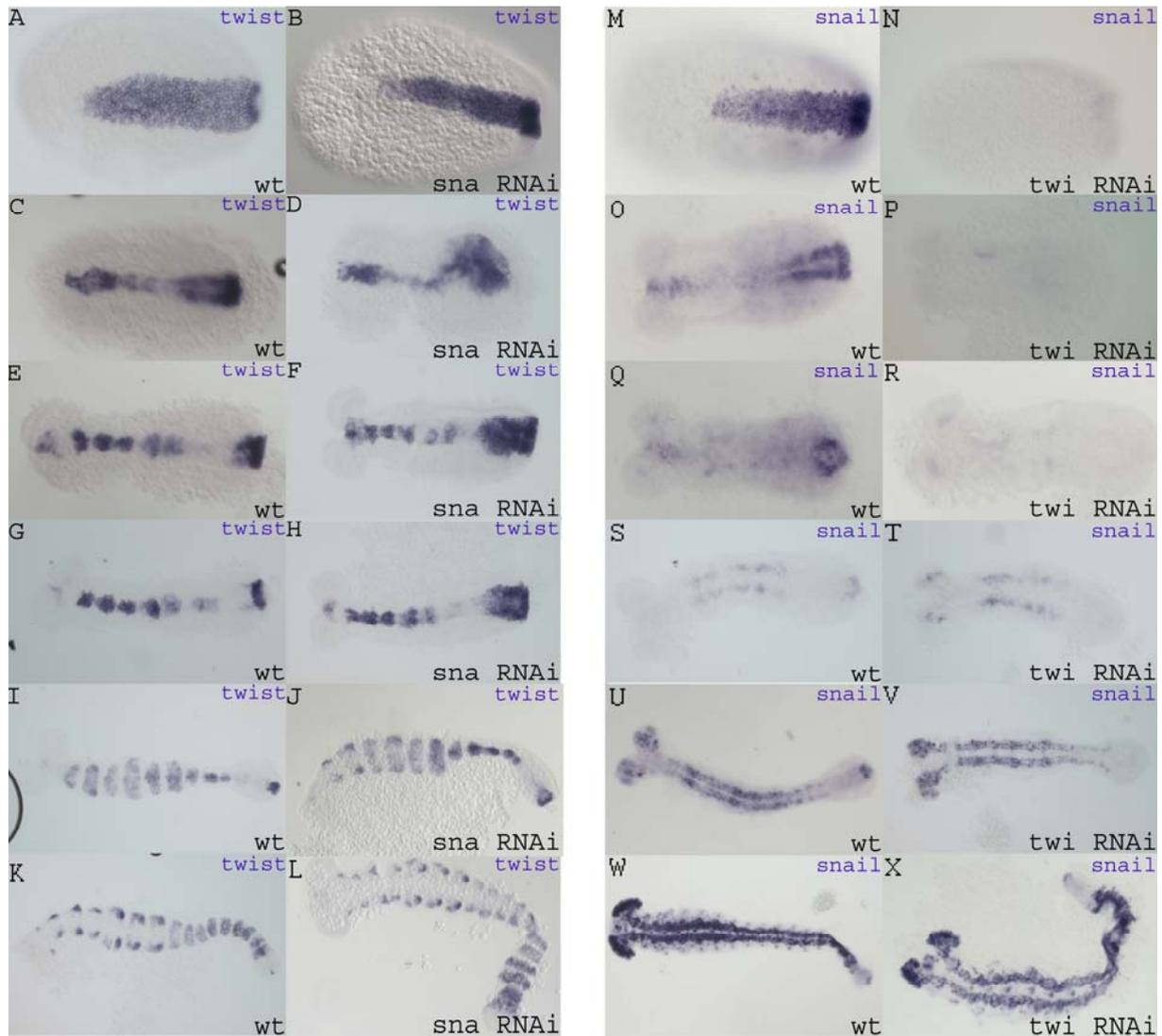


Abb.3: *Tc-twist* wird weitestgehend unabhängig von *Tc-sna* exprimiert, wohingegen *Tc-sna* in frühen Stadien von *Tc-twist* abhängig ist

A,B: Die ventrale *Tc-twist*-Expression in Wt-Blastodermembryonen bleibt in *sna*-RNAi-Embryonen erhalten.

C: Während der Gastrulation wird *Tc-twist* in der Domäne exprimiert, die durch die Ventralfurche internalisiert wird und das Mesoderm bildet. Die ventrale *Tc-twist*-Expression in gastrulierenden *sna*-RNAi-Embryonen bleibt bestehen, auffällig ist allerdings die vergrößerte posteriore Expressionsdomäne, welche auch während der Elongation zu detektieren ist (**F,H,J**). **E,F,G,H,I,J:** *Tc-twist* wird im Laufe der Keimstreifausstreckung im Wt, wie auch in *sna*-RNAi-Embryonen in einem segmentalen Muster exprimiert. **K,L:** Im ausgestreckten Keimstreifembryo verliert die *Tc-twist* Expression ihre ventrale Kontinuität in der thorakalen Region.

M,N: Die ventrale *Tc-sna*-Expression im Blastoderm von Wt-Embryonen ist in *twi*-RNAi-Embryonen nicht vorhanden. Zum Abschluss der Mesoderminternalisierung ist *Tc-sna* in einer anterioren Domäne und in zwei lateralen, posterioren Streifen exprimiert (**O**), wobei sich diese posteriore Domäne zu Beginn der Elongation verkleinert (**Q**). In vergleichbaren Stadien von *twi*-RNAi-Embryonen wird *Tc-sna* nicht exprimiert (**P,R**). In mittleren Keimstreif-Embryonen beginnt die zweite Expressionsphase von *Tc-sna* in den Neuroblasten (**S**). Diese Expression verstärkt sich während der Elongation (**U**). Im ausgestreckten Wt-Keimstreif-Embryo wird *Tc-sna* in den Neuroblasten des ZNS und PNS exprimiert (**W**). *Tc-sna* kann im Wt in der Wachstumszone detektiert werden (**Q,S,U,W**). In *twi*-RNAi-Embryonen wird *Tc-sna* in der Wachstumszone nicht exprimiert (**T,V,X**), jedoch ist die *Tc-sna*-Expression in den Neuroblasten unabhängig von *Tc-twist* (**T,V,X**). Auffällig ist die größere, ventrale Lücke zwischen den lateralen *Tc-sna* exprimierenden Domänen (**V,X**).

3.1.2. Die Morphologie von *twi*- und *sna*-RNAi-Embryonen

Bei *Drosophila* führen *twi*- und *sna*-Mutationen zur Unterdrückung einer wildtypischen Ventralfurchenbildung und der damit verbundenen Mesoderminvagination. Beide Mutationen führen dabei zu sehr charakteristischen Phänotypen, was ihre unterschiedlichen Funktionen während dieser Prozesse unterstreicht.

Um einen ersten Eindruck von der Morphologie der *twi*- und *sna*-RNAi-Embryonen bei *Tribolium* zu gewinnen, wurden *Tc-twi*- und *Tc-sna*-Phänotypen während der Mesoderminvagination, der Elongationsphase und zum Ende der Keimstreifenausstreckung mit Wt-*Tribolium*-Embryonen verglichen.

Zu Beginn des Invaginationsprozesses kommt es im Wt-Embryo zu einer sehr präzisen Bildung der lateralen Einbuchtung (Abb.4A,Pfeil), was in *twi*- sowie *sna*-RNAi-Embryonen nicht zu beobachten ist (Abb.4B,C).

In *twi*-RNAi-Embryonen zeigt die ventrale Region eine ungeordnete Struktur (Abb.4B). In *sna*-RNAi-Embryonen wirkt die caudale Region weit geöffnet und die lateralen Grenzen der ventralen Region erscheinen unregelmäßiger (Abb.4C). Diese Beobachtungen treffen auch auf frühe Embryonen in der Elongationsphase zu (Abb.4D-F).

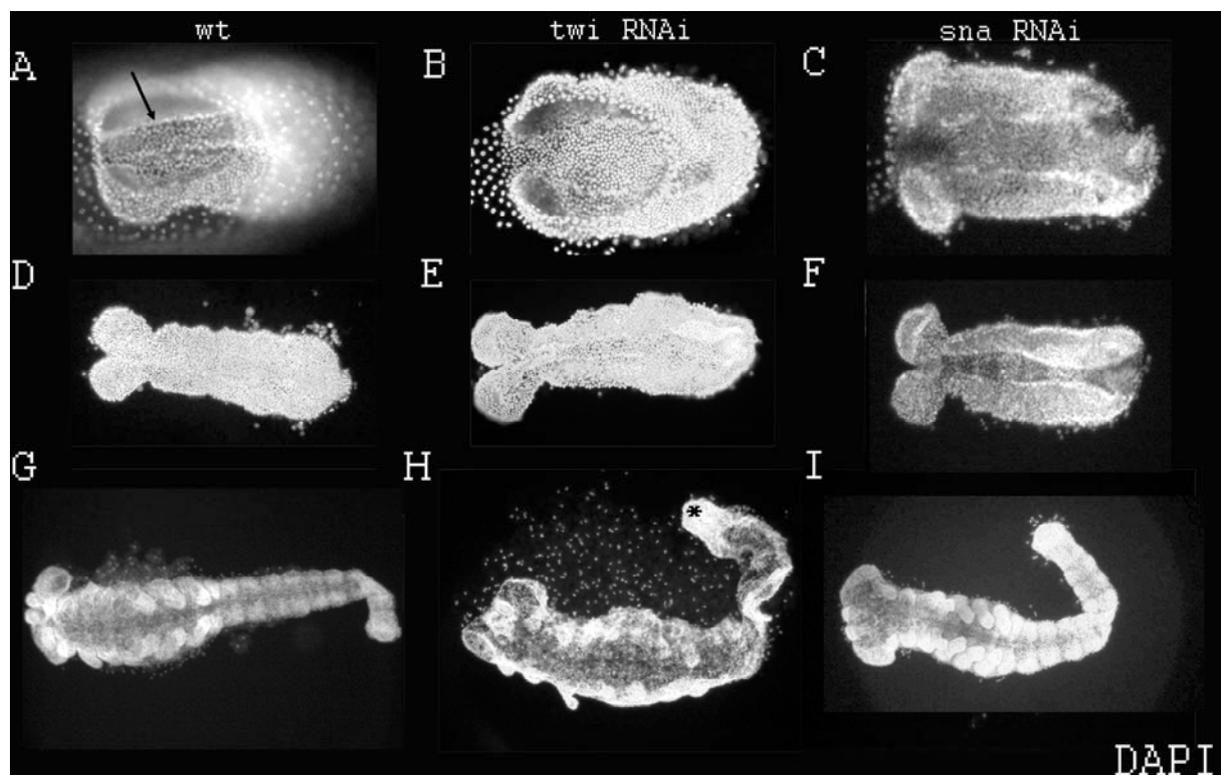


Abb.4: Die Bildung der Ventralfurche in *twi*- und *sna*-RNAi-Embryonen ist gestört und wirkt sich auf die Morphologie elongierender Embryonen aus

A,B,C: Ventralansichten gastrulierender Embryonen während der Mesoderminvagination. Im Wt ist die sehr präzise ektodermale Grenze neben den invaginierenden Zellen erkennbar (**A**, Pfeil). *Tc-twi*- sowie *sna*-RNAi-Embryonen erscheinen dagegen ventral ungeordnet und formen keine wildtypische Ventralfurche (**B,C**). Dies wirkt sich auf die Morphologie elongierender Embryonen aus (**D-F**). Vollständig elongierte *twi*-RNAi-Embryonen sind abdominal verdreht, und ihre Wachstumszone (Stern), sowie der gesamte Embryo erscheinen flach (**H**). **I:** Elongierte *sna*-RNAi-Embryonen wirken wildtypisch, allerdings erscheint die Wachstumszone gegenüber dem Wt vergrößert (**I,G**).

Im Gegensatz zum vollständig elongierten Wt-Embryo, der zu diesem Zeitpunkt aus den drei Schichten Mesoderm, Ektoderm und Amnion besteht (Handel et al., 2005), wirkt der *twi*-RNAi-Keimstreif-Embryo ungeordnet, breiter und flacher, was besonders in der Wachstumszone zu beobachten ist (Abb.4H). Zudem sind die abdominalen Bereiche geknickt und zum Teil verdreht (Abb.4H). Vollständig elongierte *sna*-RNAi-Embryonen wirken, bis auf die vergrößerte Wachstumszone, wildtypisch. (Abb.4I).

Um zu analysieren, was mit den Zellen der im Wt invaginierenden ventralen Region in *twi* und *sna*-RNAi-Embryonen geschieht, wurde F-Aktin mit Phalloidin sichtbar gemacht, Querschnitte wurden unter dem Konfokalmikroskop analysiert.

In einem Querschnitt der mittleren Region eines gastrulierenden Embryos (vergleiche mit Abb. 4A) ist die Invagination der ventralen Zellen zwischen dem Ektoderm erkennbar (Abb.5A). Der Embryo wird von der posterioren Amnionfalte bedeckt (Abb.5A). Im Gegensatz dazu ist das Epithel in *twi*-RNAi-Embryonen weiterhin durchgängig. Außerdem ist keinerlei Invaginationsprozess zu beobachten (Abb.5B).

In *sna*-RNAi-Embryonen (vergleiche mit Abb. 4C) ist zwar eine mesenchymale Struktur der ventralen Zellen ersichtlich, doch diese zeigen keinerlei Invaginationsverhalten, sondern bilden eine große Zellmasse, in der sich die Zellanzahl im Vergleich zum Wildtyp vergrößert hat (Abb.5C). Hier erscheint das laterale Ektoderm weiter auseinander geschoben und bildet starke Erhebungen um die ventrale Zellmasse.

In Schnitten der caudalen Region gastrulierender Embryonen ist im Wt die deutlich dickere Amnionstruktur der posterioren Region erkennbar. Hier ist ebenfalls mesenchymales Gewebe, schon fortgeschrittener als in mittleren Regionen, invaginiert (Abb.5D). In *twi*-RNAi-Embryonen ist auch caudal keine Invagination ventraler Zellen zu beobachten (Abb.5E). In *sna*-RNAi-Embryonen dagegen ist wieder eine große mesenchymale Zellmasse sichtbar, die sich in keiner Weise vom umgebenen Ektoderm abgrenzt (Abb.5F).

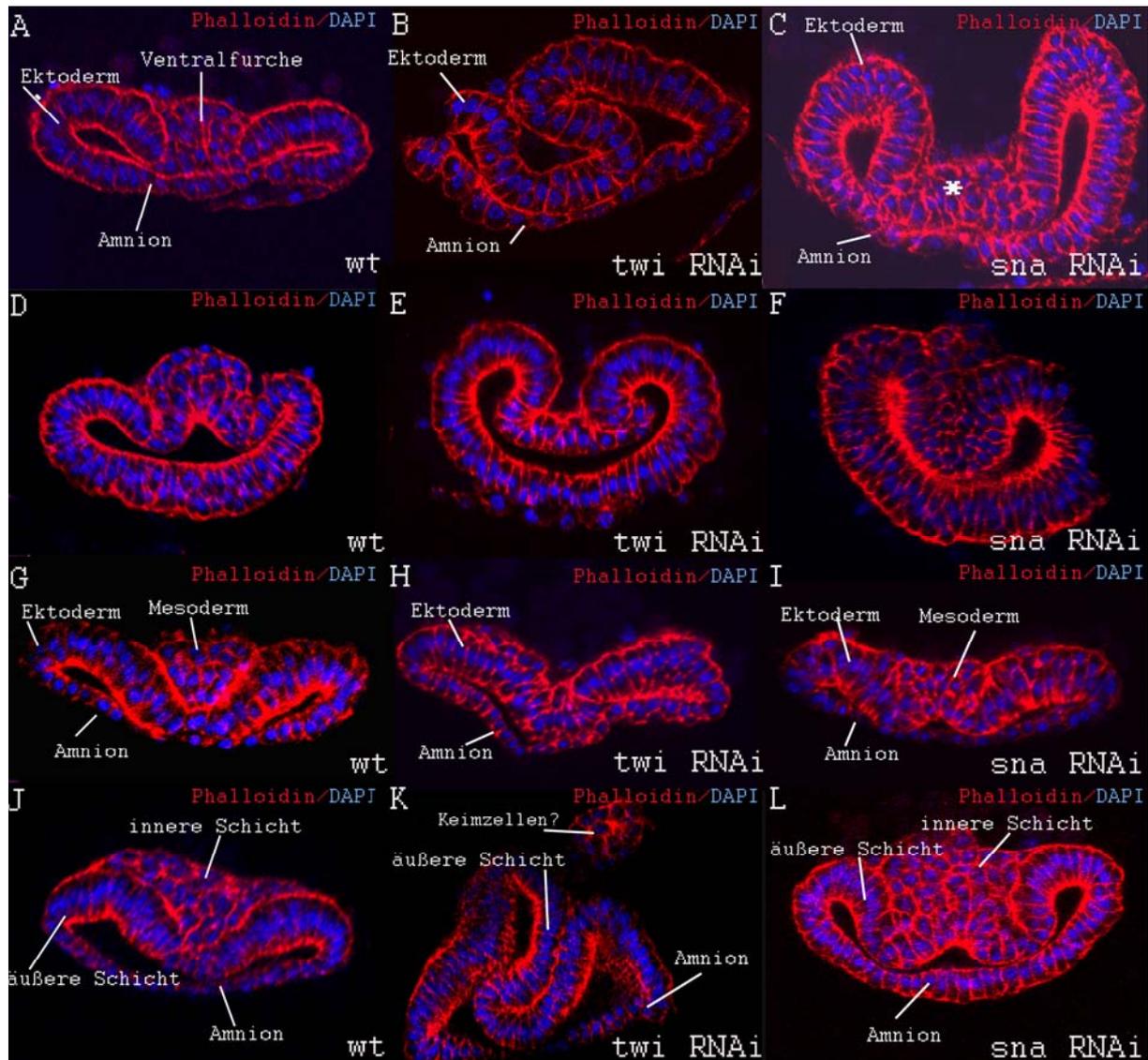


Abb.5: In *twi*-RNAi-Embryone bildet sich keine Ventralfurche und somit kein Mesoderm, wohingegen *sna*-RNAi-Embryonen eine große mesenchymale Zellmasse bilden, die allerdings keine vollständige Abgrenzung zum Ektoderm zeigt

Membranen wurden mit Phalloidin (rot) und DNA mit DAPI (blau) angefärbt.

A-C: Querschnitte durch die Mitte junger, gastrulierender Embryonen (vergleiche mit Abb.4A-C). Während im Wt deutlich die Ventralfurche erkennbar ist (**A**), bleibt das Epithel in *twi*-RNAi-Embryonen zusammenhängend, und es findet keine Invaginationsbewegung statt (**B**). In *sna*-RNAi-Embryonen bildet sich ventral eine mesenchymale Zellmasse. In diesem Stadium ist keine apikale Konstriktion von Zellen, die zu einer Internalisation führen könnte, erkennbar (**C**). **D,E,F:** Querschnitte durch die posteriore Region gastrulierender Embryonen; hier zeigt sich ein ähnliches Bild wie in **A,B,C**; In **F** zeigt sich deutlich die fehlende Abgrenzung der mesenchymalen Zellen vom Ektoderm; **G-I:** Querschnitte durch die Mitte junger Keimstreif-Embryonen (vergleiche mit Abb.3D-F): Während im Wt das Mesoderm vollständig internalisiert ist (**G**), ist in *twi*-RNAi-Embryonen kein Mesoderm vorhanden (**H**). In *sna*-RNAi-Embryonen haben sich mesenchymale Zellen nach innen bewegt, zeigen allerdings auch hier keine vollständige Gewebegrenze von Mesoderm und Ektoderm. Die ventralen Zellen scheinen in der Lage zu sein, sich apikal etwas zu verengen (**I**). **J-L:** Querschnitte durch die Wachstumszone elongierender Keimstreif-Embryonen. Im Wt ist die innere, mesenchymale Schicht deutlich von der äußeren epithelialen Schicht zu unterscheiden (**J**). In *twi*-RNAi-Embryonen ist keine innere Schicht vorhanden (**K**). In *sna*-RNAi-Embryonen ist die innere Schicht vergrößert, allerdings auch hier ohne deutliche Abgrenzung zur äußeren Schicht (**L**).

Während der Keimstreifausstreckung ist in der thorakalen Region von Wt-Embryonen eine deutliche Abgrenzung der nun vollständig invaginierten mesenchymalen Zellen zu beobachten (Abb.5G), wohingegen in *twi*-RNAi-Embryonen keinerlei Zellinternalisierung stattgefunden hat (Abb.5H). In *sna*-RNAi-Embryonen ist keine vollständige Gewebegrenze zwischen Ektoderm und den mesenchymalen Zellen zu erkennen (Abb.5I). Die ventralen Zellen zeigen eine leichte, apikale Konstriktion.

Die Wachstumszone von Keimstreif-Embryonen besteht aus der inneren, mesenchymalen Schicht, welche kontinuierlich in das Mesoderm übergeht, einer äußeren epithelialen Schicht, die kontinuierlich mit dem Ektoderm verbunden ist und der dünnen, epithelialen Schicht, dem Amnion (Abb.5J).

Die Wachstumszone von *twi*-RNAi-Embryonen besteht aus nur einem kontinuierlichen Epithel, welches der äußeren Schicht und dem ventralen Amnion entspricht. Eine innere Schicht ist nicht vorhanden (Abb.5K), was die flache Erscheinung der Wachstumszone in Abb.4H erklärt. In *sna*-RNAi-Embryonen zeigt die innere mesenchymale Schicht eine, im Vergleich zum Wt, erhöhte Zellzahl, hat aber auch hier keine Abgrenzung zur äußeren Schicht erfahren (Abb.5L). Die Wachstumszone von *sna*-RNAi-Embryonen (Abb.4I) ist also durch die höhere Anzahl mesenchymaler Zellen in der inneren Schicht vergrößert.

Um abzusichern, dass *twi*-RNAi-Embryonen keinerlei innere Schicht in ihrer Wachstumszone besitzen, wurde die *Tc-vasa*-Expression in longitudinalen Schnitten der Wachstumszone analysiert. *Tc-vasa*-mRNA wird in den Keimzellen, die sich posterior im Embryo befinden, exprimiert. (Schroder 2006).

Im Wt ist die *Tc-vasa*-positive Zellpopulation, die mit der inneren Schicht der Wachstumszone verbunden ist, deutlich sichtbar (Abb.6A). In *twi*-RNAi-Embryonen ist diese Zellpopulation ebenfalls detektierbar (Abb.6B). Aufgrund der fehlenden inneren Schicht behält diese Population jedoch ihre ballartige Struktur und breitet sich nicht auf der darunter liegenden Schicht aus. Deutlich ist die zweischichtige Struktur aus äußerer Schicht und Amnion erkennbar (Abb.6B). Der longitudinale Schnitt durch die Wachstumszone von *sna*-RNAi-Keimstreif-Embryonen bestätigt vorausgegangene Beobachtungen (vergleiche Abb.3I, 5L). Insgesamt wirkt die Wachstumszone größer, da auch hier die erhöhte Anzahl mesenchymaler Zellen, vor allem in der posterioren Region, zu beobachten sind (Abb.6C).

Die Keimzellen haben sich auch hier auf der darunterliegenden inneren Schicht ausgebreitet (Abb.6C).

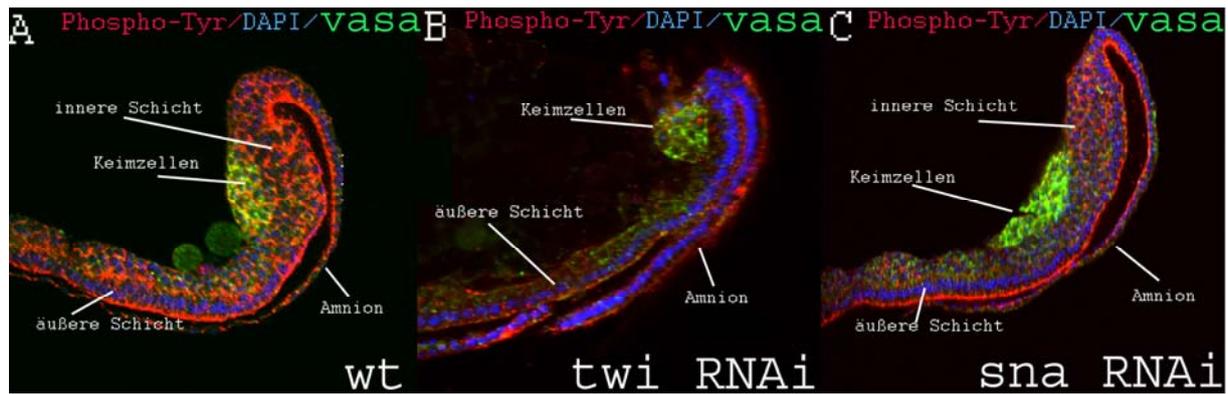


Abb.6: In *twi*-RNAi-Embryonen lagern die Keimzellen auf der äußeren, epithelialen Schicht
Tc-vasa-in situ (grün), Zellmembranen wurden mit Anti-Phospho-Tyrosin (rot) und DNA mit DAPI (blau) angefärbt.

A: Im Wt sind die der inneren Schicht aufgelagerten Keimzellen erkennbar. Diese finden sich auch in *twi*-RNAi-Embryonen, lagern hier aber, da die innere Schicht nicht vorhanden ist, auf der äußeren Schicht der Wachstumszone (**B**). In *sna*-RNAi-Embryonen ist wiederum die vergrößerte Zellmasse der inneren Schicht erkennbar (**C**). *Tc-vasa* exprimierende Keimzellen lagern auf der inneren Schicht (**C**).

3.1.3. Das Mesoderm in *twi*- und *sna*-RNAi-Embryonen

Bei *Drosophila* bilden sowohl *twi*- als auch *sna*-Mutanten kein Mesoderm und sind embryonal letal (Grau et al., 1984).

Der beschriebene *sna*-RNAi-Phänotyp bei *Tribolium* wirft die Frage auf, was mit der zwar invaginierten, aber nicht abgegrenzten Zellmasse in späteren Stadien der Entwicklung passiert. Im Wt gelangen die invaginierten und klar abgegrenzten Zellen zu ihrem Bestimmungsort und bilden dort das Mesoderm.

Um die weitere Entwicklung der invaginierten Zellen nachzuvollziehen, wurden die späten mesodermalen Marker *Tc-tinman* (*tin*) und *Tc-Mef-2* benutzt. Bei *Drosophila* werden diese beiden Gene von *Twi* aktiviert. Dabei reguliert *tin* die Entwicklung des dorsalen Mesoderms und seiner Derivate (Lee et al., 1997), und *Mef-2* ist ein kritischer Faktor für die terminale Differenzierung der verschiedenen Muskelzellen (Lilly et al., 1994; Cripps et al., 1998).

Im Wt wird *Tc-tin* im ausgestreckten Keimstreif in segmental wiederholenden Zellgruppen zwischen dem dorsalen Ektoderm exprimiert (Abb.7A und A'). *Tc-tin*-Expression war, wie erwartet, nicht in *twi*-RNAi-Embryonen zu detektieren (Abb.7B,E), aber überraschenderweise in einem wildtypischen Muster in *sna*-RNAi-Embryonen (Abb.7C). Dieses Ergebnis bestätigte sich in embryonal *sna*-dsRNA injizierten Embryonen (Abb.7F), da in diesen ebenfalls *Tc-tin*, ähnlich wie im Wt (D), exprimiert wird.

In *twi*-RNAi-Embryonen konnte ebenfalls keine *Tc-Mef-2* nicht detektiert werden (Abb.7H), wohingegen *Tc-Mef-2* in *sna*-RNAi-Embryonen in einem wildtypischen Muster exprimiert wird (Abb.7I).

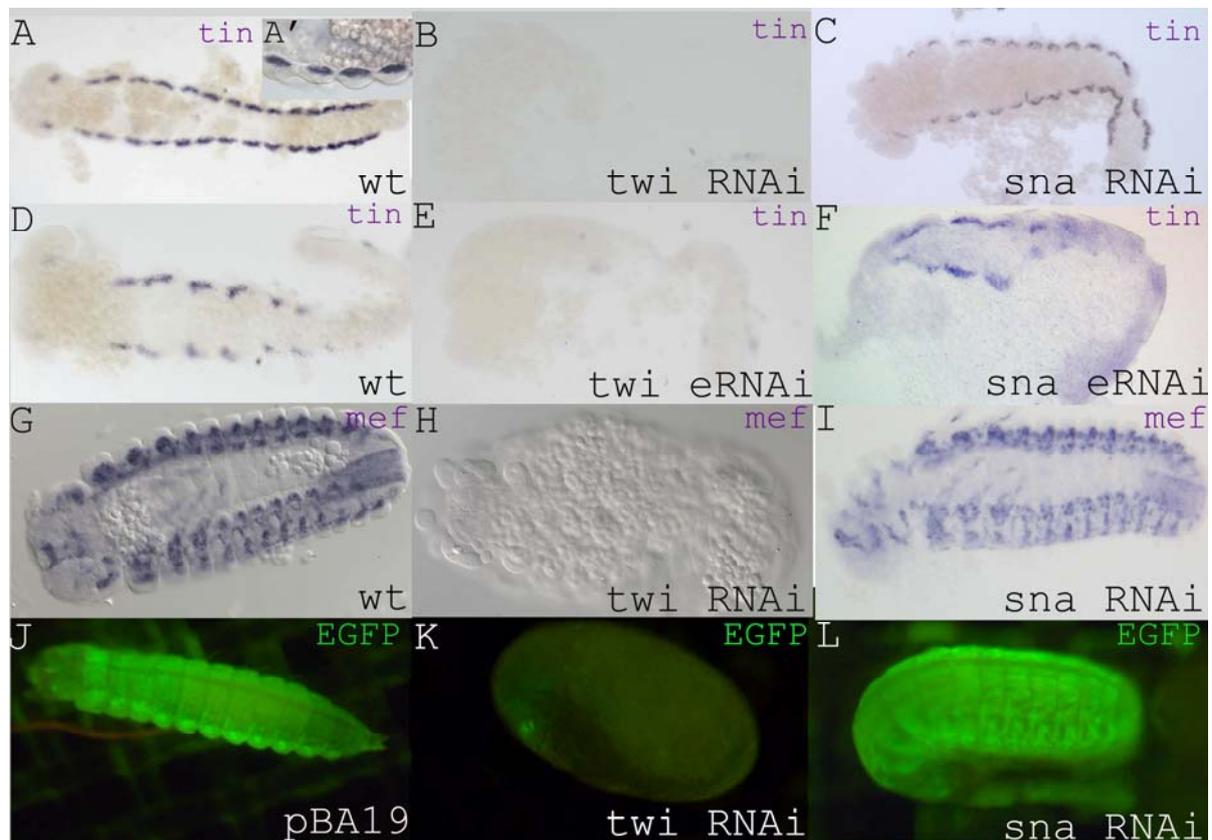


Abb.7: *Tc-twi*-RNAi-Embryonen bilden kein Mesoderm, wohingegen in *sna*-RNAi-Embryonen Mesoderm nachweisbar ist.

Tc-tin- und *Tc-Mef2*-*in situ* Färbungen und EGFP-Expression

Tc-tin wird im dorsalen Mesoderm und *Tc-Mef2* in den entstehenden Muskeln am Ende der Embryogenese exprimiert (A,G). (A' zeigt eine Vergrößerung der *Tc-tin*-Expression zwischen dem dorsalen Ektoderm) *Tc-tin* und *Tc-Mef2* werden nicht *twi*-RNAi-Embryonen exprimiert (B,E,H.), sind in *sna*-RNAi-Embryonen jedoch in einem wildtypischen Muster exprimiert (C,I). Auch nach embryonalen *sna*-dsRNA-Injektionen (eRNAi) war *Tc-tin* detektierbar (F).

Tc-twi- bzw. *Tc-sna*-RNAi-Experimente mit der transgenen Linie pBA19, welche EGFP in den larvalen Muskeln exprimiert (J), bestätigten diese Ergebnisse. *Tc-twi*-RNAi-Larven zeigten, außer der Markerexpression in den Augen, keine EGFP-Expression und schlüpfen nicht (K), während *sna*-RNAi-Larven Muskeln ausbildeten und ein großer Anteil dieser Larven auch schlüpft (L).

Ferner bot sich die transgene Linie pBA19 aus dem Labor von G.Bucher an, welche EGFP (Enhanced Green Fluorescent Protein) in den Muskeln von *Tribolium*-Larven exprimiert. Mit diesem Stamm wurden ebenfalls *Tc-twi*- und *Tc-sna*-RNAi Experimente durchgeführt. In 85% der *twi*-RNAi-Larven ist keinerlei EGFP-Expression zu detektieren (die EGFP-Expression in den Augen dient hier als Markierung eines transgenen Tieres) (Abb.7K). Diese Larven sind

außerdem nicht in der Lage zu schlüpfen, was auf den Verlust des Mesoderms und damit der Muskeln, zurückzuführen ist. *Tc-sna*-RNAi pBA19-Larven zeigen EGFP-Expression, was das Vorhandensein von Muskeln bestätigt. (Abb.7L). Ca. 60% dieser Larven schlüpfen, von denen jedoch nur die Hälfte überlebt.

Beim *Drosophila*-Embryo ist der FGF-Signalweg dafür verantwortlich, dass das invaginierte Mesoderm Kontakt mit dem darunter liegenden Ektoderm aufnimmt und sich so darauf ausbreiten kann (Beiman et al., 1996; Shishido et al., 1997; Gryzik und Muller 2004; Stathopoulos et al., 2004; Seher et al., 2007).

Aus *Tribolium* wurde erfolgreich *Fgf8* kloniert (Beermann und Schröder 2008). *Tc-Fgf8* repräsentiert das einzige orthologe Gen zu *pyramus/thisbe*, den zwei *Fgf8*-Genen bei *Drosophila*. Im gastrulierenden Wt-Embryo wird *Tc-Fgf8* in zwei ektodermalen Streifen, die das zu invaginierende Gewebe umgeben, exprimiert (Abb.8A).

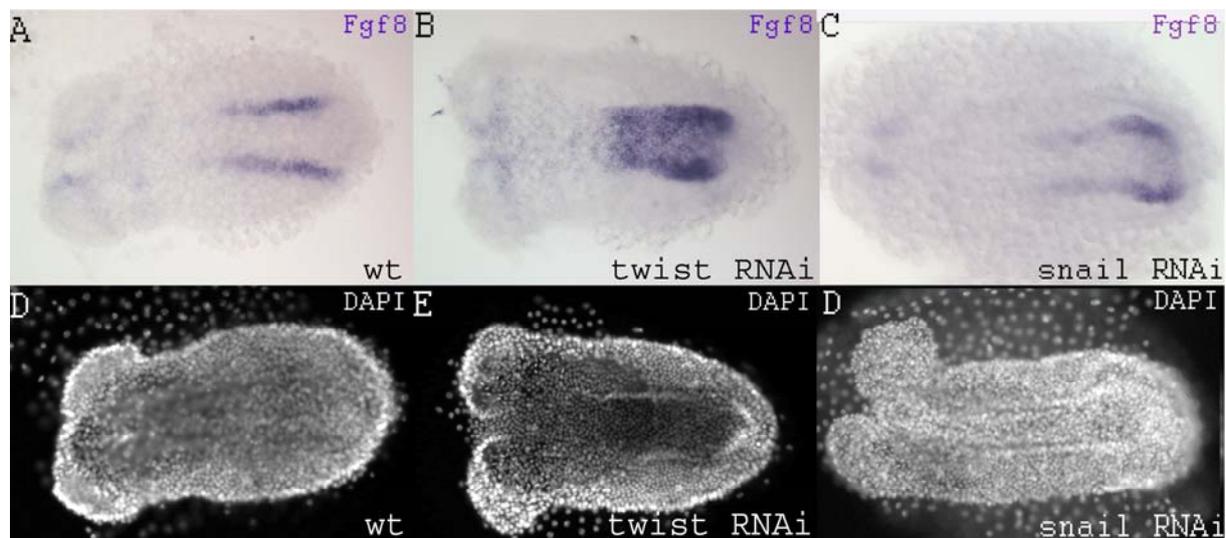


Abb.8: Der funktionierende Tc-FGF-Signalweg in *sna*-RNAi-Embryonen könnte für die zielgerichtete Migration der mesenchymalen Zellmasse verantwortlich sein

Tc-Fgf8-in situ

A-C: Ventralansichten gastrulierender Embryonen und ihre entsprechenden DAPI-Färbungen (**D-F**).

A: *Tc-Fgf8* wird im Wt in zwei ektodermalen Streifen, welche das invaginierende Mesoderm umgeben, exprimiert. Diese Expression ist in *twi*-RNAi-Embryonen expandiert (**B**), während *Tc-FGF8* in *sna*-RNAi-Embryonen ebenfalls in zwei lateralen Streifen exprimiert wird (**C**).

In *twi*-RNAi-Embryonen zeigt sich eine Expansion der *Tc-Fgf8*-Expression in den Bereich zwischen die zwei ektodermalen Streifen. In *sna*-RNAi-Embryonen bleibt die wildtypische *Tc-Fgf8*-Expression in den beiden ektodermalen Streifen bestehen (Abb.8C). Insgesamt kann

der scheinbar intakte FGF-Signalweg in *sna*-RNAi-Embryonen eine mögliche Begründung für die zielgerichtete Bewegung der mesenchymalen Zellen liefern.

3.1.4. Die Auswirkungen des *twi*- bzw. *sna*-Verlustes auf lateral-ektodermal exprimierte Gene

Um einen besseren Einblick in die Regulation von Genen, welche bei *Drosophila* in lateralen Regionen exprimiert werden und für die Entwicklung des Mesektoderms und Neuroektoderms nötig sind, zu bekommen, wurde die Expression von *Tc-single minded* (*Tc-sim*), *Tc-Orthodenticle* (*Tc-OTD*), *Tc-Delta*, *Tc-rhomboid* (*Tc-rho*), *Tc-EGFR* (Epidermal Growth Factor Receptor), *Tc-ventral nerve cord defective* (*Tc-vnd*) und *Tc-short gastrulation* (*Tc-sog*) in *twi*-, *sna*- und zum Teil als Kontrolle in *twi+sna*-RNAi-Embryonen verschiedener Stadien analysiert.

3.1.4.1. *Tc-sim* in *twi*- und *sna*-RNAi-Embryonen

Bei *Drosophila* ist bekannt, dass *Sna* laterale Gene im Mesoderm reprimiert, wodurch es in *sna*-Mutanten zu einer Expression dieser Gene im prospektiven Mesoderm kommt (Leptin 1991; Rao et al., 1991; Cowden und Levine 2002; Seher 2004). So ist die im Wt auf zwei laterale Streifen begrenzte *sim*-Expression in *sna*-Mutanten in ventrale Bereiche expandiert, während beide *sim*-Zelllinien in *twi*-Mutanten näher zusammenliegen und so die mutante Mesodermanlage eng flankieren. In *twi/sna*-Doppelmutanten werden keinerlei mesodermale und mesektodermale Gene exprimiert (Crews et al., 1988; Leptin 1991).

Die präzise, genau eine Zelle breite *sim*-Expression bei *Drosophila* wird durch eine Kombination aus Notch-Signal und *Tw*-Aktivierung erreicht, was durch die Identifikation gekoppelter Dorsal-, *Tw*- und Suppressor of Hairless (*Su(H)*)-Bindestellen in der regulatorischen Region von *sim* bekräftigt wird (Kasai et al., 1992; Cowden und Levine 2002; Morel et al., 2003; Markstein et al., 2004). Dabei spielt *Sna* eine entscheidende Rolle in der Positionierung des Notch-Signales an der mesodermal-mesektodermalen Grenze, wodurch es *sim* in dieser Region positiv reguliert (Cowden und Levine 2002). *Sna* ermöglicht indirekt die Endozytose und intrazelluläre Bewegung des Notch-Liganden *Delta*, wodurch es zu einem präzisen Signal an die benachbarten mesektodermalen Zellen kommt (Morel et al., 2003; Bardin und Schweisguth 2006; De Renzis et al., 2006).

Zinzen et al. (2006) haben allerdings darauf hingewiesen, dass dieser Regulationsmechanismus eine Errungenschaft der Dipteren sein könnte, da *Am-sim* in *Apis*

mellifera (*A. mel.*) allein durch *Tw* und unabhängig von *Notch* reguliert wird, was durch eine breitere *Am-sim*-Expression entlang der Mittellinie belegt wird (Zinzen et al., 2006). *A. mel.* gehört zur Ordnung der Hymenoptera und ist nach neuestem phylogenomischen Studien an die Basis der holometabolen Insekten zu setzen (Savard et al., 2006)

Verschiedene Studien haben auf die wichtige Funktion von *Drosophila-sim* bei der Differenzierungskontrolle der ventralen Mittellinie hingewiesen, da die ektopische *sim*-Expression zur Induktion verschiedener Zielgene, wie z.B. *rho* und *otd* führt (Nambu et al., 1991; Zinzen et al., 2006). Ferner hat *sim* eine wichtige Regulationsfunktion in der Entwicklung lateraler Gewebe (Kim und Crews 1993; Lee et al., 1999; Kim et al., 2005).



Abb.9: *Tc-sim* wird in einer ventralen Domäne im Blastoderm von Wt-, *-twi*- und *sna*-RNAi-Embryonen exprimiert

Tc-sim-in situ

A-C: Blastoderm in Ventralansicht. *Tc-sim* zeigt im Wt (A) wie auch in *twi*-RNAi-Embryonen (B) und *sna*-RNAi-Embryonen (C) eine ventrale Expressionsdomäne.

Ein wichtiger Unterschied der *sim*-Expression zwischen *Tribolium* und *Drosophila*, ist die Expressionsdomäne im Blastoderm, wo *Tc-sim* wie auch *Tc-rho*, *Tc-Delta* und *Tc-sog* in einer ventralen Domäne mit der Mesodermanlage überlappend exprimiert werden (Abb.9A, nicht gezeigt, 10A, 18A). Die ventrale *Tc-sim*-Expressionsdomäne bleibt in *twi*- und *sna*-RNAi-Embryonen erhalten (Abb.9B,C).

Zum Ende der Gastrulation wird *Tc-sim* in zwei, das invaginierende Mesoderm flankierenden, Streifen exprimiert (Abb.10A). Ferner wird *Tc-sim* am posterioren Pol exprimiert. Nach Abschluss der Mesoderminvagination treffen sich die beiden *Tc-sim* exprimierenden Streifen und bilden die Mittellinie in Keimstreif-Embryonen (Abb.10E).

Im Gegensatz dazu ist die *Tc-sim*-Expression in *twi*-RNAi-Embryonen expandiert, vergleichbar der Situation bei *Drosophila-sna*-Mutanten (Abb.10B). In *twi*-RNAi-Embryonen wird *Tc-sna* in frühen Stadien nicht exprimiert. Diese sind daher mit *Drosophila-twi/sna*-

Doppelmutanten zu vergleichen, in denen allerdings kein *sim* mehr exprimiert wird (Rushlow und Arora 1990). Das von *Tc-sim* spezifizierte Gewebe ist bei *Tribolium-twi*- und *twi+sna*-RNAi-Embryonen aber noch vorhanden. (Abb.10B,D). *Tc-twi*- und ebenso *twi+sna*-RNAi-Embryonen zeigen außerdem eine wesentlich breitere *Tc-sim*-Expression entlang der Mittellinie von Keimstreif-Embryonen (Abb.10F,H).

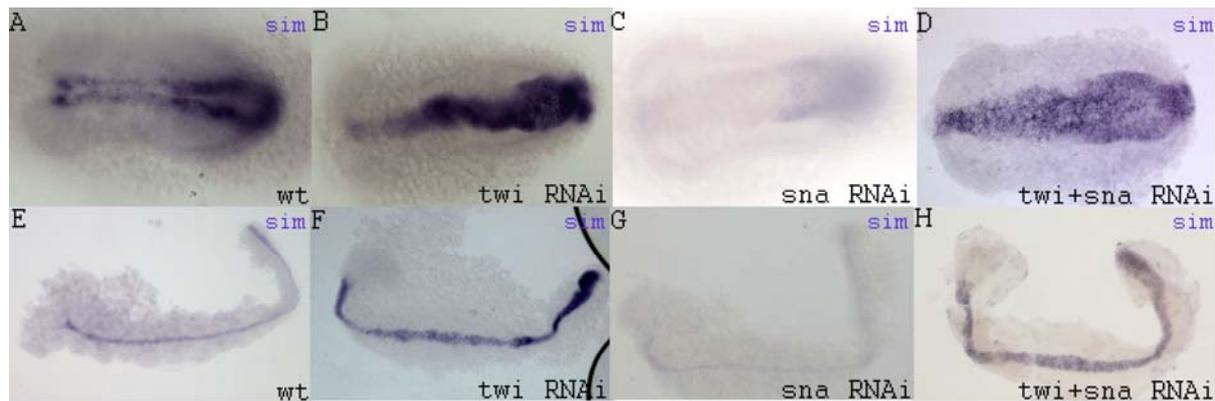


Abb.10: *Tc-sim* wird in einer expandierten Domäne in *twi*- und *twi+sna*-RNAi-Embryonen exprimiert, wohingegen in *sna*-RNAi-Embryonen *Tc-sim* nur schwach nachweisbar ist

Tc-sim-in situ

A-D: Ventralansichten gastrulierender Embryonen **E-H:** Keimstreif-Embryonen, **A:** *Tc-sim* wird in diesem Stadium in zwei lateralen Streifen und am posterioren Pol exprimiert. Nach der kompletten Invagination des prospektiven Mesoderms ist *Tc-sim* entlang der Mittellinie im Keimstreif-Embryo detektierbar (**E**).

In *twi*-RNAi-Embryonen wird *Tc-sim* noch während der Gastrulation in einem breiten ventralen Streifen exprimiert (**B**), und auch die Expression entlang der Mittellinie im Keimstreif-Embryo ist breiter als im Wt (**F**). In *sna*-RNAi-Embryonen ist eine schwache *Tc-sim*-Expression in posterioren Regionen detektierbar (**C**), und auch die Expression entlang der Mittellinie ist schwächer als im Wt (**G**). *Twisna*-RNAi-Embryonen zeigen die gleichen *Tc-sim*-Expressionsdomänen wie *twi*-RNAi-Embryonen (**D,H**).

In *sna*-RNAi-Embryonen ist die *Tc-sim*-Expression in anterioren Regionen nicht mehr detektierbar, während es in posterioren Regionen schwach exprimiert wird (Abb.10C), was auf eine mögliche Aktivatorfunktion von Tc-Sna deuten könnte. Entlang der Mittellinie wird *Tc-sim* in *sna*-RNAi-Embryonen ebenfalls schwach exprimiert (Abb.10G).

Im Wt-Keimstreif-Embryo wird Tc-Otd entlang der Mittellinie in einem zwei bis drei Zellen breiten Streifen exprimiert (Abb.11A,D), was mit den Beobachtungen von Zinzen et al. (2006) übereinstimmt. Der Verlust von *Tc-twi* führt, wie schon bei der *Tc-sim*-Expression beobachtet, zu einer Expansion der Tc-Otd-Expression auf fünf bis sechs Zellen (Abb.11B,E), was eine Kontrollfunktion von *Tc-sim* bei der Differenzierung der ventralen Mittellinie bestätigt. In *sna*-RNAi-Embryonen konnte Tc-Otd nur sehr schwach detektiert werden

(Abb.11), was auf die ebenfalls schwache *Tc-sim*-Expression entlang der Mittellinie zurückzuführen sein könnte (Abb.10G).

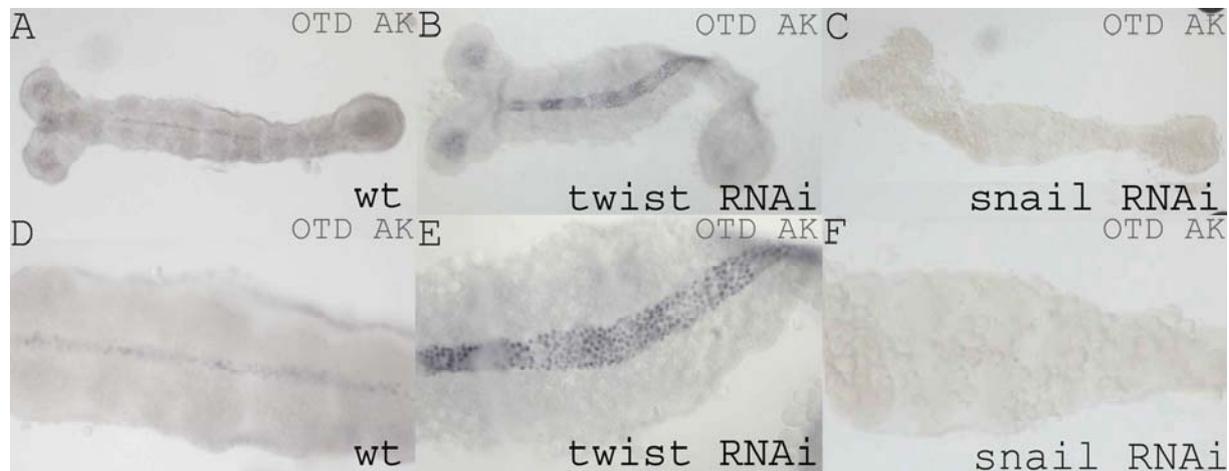


Abb.11: Die Expression von Tc-Otd in *twi*-RNAi-Embryonen bestätigt die breiter angelegte Mittellinie

Tc-OTD-Antikörperfärbung, AK-Antikörper

Elongierende Keimstreif-Embryonen (A-C) mit Vergrößerung ihrer thorakalen Regionen (D-F).

Die Mittellinie im Wt ist 2-3 Zellen breit (A,D), während diese in *twi*-RNAi-Embryonen ca. 5-6 Zellen breit ist (B,E). In *sna*-RNAi-Embryonen ist Tc-Otd kaum nachweisbar (C,F).

3.1.4.2. *Tc-Delta* in *twi*- und *sna*-RNAi-Embryonen

Um zu testen, ob der Notch-Signalweg die Positionierung der zwei *Tc-sim* exprimierenden Streifen reguliert, und ob die aus *Drosophila* bekannte Repressorfunktion von Sna auf *Delta* (Cowden und Levine 2002) konserviert ist, wurde die Expression des Notch-Liganden Delta in *twi*- und *sna*-RNAi-*Tribolium*-Embryonen untersucht.

Wie oben beschrieben wird *Tc-Delta* zunächst ventral im Blastoderm exprimiert (Abb.12A), was eine frühe Repression durch Tc-Sna ausschließt. Dies wurde durch die ventrale *Tc-Delta*-Expression in *sna*-RNAi-Embryonen bestätigt (Abb.12C). Allerdings war *Tc-Delta*, bis auf eine kleine posteriore Domäne, nicht in *twi*-RNAi-Blastoderm-Embryonen nachweisbar, was auf eine frühe Aktivatorfunktion von Tc-Twi auf *Tc-Delta* schließen lässt (Abb.12B). In Embryonen zu Beginn der Elongationsphase wird *Tc-Delta* in einem anterioren querverlaufendem Streifen sowie posterior in zwei lateralen Streifen und am posterioren Pol exprimiert (Abb.12D). In *twi*-RNAi-Embryonen ist *Tc-Delta*, bis auf den anterior querverlaufenden Streifen und die schwache posteriore Expressionsdomäne, nicht exprimiert (Abb.12E).

Dagegen zeigt *Tc-Delta* in *sna*-RNAi-Embryonen eine posteriore Expansion in die ventrale Region, was eine Repressorfunktion von Tc-Sna auf *Tc-Delta* in diesem Stadium vermuten

lässt (Abb.12F). Es ist aber ebenfalls möglich, dass *Tc-Delta* in der vergrößerten mesodermalen Zellmasse von *sna*-RNAi-Embryonen exprimiert wird. In *sna*-RNAi-Embryonen zeigt *Tc-sim* ebenfalls eine leichte Expansion in posterioren Regionen (Abb.10C), was auf einen möglichen Einfluss des Notch-Signales auf *Tc-sim* deuten könnte.

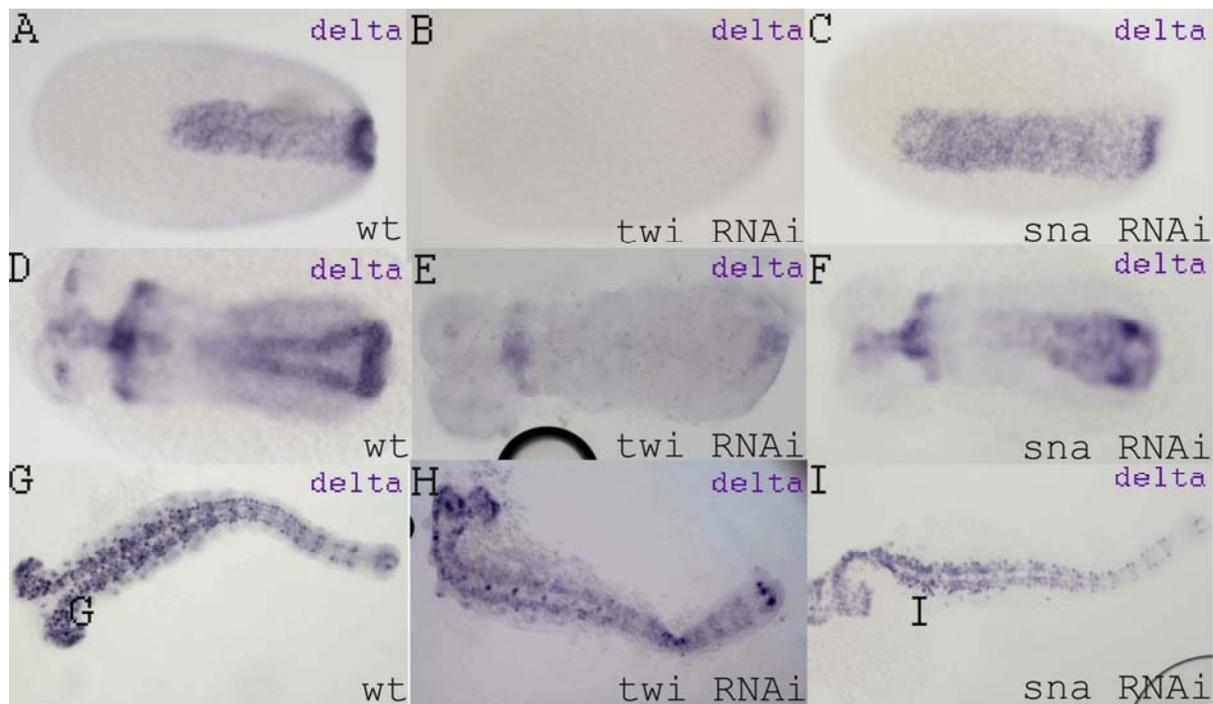


Abb.12: Die *Tc-Delta*-Expression in frühen Stadien ist von *Tc-twi* und *Tc-sna* abhängig

Tc-Delta-in situ

A-C: Ventralansichten von Blastoderm-Embryonen. *Tc-Delta* wird im Wt (A) und in *sna*-RNAi-Embryonen (C) auf der Ventralseite exprimiert. In *twi*-RNAi-Embryonen ist eine schwache posteriore Expressionsdomäne detektierbar (B). **D-F:** *Tc-Delta*-Expression in Embryonen zu Beginn der Elongationsphase in Ventralansicht; in *sna*-RNAi-Embryonen expandiert die *Tc-Delta*-Expression posterior in ventrale Regionen (F im Vergleich mit D). In *twi*-RNAi-Embryonen kann *Tc-Delta* nur schwach in einer posterioren Domäne und im anterior querverlaufenden Streifen detektiert werden (E). **G-I:** Elongierte Keimstreif-Embryonen; im Wt-Embryo wird *Tc-Delta* in den Neuroblasten exprimiert (G). Diese Expression ist ebenfalls in *twi*- und *sna*-RNAi-Embryonen nachweisbar (H,I).

In Keimstreif-Embryonen wird *Tc-Delta* in proneuralen Clustern exprimiert, wo es wahrscheinlich, wie aus *Drosophila* bekannt (Cabrera 1990), die laterale Inhibition, die zu einzelner Neuroblastenbildung führt, reguliert (Abb.12G). *Tc-Delta* wird auch in *twi*- sowie *sna*-RNAi-Embryonen in diesem Muster exprimiert (Abb.12H, I).

3.3.4.3. *Tc-rhomboid* und *Tc-EGFR* in *twi*- und *sna*-RNAi-Embryonen

Ferner wurde die Expression des neuroektodermalen Genes *Tc-rho* in *twi*- und *sna*-RNAi-Embryonen untersucht. In gastrulierenden Wt-Embryonen wird *Tc-rho* ähnlich wie *Tc-sim* in zwei lateralen Streifen und am posterioren Pol exprimiert (Abb.13A). In Keimstreif-Embryonen kann *Tc-rho* entlang der Mittellinie in einem segmentalen Muster detektiert werden (Abb.13E). *Tc-rho* zeigt ebenfalls eine expandierte ventrale Expression in *twi*-RNAi-Embryonen (Abb.13B). Auch die Expression entlang der Mittellinie ist breiter, was einen konservierten Regulationsmechanismus von *sim* auf *rho* bei *Tribolium* vermuten lässt. *Tc-sna*-RNAi-Embryonen zeigen eine zu *Tc-sim*- ähnliche *Tc-rho*-Expression mit einer expandierten, schwachen Expression in posterioren Regionen gastrulierender Embryonen (Abb.13C). Eine schwache Expression entlang der Mittellinie von Keimstreif-Embryonen ist ebenfalls detektierbar (Abb.13G). Als weitere Kontrolle wurde die *Tc-rho*-Expression in *twi+sna*-RNAi-Embryonen untersucht. Hier erhält man ebenfalls das gleiche Ergebnis wie in *twi*-RNAi-Embryonen (Abb.13D,H).

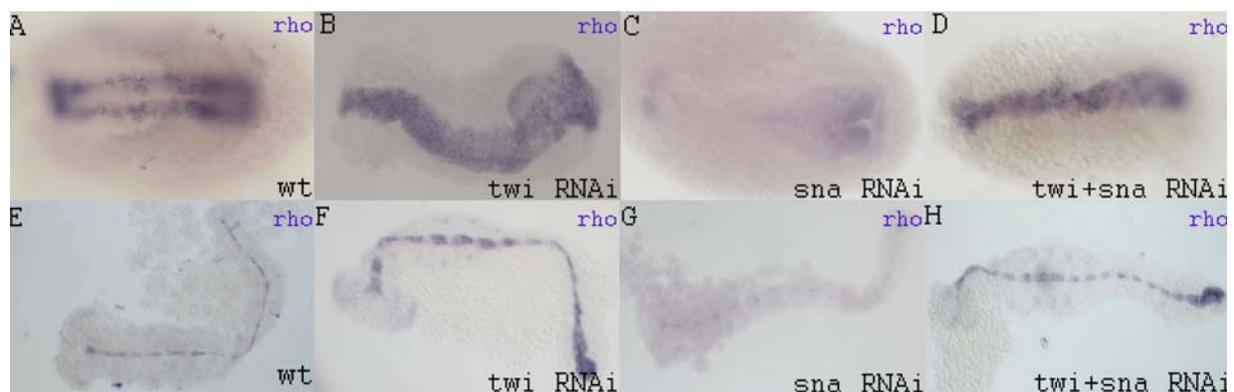


Abb.13: Die *Tc-rho*-Expression ist mit der von *Tc-sim* in *twi*-, *sna*- und *twi+sna*-RNAi-Embryonen vergleichbar

A-D: Ventralansichten gastrulierender Embryonen. Im Wt wird *Tc-rho* in zwei lateralen Streifen und am posterioren Pol exprimiert (A). Diese Expression ist in *twi*- sowie *twi+sna*-RNAi-Embryonen in ventrale Regionen expandiert (B,D). In *sna*-RNAi-Embryonen ist *Tc-rho* posterior schwach und expandiert nachweisbar (C). **E-H:** *Tc-rho*-Expression in Keimstreif-Embryonen: Im Wt-Embryo wird *Tc-rho* in einem segmentalen Muster entlang der Mittellinie exprimiert (E). Diese Expression ist in *twi*- sowie *twi+sna*-RNAi-Embryonen breiter (F,H), während *Tc-rho* in *sna*-RNAi-Embryonen nur schwach entlang der Mittellinie zu detektieren ist (G).

Bei *Drosophila* geht die *rho*-Expression sehr präzise der von aktivierter MAPK (MAPKinase), welche von EGFR aktiviert wird, voraus (Gabay et al., 1997). Ektopische Expression von *rho* führt zur korrespondierenden EGFR-Aktivität, was andeutet, dass Rho ein limitierender Faktor in der EGFR-Aktivierung ist (Sturtevant et al., 1993; Golembo et al.,

1996; Shilo 2003). Kürzlich konnte gezeigt werden, dass Rho, durch die Spaltung der EGF-Signalweg-Komponenten Star und Spitz, den EGF-Signalweg kontrolliert und reguliert, allerdings scheinen auch weitere Mechanismen an der wichtigen Kontrolle des EGF-Signalweges beteiligt zu sein (Tsruya et al., 2007).

Tc-MAPK-Aktivität ist in gastrulierenden Wt-Embryonen in zwei lateralen Domänen, am posterioren Pol und am Rand des Serosafensters, detektierbar. Allerdings zeigt sich eine, im Vergleich mit der *Tc-rho* Expression, breitere anteriore Domäne dieser Streifen (Abb.14A). In Keimstreif-Embryonen ist Tc-MAPK in ventralen epidermalen Zellen aktiv (Abb.14D). In *twi*-RNAi-Embryonen sind höchste Tc-MAPK-Konzentrationen ebenfalls lateral in zwei Streifen detektierbar (Abb.14B). Dies schließt eine direkte regulatorische Funktion von *Tc-rho*, welches in *twi*-RNAi-Embryonen expandiert (Abb.13B), aus und lässt somit einen Unterschied zum EGF-Regulationsmechanismus bei *Drosophila* vermuten.

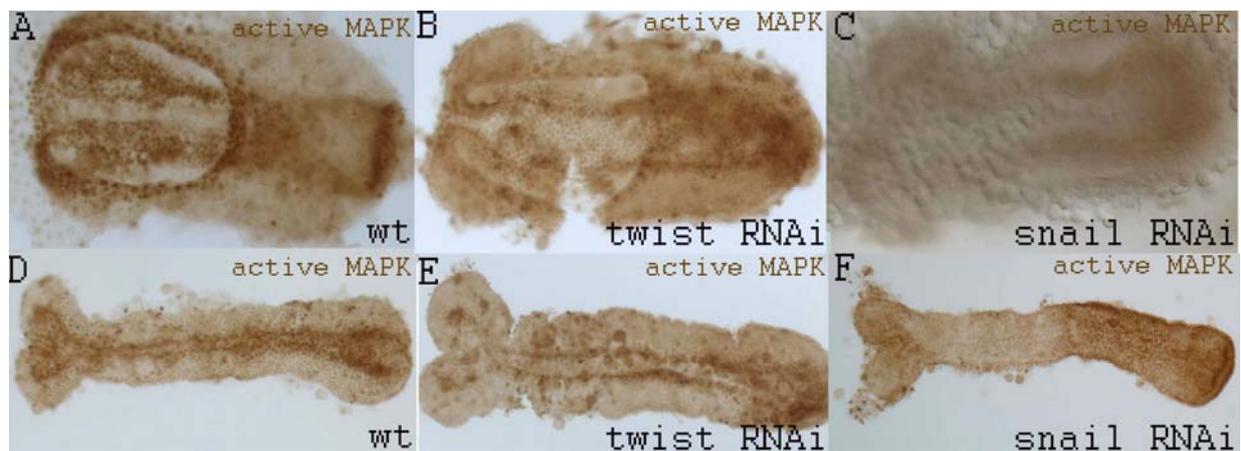


Abb.14: Tc-MAPK folgt nicht der *Tc-rho*-Expression

Tc-MAPK-Antikörperfärbung

A-C: Ventralansicht gastrulierender Embryonen. Im Wt ist Tc-MAPK neben der Serosa und am posterioren Pol, in zwei lateralen Domänen, welche anterior auffächern, aktiv (**A**). In *twi*-RNAi-Embryonen sind höchste Tc-MAPK-Konzentrationen ebenfalls in zwei lateralen Streifen, die allerdings schmäler als im Wt-Embryo ausfallen, detektierbar (**B**). In *sna*-RNAi-Embryonen ist Tc-MAPK sehr schwach posterior zu detektieren.

D-F: Mittlere Keimstreifstadien; im Wt erfolgt Tc-MAPK-Aktivität in zwei ventralen, epidermalen Zellreihen. (**D**). Diese Aktivität ist auch in *twi*-RNAi-Embryonen zu detektieren, allerdings mit größerem Abstand zwischen den ventralen Domänen (**E**). In *sna*-RNAi-Embryonen ist schwache Tc-MAPK-Aktivität in den ventralen Zellreihen detektierbar (**F**).

Auch im Keimstreifstadium von *twi*-RNAi-Embryonen scheint Tc-MAPK die verbreiterte Mittellinie zu flankieren (Abb.14E). Gastrulierende *sna*-RNAi-Embryonen zeigen eine schwache posteriore Tc-MAPK-Aktivität (Abb.14C), die in jungen Keimstreif-Embryonen stärker wird. Eine schwache Aktivität in den ventralen Zellreihen ist detektierbar (Abb.14F).

3.3.4.4. *Tc-vnd* in *twi*- und *sna*-RNAi-Embryonen

Bei *Drosophila* ist EGFR eine Schlüsselkomponente verschiedenster Entwicklungsvorgänge, zu denen auch die Musterbildung im Neuroektoderm gehört (Shilo 2003). Das ZNS von *Drosophila* entwickelt sich aus drei lateralen Domänen neuroektodermaler Zellen entlang der DV-Achse, welche durch die Expression von drei Homeobox Proteinen (kodiert von den sogenannten „columnar“-Genen) definiert werden. *Drosophila-vnd* wird in der medialen Domäne exprimiert, wobei seine Expression von EGFR aufrechterhalten wird (Gabay et al., 1996; von Ohlen und Doe 2000; Shilo 2003; Zhao et al., 2007). Die frühe Aktivierung von *vnd* geschieht durch Dorsal und Twi, wobei *Sna* *vnd* im prospektiven Mesoderm reprimiert (Ip et al., 1992; Kasai et al., 1992; Mellerick und Nirenberg 1995). Sim wirkt indirekt als Repressor auf *vnd*, wodurch dessen ventrale Expression begrenzt wird (Estes et al., 2001).

Für *Tribolium* konnte gezeigt werden, dass das *Tc-vnd*-Expressionsmuster dem von *Tc*-EGFR folgt (Wheeler et al., 2005) (siehe auch Abb.15A,B). Daher wurde auf eine konservierte Rolle dieser Faktoren, während der Bildung neuraler Vorläuferzellen, geschlossen.



Abb.15: *Tc-vnd* und *Tc*-MAPK werden in überlappenden Domänen exprimiert

Tc-vnd-*in situ*, *Tc*-MAPK-Antikörperfärbung

A: Die *Tc-vnd*-Erstexpression im differenzierten Blastoderm erfolgt in zwei lateralen Domänen. **B:** *Tc*-MAPK ist, neben der anterioren Serosa, ebenfalls in lateralen Domänen aktiv.

Die erste Expression von *Tc-vnd*, wie auch die Aktivität von *Tc*-MAPK kann, im Gegensatz zu den ventralen Expressionsdomäne von *Tc-rho*, *Tc-sim* und *Tc-Delta* im Blastoderm, erst zu Beginn der Gastrulation in zwei lateralen Streifen detektiert werden (Abb.15A). Eine Erstaktivierung von *Tc-vnd* durch *Tc*-Dorsal ist daher unwahrscheinlich, da *Tc*-Dorsal in diesem Stadium nicht mehr in den Zellkernen vorhanden ist (Chen et al., 2000).

In gastrulierenden Embryonen wird *Tc-vnd* in zwei lateralen Streifen und in den Kopflappen exprimiert (Abb.16A). In Keimstreif-Embryonen kann *Tc-vnd* entlang der medialen, neuroektodermalen Domänen detektiert werden, welche die Mittellinie flankieren (Abb.16D). In gastrulierenden *twi*-RNAi-Embryonen zeigt *Tc-vnd* eine Expansion seiner Expression in

ventrale Regionen (Abb.16B). Wie Tc-MAPK, wird auch *Tc-vnd* lateral von der verbreiterten Mittellinie dieser Embryonen exprimiert, wodurch ein größerer Abstand zwischen den zwei Domänen entsteht (Abb.16E). In *sna*-RNAi-Embryonen wird *Tc-vnd* vergleichbar mit Tc-MAPK sehr schwach in den lateralen posterioren Domänen gastrulierender Embryonen exprimiert (Abb.16C). In Keimstreif-Embryonen ist ebenfalls eine schwache laterale Expression zu erkennen (Abb.16F), was auch hier mit der beschriebenen Tc-MAPK-Aktivität in *sna*-RNAi-Embryonen (Abb.14F) übereinstimmt.

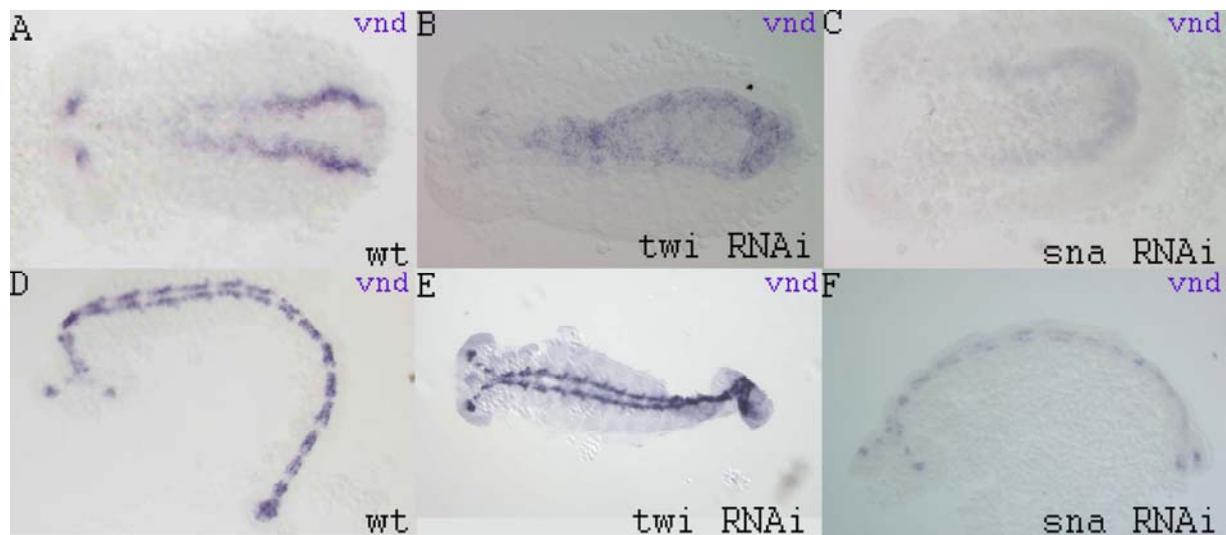


Abb.16: *Tc-vnd* zeigt ähnliche Expressionsdomänen wie Tc-MAPK in *twi*- und *sna*-RNAi-Embryonen
Tc-vnd-in situ

A-C: gastrulierende Embryonen in Ventralansicht. Im Wt wird *Tc-vnd* in zwei lateralen Domänen und in den Kopflappen exprimiert (A). In *twi*-RNAi-Embryonen ist eine ektopische ventrale *Tc-vnd*-Expression detektierbar (B). In *sna*-RNAi-Embryonen wird *Tc-vnd* nur sehr schwach posterior exprimiert (C).

D-F: *Tc-vnd*-Expression in Keimstreif-Embryonen in Ventralansicht. Im Wt erfolgt die *Tc-vnd*-Expression in den beiden medialen Domänen des Neuroektoderms (D). Diese Expressionsdomänen sind, allerdings mit größerem Abstand voneinander, ebenfalls in *twi*-RNAi-Embryonen vorhanden. (E) In *sna*-RNAi-Embryonen wird *Tc-vnd* schwach in den medialen neuroektodermalen Domänen exprimiert (F).

3.1.4.5. Die Entwicklung des Nervensystems in *twi*- und *sna*-RNAi-Embryonen

Die „columnar“-Gene kontrollieren zusammen mit den Segmentpolaritätsgenen die Formierung und die Musterbildung der neuronalen Vorläuferzellen des ZNS bei *Drosophila* (Skeath et al., 1994; Chu et al., 1998; Bhat 1999; Postigo et al., 1999). In diesen proneuralen Clustern werden die achaete-scute (*ac/sc*)-Gene exprimiert, die diesen Zellen das neurale Potential verleihen.

Auch bei *Tribolium* wird das *ac/as*-Gen *Tc-ASH* in proneuralen Clustern exprimiert (Wheeler et al., 2003). *Tc-ASH* wurde als Markergen in *twi*- und *sna*-RNAi-Embryonen benutzt, um bei *Tribolium* zu überprüfen, ob das Mesoderm einen Einfluss auf neurales Gewebe nehmen kann, wie es in Vertebraten beobachtet wurde (Spemann 1938; Gurdon 1987). Für *Drosophila* konnte gezeigt werden, dass Neuroblasten auch in *twi*-Mutanten delaminieren und somit das Mesoderm nicht für ihre Differenzierung nötig ist (Leptin 1991). Auch in Abwesenheit aller drei Mitglieder der *Drosophila*-Sna-Familie verlaufen die ersten Wellen der Neuroblastendelamination normal (Ashraf et al., 1999). *Drosophila*-*twi*- und *twi/sna*-Mutanten zeigen mehr Neuroblasten entlang der Mittellinie als der Wt (Rao et al., 1991).

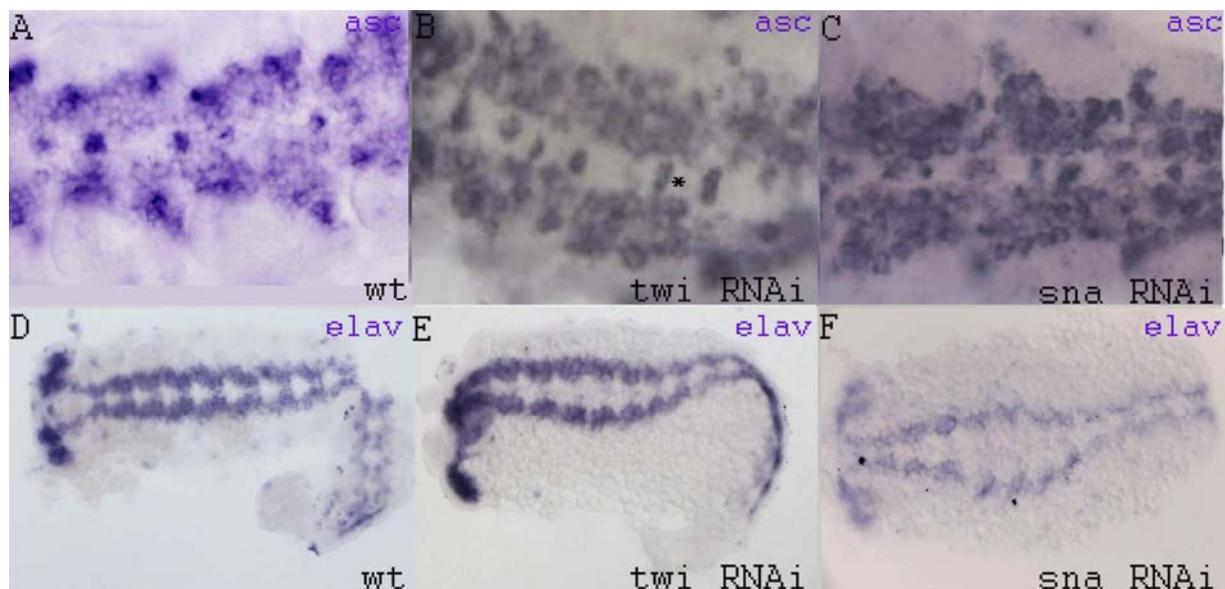


Abb.17: Das Nervensystem wird in *twi*- und *sna*-RNAi-Embryonen gebildet

Tc-ASH- und *Tc-elav*-in situ

A-C: Vergrößerung der thorakalen Region von Keimstreif-Embryonen. *Tc-ASH* wird in den neuronalen Vorläuferzellen exprimiert (A). In *twi*-RNAi-Embryonen hat sich die Anzahl neuronaler Vorläuferzellen entlang der Mittellinie teilweise verdoppelt (Stern). In *sna*-RNAi-Embryonen unterscheidet sich die *Tc-ASH*-Expression nicht vom Wt-Embryo (C). **D-F:** *Tc-elav* wird im ventralen Nervenstrang exprimiert, in *twi*- und *sna*-RNAi-Embryonen ist die ventrale Konnektivität gestört.

Tc-ASH ist in den neuronalen Vorläuferzellen sowie in einem anterioren, ektodermalen Streifen jedes Segmentes exprimiert (Abb.17A). Auch in *twi*- und *sna*-RNAi-Embryonen ist *Tc-ASH* in diesem Muster exprimiert (Abb.17B,C), wobei sich in *twi*-RNAi-Embryonen mehr Neuroblasten entlang der Mittellinie bilden (Abb.17B,Stern), was möglicherweise mit der breiteren Mittellinie in diesen Embryonen begründet werden kann. In *sna*-RNAi-Embryonen wird *Tc-ASH* wildtypisch exprimiert, obwohl die *Tc-vnd*-Expression in *sna*-RNAi-Embryonen schwächer als im Wt-Embryo ausfällt (Abb.16F). Hier ist es zum Einen möglich, dass *Tc-ind* (auch ein „columnar“-Gen spezifisch für die intermediale Domäne), welches von *Tc-vnd* im Wt reprimiert -und nicht nur von *Tc-EGFR* reguliert- wird (Wheeler et al., 2005), mehr Einfluss gewinnt und die nur schwache *Tc-vnd*-Expression ausgleicht. Zum Anderen ist es an dieser Stelle wichtig, die wiederkehrende *Tc-sna*-Expression in den Zellen des ZNS von *sna*-RNAi-Embryonen zu beachten, die ebenfalls einen Einfluss auf die Neuroblastenbildung haben kann.

Um Einblick in spätere Stadien der ZNS-Entwicklung zu erlangen, wurde der ventrale Nervenstrang durch die Expression von *Tc-elav* markiert (*Tc-Glean_14015*) (Abb.17D). Nervenstränge entstehen aus sich teilenden, delaminierenden Neuroblasten, die sich zwischen Neuroektoderm und das invaginierte Mesoderm bewegt haben. Auch in *twi*- und *sna*-RNAi-Embryonen wird der ventrale Nervenstrang gebildet, allerdings kommt es hier zu einer ventralen Lücke in dem sonst ventral verbundenen Nervenstrang (Abb.17E,F).

Bei *Tribolium* erfolgt die Bildung des ZNS also unabhängig vom Mesoderm.

Die breitere Mittellinie in *twi*-RNAi-Embryonen scheint einen Einfluss auf die Morphologie des ventralen Nervenstranges zu haben.

3.1.4.6. *Tc-sog* in *twi*- und *sna*-RNAi-Embryonen

Ein weiteres, bei *Drosophila* lateral exprimiertes Gen ist *sog*. *Drosophila-sog* ist für die Spezifizierung der ventralen Epidermis und des Nervensystems zuständig und wird im Blastoderm ebenfalls von *Sna* im prospektiven Mesoderm reprimiert (Francois et al., 1994). Während bei *Drosophila* nur *brinker/sog* Doppelmutanten zum Verlust des Neuroektoderms führen (Jazwinska et al., 1999), wird bei Verlust von *Tc-sog* bei *Tribolium* keinerlei ZNS gebildet (van der Zee et al., 2006). *Tc-sog* wird im Blastoderm ebenfalls in einer ventralen Domäne exprimiert, die allerdings vor allem anterior breiter ausfällt, als bei den bisher beschriebenen Genen (Abb.18A). In *twi*- und *sna*-RNAi-Embryonen bleibt diese ventrale Expression erhalten (Abb.18B,C).

Zu Beginn der Elongationsphase wird *Tc-sog* im ventralen Ektoderm und in der Wachstumszone exprimiert (Abb.18D). Diese Expression bleibt sowohl in *twi*- als auch in *sna*-RNAi-Embryonen erhalten (Abb.18E,F). Aufgrund der fehlenden inneren Schicht von *twi*-RNAi-Embryonen muss *Tc-sog* hier in der äußeren, epithelialen Schicht der Wachstumszone exprimiert werden (Abb.18E).

Tc-Twi und Tc-Sna scheinen somit keinen direkten Einfluss auf *Tc-sog* zu nehmen, was eine größere Unabhängigkeit des Tc-Sog/Dpp-Systems gegenüber der von Tc-Dorsal etablierten DV-Musterbildung untermauert. Auch in *A. gambiae* konnte gezeigt werden, dass *Ag-sog* in den frühen Stadien ventral exprimiert wird (Goltsev et al., 2007). Die Untersuchung der regulatorischen Region von *Ag-sog* hat außerdem gezeigt, dass diese niederaffine Dorsal-Bindestellen beinhaltet, die vergleichbar mit denen von *twi* und *sna* sind und dadurch nur von den höchsten Dorsal Konzentrationen aktiviert werden. Des Weiteren konnten keine Repressor-Bindestellen für Sna identifiziert werden (Goltsev et al., 2007).

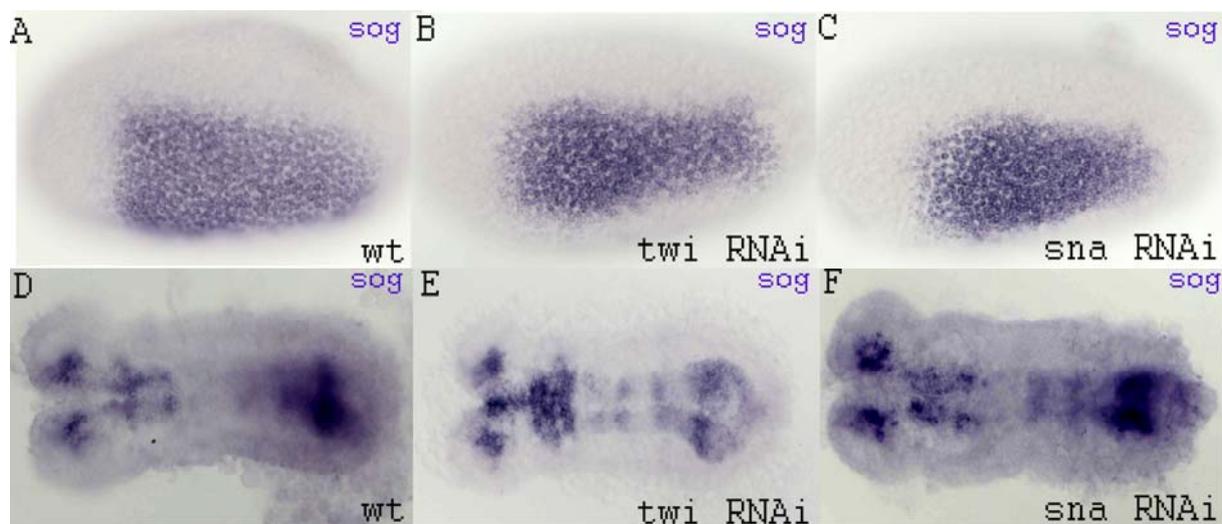


Abb.18: *Tc-sog*-Expression erfolgt unabhängig von *Tc-twi* und *Tc-sna*

Tc-sog-in situ

A-C: *Tc-sog* wird in einer ventralen Domäne, die sich nach anterior verbreitert, im Blastoderm von Wt-Embryonen sowie *twi*- und *sna*-RNAi-Embryonen exprimiert.

D-F: *Tc-sog*-Expression im ventralen Ektoderm und der Wachstumszone früher Keimstreif-Embryonen (E). In *twi*-RNAi-Embryonen wird *Tc-sog* nur in der äußeren Schicht der Wachstumszone exprimiert.

3.1.4.7. *Tc-cactus* und Tc-Dorsal in *twi*-RNAi-Embryonen

Da weder *Tc-twi* noch *Tc-sna* als Aktivatoren der in *twi*-RNAi-Embryonen expandiert exprimierten Genen *Tc-sim* und *Tc-rho* (Abb.10B,13B) in Frage kommen, wurde nach anderen Faktoren gesucht, die in diesem Prozess eine Rolle spielen könnten. Interessant ist die

Beobachtung, dass der Tc-Dorsal Inhibitor *Tc-cactus*, auch noch nach dem Verschwinden von Tc-Dorsal im differenzierten Blastoderm exprimiert wird (Nunes da Fonseca et al., 2008) Somit bleibt die *Tc-cactus*-Expression unabhängig von Tc-Dorsal erhalten. Da *Tc-cactus* in diesem Stadium, wie auch in gastrulierenden Embryonen (Abb.19A), eine mit *Tc-twi* überlappende Expression zeigt (vergleiche Abb.4C), wurde die *Tc-cactus*-Expression in *twi*-RNAi-Embryonen untersucht.

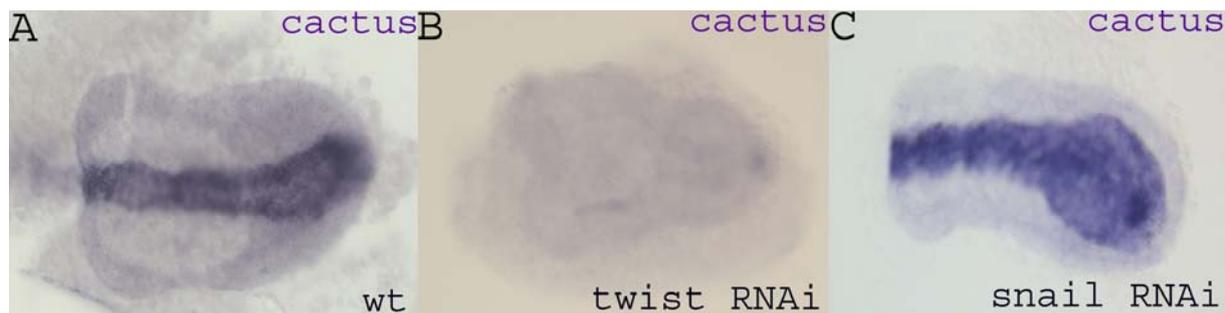


Abb.19: *Tc-cactus*-Expression kann in gastrulierenden *twi*-RNAi-Embryonen nicht detektiert werden *Tc-cactus* wird in einer ventralen Domäne exprimiert (A). In *twi*-RNAi-Embryonen ist *Tc-cactus* kaum noch detektierbar (B). In *snail*-RNAi-Embryonen ist die *Tc-cactus*-Expression posterior stark expandiert (C).

Tc-cactus ist in *twi*-RNAi-Embryonen kaum zu detektieren, was bedeutet, dass *Tc-cactus* ein Zielgen von *Tc-twi* ist (Abb.19B) (Nunes da Fonseca et al., 2008). In *snail*-RNAi-Embryonen ist *Tc-cactus* exprimiert, wobei eine vergrößerte posteriore Expressionsdomäne zu beobachten ist (Abb.19C). Wie bei *Drosophila* fungiert Tc-Cactus als Inhibitor von Tc-Dorsal. Ein Verlust von *Tc-cactus* resultiert in einer verstärkten Aufnahme von Tc-Dorsal in dorsale Kerne (Nunes da Fonseca et al., 2008). Da *Tc-twi* die *Tc-cactus*-Expression während der Gastrulation aufrechterhält, ist es denkbar, dass Tc-Twi die Tc-Dorsal-Kern-Aufnahme über Tc-Cactus kontrolliert. Um dies zu klären, wurde die Tc-Dorsal-Protein-Verteilung während der Gastrulation in *twi*-RNAi-Embryonen mit der im Wt-Embryo verglichen.

Im Gegensatz zu gastrulierenden Wt-Embryonen, in denen Tc-Dorsal nicht mehr in den Kernen vorhanden ist zeigen *Tc-twi*-Embryonen nach wie vor eine ventrale Tc-Dorsal-Akkumulation in den Kernen (Nunes da Fonseca et al., 2008).

Somit konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung von *Tc-cactus* durch Tc-Twi nötig ist, um die Tc-Dorsal Kern-Aufnahme zu terminieren. Tc-Twi ist also für den frühen Verlust des Tc-Dorsal-Gradienten bei *Tribolium*-Embryonen verantwortlich. Tc-Twi scheint also, neben seiner aus *Drosophila* bekannten Rolle als Mesodermdeteminante, eine wichtige Funktion

beim Übergang der maternalen zur zygotischen DV-Musterbildungskontrolle bei *Tribolium* zu haben.

Tc-Dorsal ist im Blastoderm für den ersten ventralen Aktivierungsimpuls von später ventrolateral exprimierten Genen, wie z.B. *Tc-sim* und *Tc-rho*, verantwortlich. Es ist also möglich, dass der länger bestehende ventrale Tc-Dorsal-Gradient in *twi*-RNAi-Embryonen für die weiter bestehende ventrale Expressionsdomäne von *Tc-sim* oder auch *Tc-rho* verantwortlich sein kann. Diese expandierte Expression während der Gastrulation resultiert in einer breiteren Mittellinie.

3.2. Analyse von *twi+sog*-RNAi-Embryonen

Bei *Drosophila* reguliert Dorsal die Expression von ca. 50 Genen entlang der DV-Achse (Stathopoulos und Levine 2002). Für die schnelle Entwicklung von *Drosophila* ist es wahrscheinlich vorteilhaft, dass Dorsal sehr früh die Expressionsdomänen von DV-Musterbildungsgenen einschränkt (Markstein et al., 2002; Stathopoulos et al., 2002).

Bei *Tribolium* scheint Tc-Dorsal keine so zentrale Rolle einzunehmen, da Tc-Dorsal schon im differenzierten Blastoderm nicht mehr in ventralen Kernen akkumuliert ist (Chen et al., 2000). Des Weiteren existieren weniger direkte Tc-Dorsal Zielgene. *Tc-zen* und *Tc-dpp* werden z.B. nicht von Tc-Dorsal reprimiert (Chen et al., 2000) und *Tc-vnd* wird vermutlich, aufgrund seiner erst in der Gastrulation einsetzenden Expression (Abb.15A), unabhängig von Tc-Dorsal aktiviert. *Tc-Toll*-RNAi-Embryonen, welche den gleichen Phänotyp wie *Tc-dorsal*-RNAi-Embryonen zeigen, bilden weder ZNS noch Mesoderm und verlieren die wildtypische Polarität des Ektoderms. In diesen Embryonen wird ektodermales und extraembryonales Gewebe entlang der AP-Achse gebildet. Diese ungewöhnliche Orientierung ist wahrscheinlich das Resultat der frühen asymmetrischen Tc-Dpp-Aktivität entlang der AP-Achse (Nunes da Fonseca et al., 2008). In *Tc-Toll*-RNAi-Embryonen wird weder *Tc-sog* noch *Tc-twi* exprimiert (Nunes da Fonseca et al., 2008). Bei *Tribolium* etabliert Tc-Sog die DV-Polarität der Tc-Dpp-Aktivität, wohingegen bei *Drosophila* Dorsal *dpp* direkt reprimiert (van der Zee et al., 2006).

Im Gegensatz zu *Drosophila*, wo der Verlust von *sog* lediglich zu geringen Nervensystemdefekten führt, bilden *sog*-RNAi-Embryonen bei *Tribolium* kein ZNS und bestehen nur aus Ektoderm und Mesoderm (van der Zee et al., 2006). In diesen Embryonen bildet sich zusätzlich zum wildtypischen dorsalen Ektoderm ebenfalls dorsales Ektoderm beidseitig der Mittellinie. Sowohl im Ektoderm von *Toll*- als auch von *sog*-RNAi-Embryonen scheint also ein Tc-Dpp-abhängiger Musterbildungsprozess stattzufinden. Aufgrund der weniger zentralen Rolle von Dorsal bei *Tribolium* ist es vorstellbar, dass ein gemeinsamer Verlust der Tc-Dorsal-Zielgene *Tc-twi* und *Tc-sog* zu einem *Tc-Toll*-RNAi-ähnlichen Phänotyp führt. *Tc-twi*-RNAi führt zum Verlust des Mesoderms, und *sog*-RNAi verhindert die wildtypische DV-Polarität der Tc-Dpp-Aktivität.

Doppelsträngige RNAs von *Tc-twi* und *Tc-sog* wurden zusammen injiziert. 48% dieser Embryonen (n=53) exprimierten weder *Tc-twi* noch *Tc-sog* und zeigten einen spezifischen Phänotyp. Dieser stärkste Phänotyp wird im Folgenden beschrieben.

3.3.1. *Tc-pannier* in *twi+sog*-RNAi-Embryonen

Tc-pannier (*pnr*) ist ein Zielgen von Tc-Dpp und wird ebenfalls im dorsalen Ektoderm exprimiert (Abb.21A) (van der Zee et al., 2006). In *Toll*-RNAi-Embryonen kommt es zu einer periodischen, ringförmigen *Tc-pnr*-Expression entlang der AP-Achse, was auf ein selbstorganisierendes, in Abwesenheit von Tc-Dorsal wirkendes Musterbildungssystem deutet (Abb.21B) (Nunes da Fonseca et al., 2008).

In *sog*-RNAi-Embryonen wird *Tc-pnr*- wie *Tc-dpp*-, neben der dorsalen Expression, beidseitig der Mittellinie exprimiert (Abb.21C) (van der Zee et al., 2006). Dieser Phänotyp wurde als „Doppel-dorsal“-Phänotyp bezeichnet (van der Zee et al., 2006).

In *twi+sog*-RNAi-Embryonen ist *Tc-pnr* nur noch in einzelnen Zellgruppen entlang der AP-Achse detektierbar (Abb.21D). In posterioren Regionen nimmt die Zahl der *Tc-pnr* exprimierenden Zellen zu (Abb.21D). Der gemeinsame Verlust von *Tc-twi* und *Tc-sog* führt also weder zu einem *Tc-Toll*-RNAi ähnlichen Embryonen noch zum „Doppel-dorsal“-Phänotyp von *Tc-sog*-RNAi-Embryonen. Der Verlust des Mesoderms in *twi+sog*-RNAi-Embryonen scheint also Einfluss auf die Dpp-Aktivität zu nehmen,

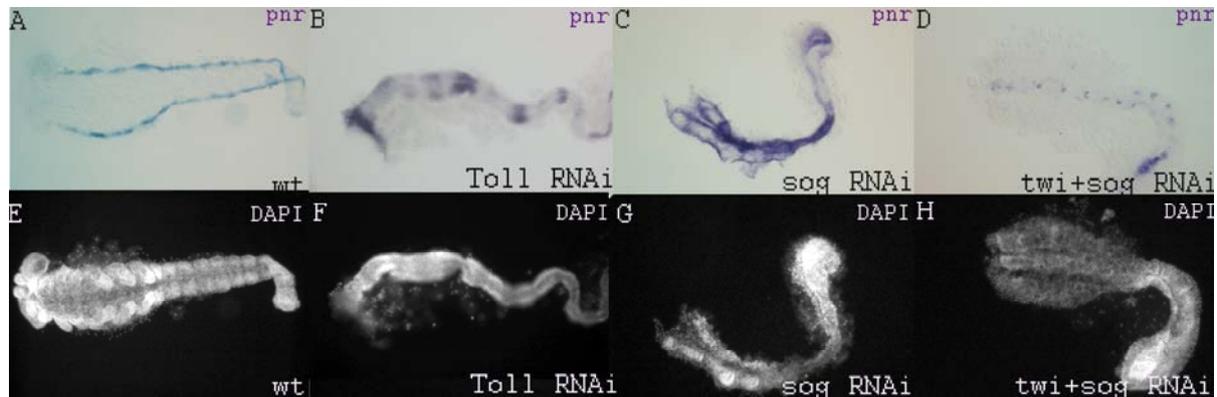


Abb.21: *Tc-twi+sog*-RNAi-Keimstreif-Embryonen zeigen trotz Verlust von Mesoderm und ZNS einen anderen Phänotyp als *Toll*-RNAi-Embryonen und führen nicht zum „Doppel-dorsal“-Phänotyp von *sog*-RNAi-Embryonen

Tc-pnr- in situ

A-D: *Tc-pnr*-Expression in Keimstreif-Embryonen und ihre korrespondierenden DAPI-Färbungen (E-H). *Tc-pnr*-Expression im dorsalen Ektoderm von Wt-Embryonen (A). In *Toll*-RNAi Embryonen kommt es zu einer periodischen ringförmigen *Tc-pnr*-Expression (B). In *sog*-RNAi-Embryonen wird *Tc-pnr* neben der Expression im dorsalen Ektoderm beidseitig der Mittellinie exprimiert (C). In *twi+sog*-RNAi-Embryonen ist *Tc-pnr* nur noch in Zellgruppen entlang der AP-Achse detektierbar (D).

3.3.2. *Tc-sna* in *twi+sog*-RNAi-Embryonen

Als weiteres Markergen für *twi+sog*-RNAi-Embryonen wurde *Tc-sna*, welches in den Neuroblasten des ZNS und des peripheren Nervensystems (PNS) exprimiert wird, verwendet

(Abb.22A). Wie *Tc-pnr* zeigt auch *Tc-sna* in *Toll*-RNAi-Embryonen ein periodisches, ringförmiges Muster entlang der AP-Achse des Embryos (Abb.22B), wobei diese Zellen dem dorsalen ZNS zuzuordnen sind (Nunes da Fonseca et al., 2008). Im Gegensatz dazu wird *Tc-sna* in *twi+sog*-RNAi-Embryonen in einzelnen Zellen entlang der AP-Achse exprimiert (Abb.22D). Da das *Tc-sna*-Expressionsmuster in den Neuroblasten von *twi*-RNAi-Embryonen nicht verändert ist (Abb.3X), *Tc-sna* in *sog*-RNAi-Embryonen aber nur in den Neuroblasten des PNS zu detektieren ist (van der Zee et al., 2006) (Abb.22C Pfeil), ist es wahrscheinlich, dass die *Tc-sna* exprimierenden Zellen von *twi+sog*-RNAi-Embryonen ebenfalls dem PNS zuzuordnen sind. Es bestätigt sich erneut, dass *twi+sog*-RNAi-Embryonen weder den *Toll*-RNAi-Phänotyp mit einer ringförmigen *Tc-sna*-Expression noch den *sog*-RNAi-Phänotyp mit der geordneten Abfolge *Tc-sna*-exprimierender PNS-Zellen zeigen.

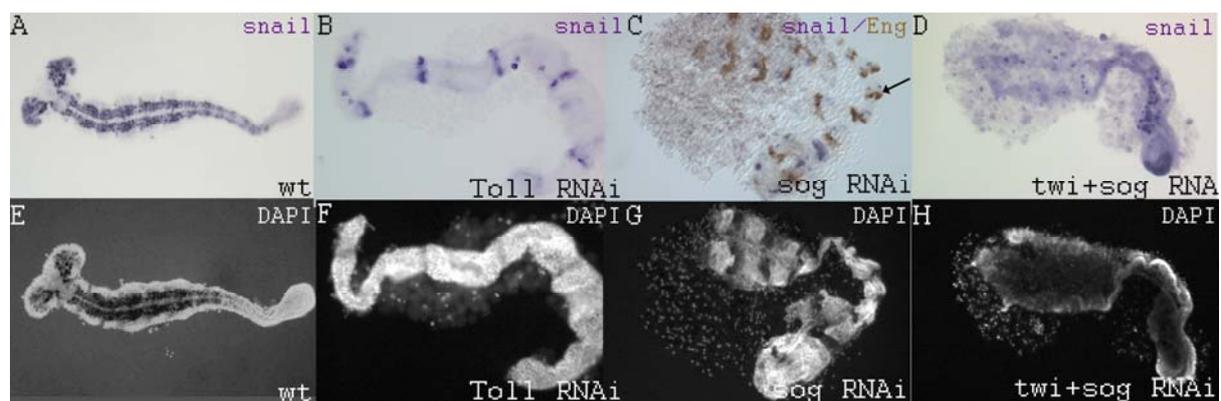


Abb.22: *Tc-sna* in *twi+sog*-RNAi-Keimstreif-Embryonen zeigt ebenfalls eine andere Expression als in *Toll*- und *sog*-RNAi-Embryonen

Tc-sna-in situ und in C zusätzlich Engrailed (Eng) Antikörperfärbung

A-D: *Tc-sna*-Expression in Keimstreif-Embryonen und ihre korrespondierenden DAPI-Färbungen (**E-H**). *Tc-sna* wird in den Neuroblasten des ZNS und des PNS im Wt-Embryo exprimiert (**A**). In *Toll*-RNAi-Embryonen wird *Tc-sna* in einem periodischen, ringförmigen Muster exprimiert (**B**). In *twi+sog*-RNAi-Embryonen ist *Tc-sna* nur in einzelnen Zellen detektierbar (**D**), welche vermutlich Zellen des PNS entsprechen, da *Tc-sna* in *sog*-RNAi-Embryonen nur in den Zellen des PNS nachweisbar ist (**C**, Pfeil).

3.2.3. *Tc-sim* in *twi+sog*-RNAi-Embryonen

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass *Tc*-Dorsal in *twi*-RNAi-Embryonen länger in den ventralen Kernen akkumuliert (Abb.20B) und möglicherweise weiterhin frühe Zielgene wie *Tc-sim* und *Tc-rho* in einer ventralen Domäne aktiviert (Abb.10B,13B). In Keimstreif-Embryonen werden *Tc-sim* und *Tc-rho* in einer breiteren Domäne entlang der Mittellinie exprimiert (Abb.10F,13F).

Die breitere *Tc-sim*-Expressionsdomäne entlang der Mittellinie ist auch in *twi+sog*-RNAi-Embryonen detektierbar (Abb.23C), wohingegen in *Toll*-RNAi-Embryonen *Tc-sim* nicht exprimiert wird (Abb.23B). Der länger bestehende Tc-Dorsal-Gradient nach einem *Tc-twi*-Verlust ist möglicherweise für die anhaltende Aktivierung von *Tc-sim* verantwortlich.

In *twi+sog*-RNAi-Embryonen ist demnach noch DV-Polarität vorhanden, die die Bildung von ektodermalem und extraembryonalem Gewebe entlang der AP-Achse, wie es in *Toll*-RNAi-Embryonen auftritt, verhindert.

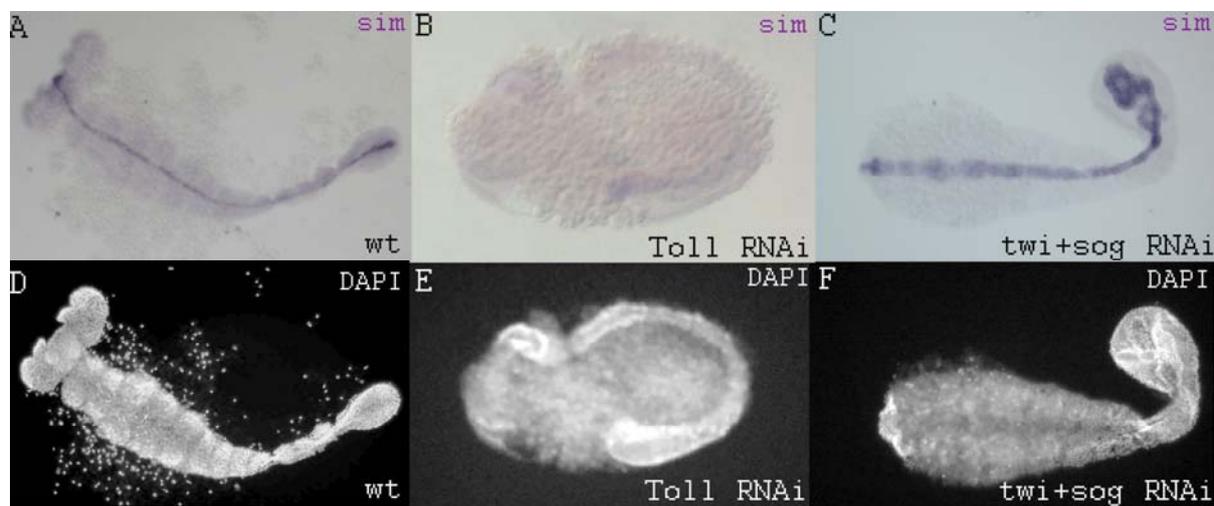


Abb.23: In *twi+sog*-RNAi-Embryonen kommt es zu einer Expansion der *Tc-sim*-Expression

Tc-sim-in situ

A-C: *Tc-sim*-Expression in Keimstreif-Embryonen und ihre korrespondierenden DAPI-Färbungen (**D-F**). *Tc-sim* wird im Wt-Embryo entlang der Mittellinie exprimiert (**A**). In *Toll*-RNAi-Embryonen ist *Tc-sim* (abgesehen von einer schwachen Domäne in der Wachstumszone) nicht detektierbar (**B**). In *twi+sog*-RNAi-Embryonen wird *Tc-sim*, wie auch in *twi*-RNAi-Embryonen, in einer breiteren Domäne entlang der Mittellinie exprimiert.

3.3. Die Funktion von *concertina (cta)* bei *Tribolium*

Um zu verstehen, wie Transkriptionsfaktoren einen Entwicklungsvorgang, wie z.B. den Invaginationsprozess steuern, ist es notwendig jene Zielgene zu kennen, die letztendlich für Zellformveränderungen verantwortlich sind. Bei *Drosophila* agieren die *twi*-Zielgene *T48* und *folded gastrulation (fog)* in parallelen Signalwegen, um eine Umordnung des Zytoskelettes in ventralen Zellen zu organisieren (Kolsch et al., 2007). *Drosophila*-Fog agiert dabei im gleichen Signalweg wie Concertina (Cta), denn beide Mutationen führen zu unorganisierten Zellformveränderungen in der Ventralfurche und in der posterioren Mitteldarminvagination (Parks und Wieschaus 1991; Costa et al., 1994).

Ventrale, invaginierende Zellen zeigen bei *Tribolium* eine ungleichmäßigere Struktur im Vergleich als bei *Drosophila*. Sie zeigen Ähnlichkeit zu *Drosophila-fog*-Mutanten zu vergleichen (Handel et al., 2005; Goltsev et al., 2007).

Um zu überprüfen, inwieweit die o.g. Gene und ihre Funktionen während der Ventralfurchenbildung bei *Tribolium* konserviert sind, wurde im *Tribolium*-Genom nach homologen Sequenzen gesucht. Eine mögliche, homologe *T48*-Sequenz konnte identifiziert werden. Diese zeigte 34% Proteinidentität zu *Drosophila*. Das potentielle *Tc-T48* wurde kloniert (*Tc-Glean_15982*) und *in situ*-Färbungen und RNAi-Experimente ausgeführt. Es konnte weder Expression in detektierbaren Mengen festgestellt noch phänotypische Veränderungen in *T48*-RNAi-Embryonen beobachtet werden.

Im *Tribolium*-Genom konnte kein eindeutiges *fog*-Homolog identifiziert werden. Interessanterweise konnte auch in der Diptere *A. gambiae*, welche ebenfalls eine ungeordnete Mesoderminvagination zeigt, kein *fog*-Homolog gefunden werden (Goltsev et al., 2007). Die Autoren weisen darauf hin, dass Fog eine Errungenschaft der höheren Dipteren sein könnte, um eine schnelle und effiziente Gastrulationsbewegung zu gewährleisten.

Allerdings fand sich ein *cta*-Homolog mit 66% Proteinidentität bei *Tribolium* (*Tc-Glean_00634*). Dies war unerwartet, da *fog* und *cta* bei *Drosophila* wahrscheinlich im selben Signalweg operieren. *Drosophila*-Cta bildet die α -Untereinheit eines G-Proteins, die an einen bisher nicht identifizierten Rezeptor gekoppelt ist, und Fog könnte den Liganden dieses Rezeptors repräsentieren (Morize et al., 1998). Es ist möglich, dass *Tc-fog* bei *Tribolium* mit Standardmethoden nicht identifiziert werden konnte oder dass ein anderer Ligand bei *Tribolium* vorhanden ist.

Tc-cta wird ubiquitär in Wt-Embryonen exprimiert. *Tc-cta*-dsRNA-Injektionen führten in ca. 78% der analysierten Embryonen (n=98) zu einem starken Phänotyp, der im Folgendem anhand von Querschnitten analysiert wird.

3.3.1. Die Morphologie von *cta*-RNAi-Embryonen

Im Gegensatz zu gastrulierenden Wt-Embryonen, in dem die Bildung der Ventralfurche und das den Embryo überdeckende Amnion deutlich zu erkennen ist, zeigen *cta*-RNAi-Embryonen, vergleichbaren Stadiums eine schüsselartige Struktur in der posterioren Region (Abb. 24A,B).

Um diesen Phänotyp besser zu verstehen, wurden Querschnitte an verschiedenen Positionen entlang der AP-Achse angefertigt. Beim Vergleich thorakaler Schnitte von gastrulierenden Wt-Embryonen (Abb.24C) und *cta*-RNAi-Embryonen, zeigt sich in *cta*-RNAi-Embryonen zum Einen, dass sich das dorsale Ektoderm nicht nach ventral biegt und zum Anderen, dass hier ventral internalisierte Zellen vorhanden sind (Abb.24D). Allerdings ist zu diesem Zeitpunkt keine ventrale Furche in *cta*-RNAi-Embryonen zu erkennen (Abb.24D).

Apikale Konstriktionen ventraler Zellen sind in einem mittleren Querschnitt gastrulierender *cta*-RNAi-Embryonen zu beobachten (Abb.24F). Das Amnion hat sich in diesen Embryonen nicht über das posteriore Ende des Embryos bewegt und verbleibt auf der dorsalen Seite, wodurch es zur Entstehung der schüsselartigen Struktur kommt. Bemerkenswert ist hier die Ähnlichkeit mit einem Querschnitt durch einen *Drosophila*-Embryo während der Ventralfurchenbildung (siehe Abb.1.5B).

Des Weiteren wurden auch Querschnitte durch die Wachstumszone angefertigt, um die Anordnung der verschiedenen Schichten in *cta*-RNAi-Embryonen sichtbar zu machen (Abb.24H,J).

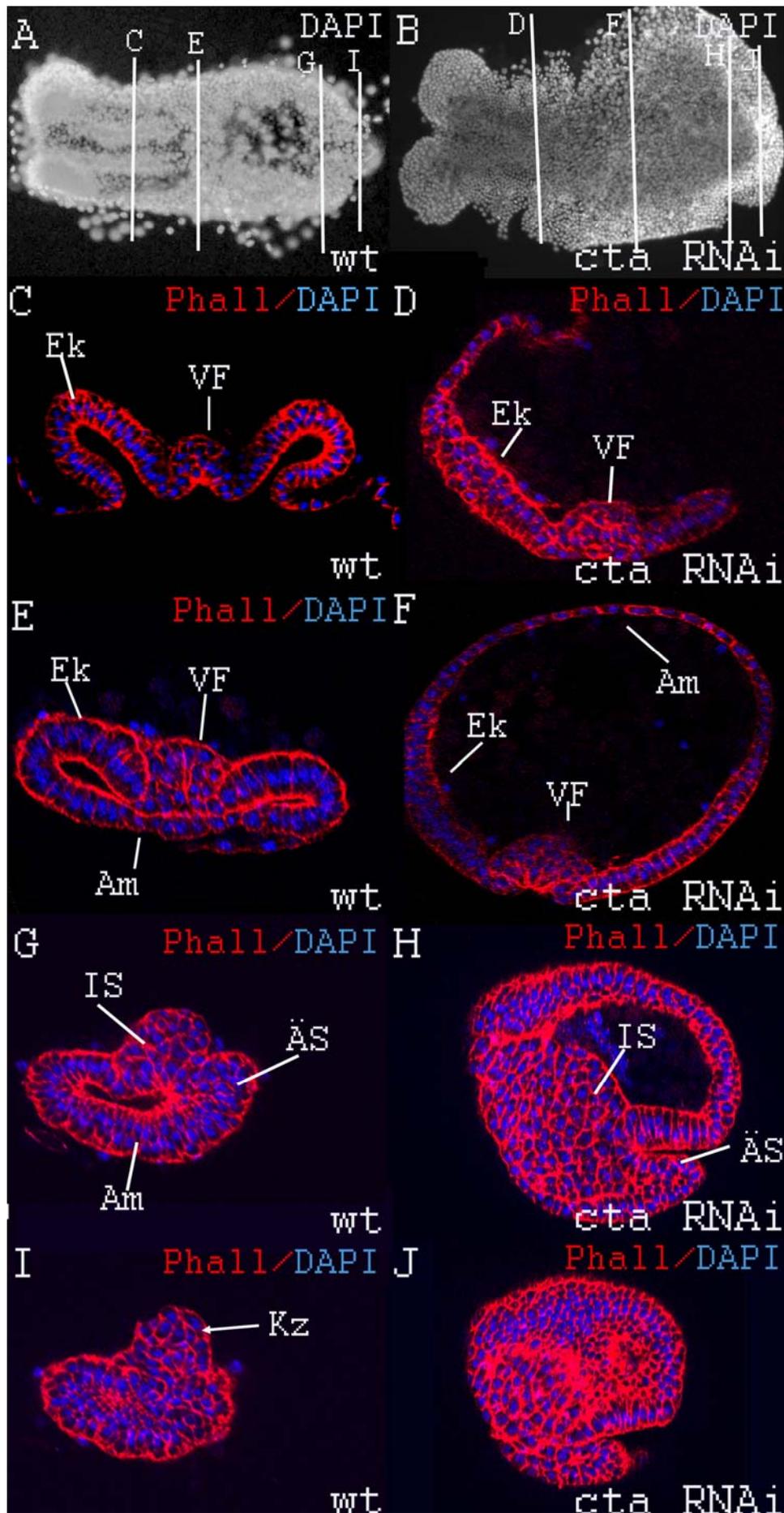


Abb.24: In *cta*-RNAi-Embryonen verbleibt das Amnion auf der dorsalen Seite

Membranen wurden mit Phalloidin (rot) und DNA mit DAPI (blau) angefärbt

A,B: Ventralansichten von Embryonen während der Mesoderminternalisation. Während in Wt-Embryonen das Amnion den Embryo ventral in posterioren Regionen überdeckt (**A**), ist in *cta*-RNAi-Embryonen eine schüsselartige Struktur in posterioren Regionen zu beobachten. (**B**). **C-J:** Querschnitte in verschiedenen Positionen der Embryonen aus A und B. Das Ektoderm (Ek) bewegt sich im Wt-Embryo nach ventral. Die ventralen Zellen befinden sich im Invaginationsprozess, wodurch die Ventralfurche (VF) entsteht. (**C**, Querschnitt C in B), Das Ektoderm im *cta*-RNAi-Embryo zeigt keine Ventralbewegung. Ventrale Zellen zeigen eine mesenchymale Struktur, allerdings ist in dieser Position keine apikale Konstruktion ventraler Zellen erkennbar (**D**, Querschnitt D in B). Das Amnion (Am) bedeckt den Wt-Embryo ventral, und die Ventralfurche befindet sich zwischen dem Ektoderm (**E**, Querschnitt E in A). Im *cta*-RNAi-Embryo verbleibt das Amnion dorsal. Apikale Konstruktion der ventralen Zellen sind detektierbar (**F**, Querschnitt F in B). In der Wachstumszone vom Wt-Embryo ist die innere, mesenchymale Schicht (IS) deutlich von der äußeren, epithelialen Schicht zu unterscheiden (ÄS) (**G**, Querschnitt G in A). Im *cta*-RNAi-Embryo sind ebenfalls mesenchymale Zellen der inneren Schicht und epitheliale Zellen der äußeren Schicht vorhanden (**H**, Querschnitt H in B). Im Gegensatz zum posterioren Ende des Wt-Embryos, wo sich die Keimzellen (Kz) befinden (**I**), wirkt dieses im *cta*-RNAi-Embryo ungeordnet und die Schichten scheinen ineinander verdreht (**J**, Querschnitt J in B)

Die mesenchymalen Zellen der inneren Schicht sind deutlich zu erkennen (Abb.24H), wobei in diesem Stadium keine klare Abgrenzung zur äußeren, epithelialen Schicht auf der Ventralseite zu erkennen ist. Es scheint als seien die Schichten ineinander verdreht, was vor allem am posterioren Ende des Embryos (Abb.24J) deutlich wird. Das Amnion befindet sich auf der dorsalen Seite, wobei die Einbuchtung im Epithel nicht klar dem Amnion oder der äußeren Schicht zuzuordnen ist (Abb.24H).

Um die Keimzellen in *cta*-RNAi-Embryonen sichtbar und unterscheidbar von der inneren Schicht zu machen, wurde in posterioren Querschnitten die *Tc-vasa*-Expression analysiert. In Wt-Embryonen, wie auch in *cta*-RNAi-Embryonen sind deutlich die der inneren Schicht aufgelagerten *Tc-vasa*-positiven Keimzellen zu sehen (Abb.25A,B).

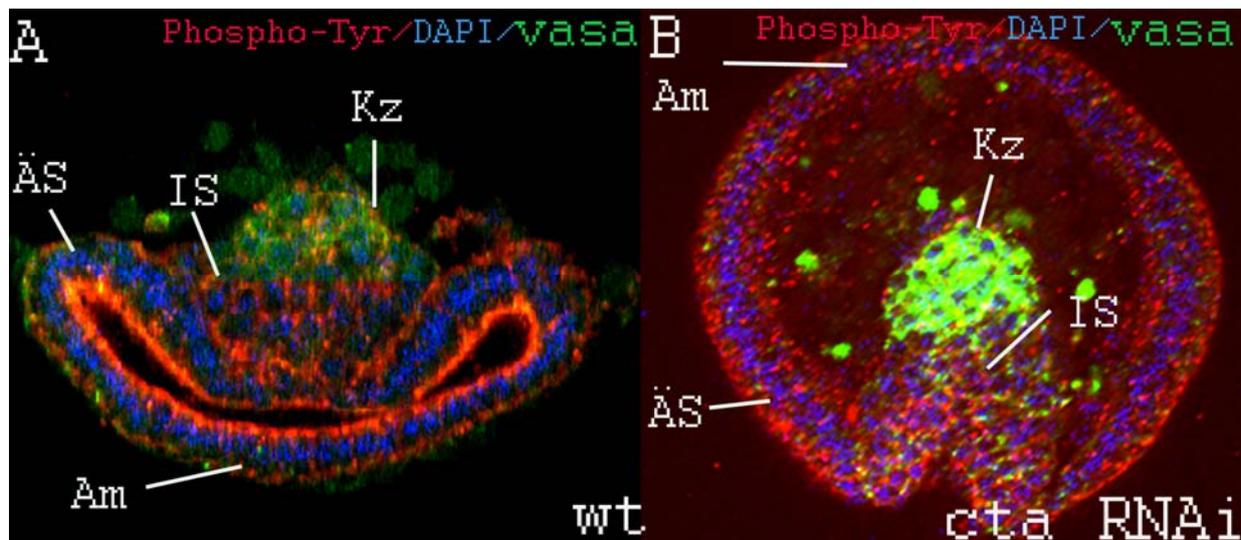


Abb.25: Die Keimzellen von *cta*-RNAi-Embryonen befinden sich im Inneren des Embryos

Tc-vasa-in situ, Zellmembranen wurden mit Anti-Phospho-Tyrosin (rot) und DNA mit DAPI (blau) angefärbt
A,B: Im Wt-Embryo (**A**), sowie im *cta*-RNAi-Embryo (**B**) sind Keimzellen (KZ), die der inneren Schicht (IS) auflagern, vorhanden. AS: äußere Schicht; Am: Amnion

Um einen Einblick in spätere Stadien der Entwicklung von *cta*-RNAi-Embryonen zu bekommen, wurden außerdem thorakale Querschnitte und longitudinale Schnitte durch die Wachstumszone junger Keimstreif-Embryonen angefertigt. Wie im Wt-Embryo ist auch im *cta*-RNAi-Embryo das vollständig internalisierte Mesoderm und das darunterliegende Ektoderm im thorakalen Querschnitt deutlich sichtbar (Abb.26A,B). Ein *Tc-cta*-Verlust hat also keine schwerwiegenden Konsequenzen für die Mesoderminvagination.

Die Organisation der Wachstumszone ist dahingehend verändert, dass das Amnion sich nicht ventral der inneren und äußeren Schicht, sondern immer noch an der dorsalen Position befindet (Abb.26D). Deutlich sind die mesenchymalen Zellen der inneren Schicht von der epithelialen Organisation der äußeren Schicht zu unterscheiden, allerdings ist keine eindeutig epitheliale Schicht unterhalb der mesenchymalen Schicht zu erkennen (Abb.26D).

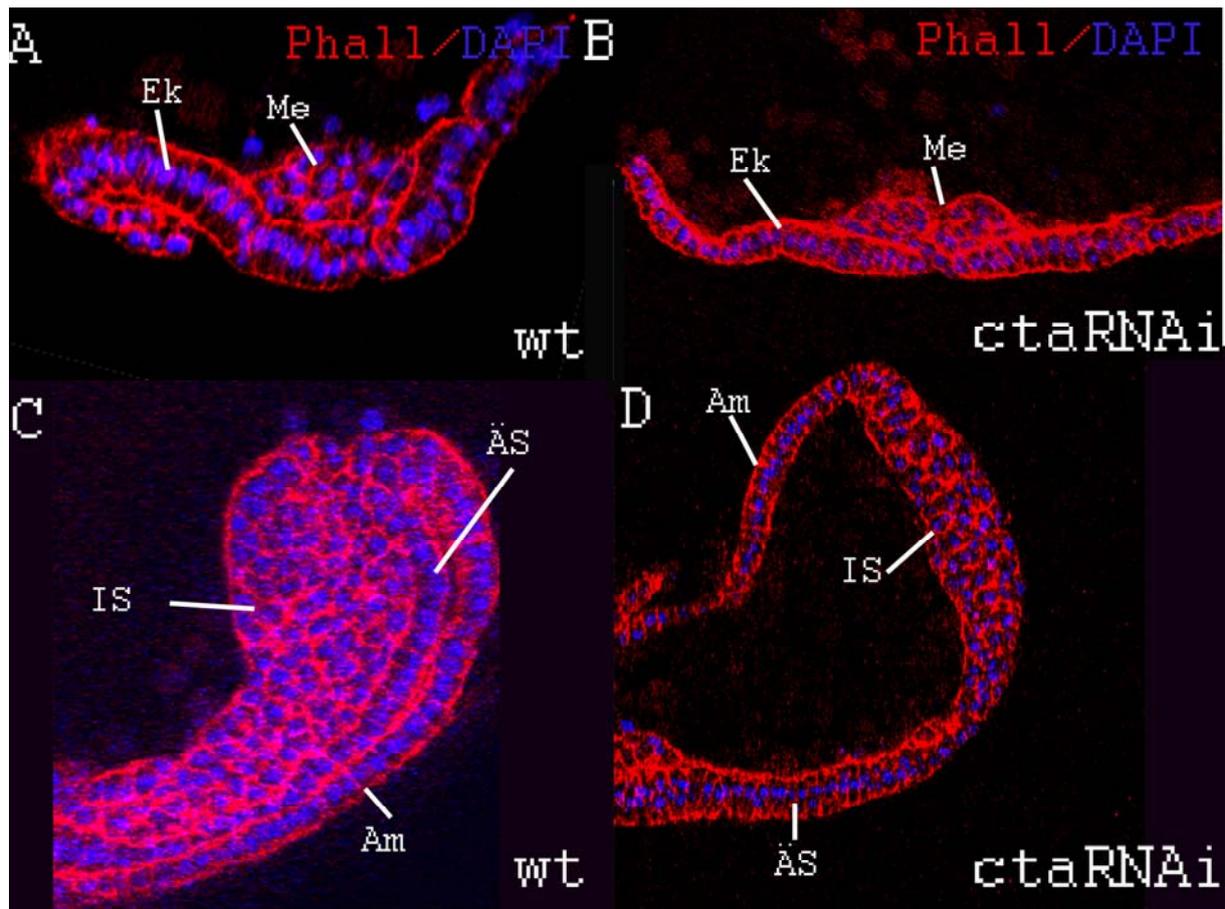


Abb.26: Das Mesoderm in *cta*-RNAi-Keimstreif-Embryonen ist vollständig invaginiert und die Wachstumszone besteht aus drei Schichten

Membranen wurden mit Phalloidin (rot) und DNA mit DAPI (blau) angefärbt

Das Mesoderm (Me) in *cta*-RNAi-Embryonen (**B**) ist, wie in Wt-Embryonen (**A**), vollständig invaginiert und kann sich auf dem Ektoderm (Ek) ausbreiten. Eine Ventralbewegung des Ektoderms in *cta*-RNAi-Embryonen, ist nicht zu beobachten (**B**). Das Amnion (Am) in der Wachstumszone von *cta*-RNAi-Embryonen, verbleibt dorsal (**D**). Die innere Schicht (IS) ist von der äußeren Schicht (ÄS) zu unterscheiden (**D**), wobei die Anordnung gegenüber der Wachstumszone in Wt-Embryonen (**C**) verändert ist.

3.3.2. Expressionsstudien verschiedener Markergene in *cta*-RNAi-Embryonen

3.3.2.1. *Tc-twi* in *cta*-RNAi-Embryonen

Obwohl *Drosophila-cta*-Mutanten keine normale Ventralfurche ausbilden, exprimieren sie *twi* in einem wildtypischen Muster (Parks und Wieschaus 1991). Auch bei *Tribolium* wird *Tc-twi* in *cta*-RNAi-Embryonen exprimiert (Abb.27). Leichte Änderungen in der Expressionsdomäne sind auf die beschriebenen morphologischen Veränderungen in diesen Embryonen zurückzuführen.

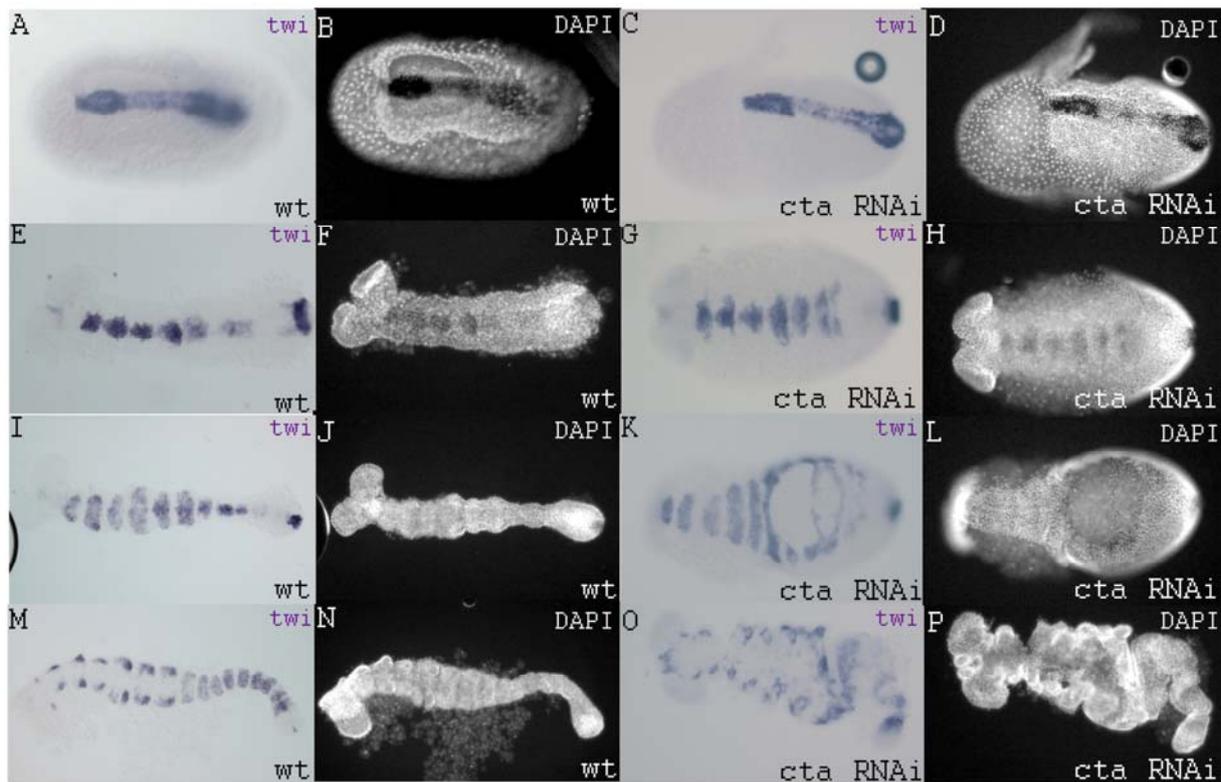


Abb.27: Die *Tc-twi*-Expression in *cta*-RNAi-Embryonen wird durch den Elongationsprozess beeinträchtigt

Tc-twi-in situ, Embryonen in Ventralansicht gezeigt

A-D: *Tc-twi*-Expression in gastrulierenden Embryonen und ihre korrespondierenden DAPI-Färbungen. Wie im Wt-Embryo (**A**), erfolgt die *Tc-twi*-Expression in *cta*-RNAi-Embryonen ventral, wobei sie sich weiter nach posterior erstreckt (**C**). **E-H:** *Tc-twi*-Expression in frühen Keimstreif-Embryonen und ihre korrespondierenden DAPI-Färbungen. Die segmentale und posteriore *Tc-twi*-Expression in Wt-Embryonen (**E**) bleibt in *cta*-RNAi-Embryonen erhalten (**G**), allerdings fällt die *Tc-twi*-Expressionsdomäne breiter aus. **I-L:** *Tc-twi*-Expression in mittleren Keimstreif-Embryonen und ihre korrespondierenden DAPI-Färbungen. Während der fortschreitenden Elongation reißen *cta*-RNAi-Embryonen in posterioren Regionen ein (**L**), wodurch die segmentale *Tc-twi*-Expression nicht mehr durchgängig ist. **M-P:** *Tc-twi*-Expression in vollständig elongierten Keimstreif-Embryonen und ihre korrespondierenden DAPI-Färbungen. Wie bei Wt-Embryonen (**M**) verliert die *Tc-twi*-Expression ihre anteriorventrale Expression in *cta*-RNAi-Embryonen (**O**). *Tc-cta*-RNAi-Embryonen zeigen ein verdrehtes und gestauchtes Abdomen (**P**, vergleiche mit **N**), wodurch die *Tc-twi*-Expression im Abdomen nicht mehr eindeutig in einem segmentalen Muster verläuft (**O**).

In einem gastrulierenden Embryo sind sich die ventralen *Tc-twi*-Expressionsdomänen von Wt-Embryonen und *cta*-RNAi-Embryonen sehr ähnlich, nur erstreckt sich die Expression in *cta*-RNAi-Embryonen sehr weit nach posterior (Abb.27C,D). Dies ist mit der Expression im Wt-Blastoderm vergleichbar (Abb.3A). Dies ist ein weiteres Indiz, dass in der posterioren Region keine Bewegungen stattgefunden haben (Abb.27A-D).

In jungen *cta*-RNAi-Keimstreif-Embryonen wird *Tc-twi* in einem segmentalen, wenn auch breiteren Muster als in Wt-Embryonen exprimiert (Abb.27G, vergleiche mit E). Diese breitere Expression ist mit der fehlenden Ventralbewegung des Ektoderms zu erklären, in dessen

Folge sich die mesodermalen Zellen etwas flacher ausbreiten können und nicht wie im Wt-Embryo, in einer Art ektodermalen Furche liegen (Abb.26A,C).

Im weiteren Verlauf der Keimstreif-Ausstreckung erscheint die posteriore *Tc-twi*-Expression in *cta*-RNAi-Embryonen aufgerissen (Abb.27K). In Abb.27L zeigt sich, dass ventral im Embryo ein Loch entstanden ist. Dieses Loch ist vermutlich das Resultat starker Spannungen, die aufgrund des dorsal befindlichen Amnions in *cta*-RNAi-Embryonen während der Keimstreifausstreckung entstehen. Als Folge entwickeln sich zwar elongierte, aber gleichzeitig abdominal verdrehte Keimstreif-Embryonen (Abb.27O,P).

Tc-twi-mRNA-angefärbte Embryonen wurden genutzt, um Querschnitte anzufertigen und so die Effizienz der Mesoderminternalisierung zwischen Wt-Embryonen und *cta*-RNAi-Embryonen zu vergleichen. Dabei zeigt sich, dass die Invagination *Tc-twi*-exprimierender Zellen beim Wt-Embryo weiter vorangeschritten ist als beim *cta*-RNAi-Embryo (Abb.28A1,B1.). Dies wird besonders deutlich, da der gewählte *cta*-RNAi-Embryo einem älteren Stadium entspricht (ersichtlich an der schon beginnenden thorakalen, segmentalen *Tc-twi*-Expression) (Abb.28B). Querschnitte in posterioren Regionen zeigen eine vollständige Invagination *Tc-twi* exprimierender Zellen, wohingegen im *cta*-RNAi-Embryo noch eine tiefe Furche vorhanden ist (Abb.28A2,B2). Des Weiteren zeigt sich im *cta*-RNAi-Embryo die fehlende Bewegung des Ektoderms zur ventralen Mittellinie. Der Embryo verbleibt anterior in einer sehr flachen Form (Abb.28B1). Posterior ist wiederum das dorsal verbleibende Amnion zu erkennen (Abb.28B2).

Es ist also eine verspätete Ventralfurchenbildung in *cta*-RNAi-Embryonen zu beobachten, wobei nicht zu unterscheiden ist, ob diese aus unkoordinierten Zellformveränderungen innerhalb der Ventralfurchen oder durch die fehlende Bewegung des Amnions und des Ektoderms nach ventral resultiert.

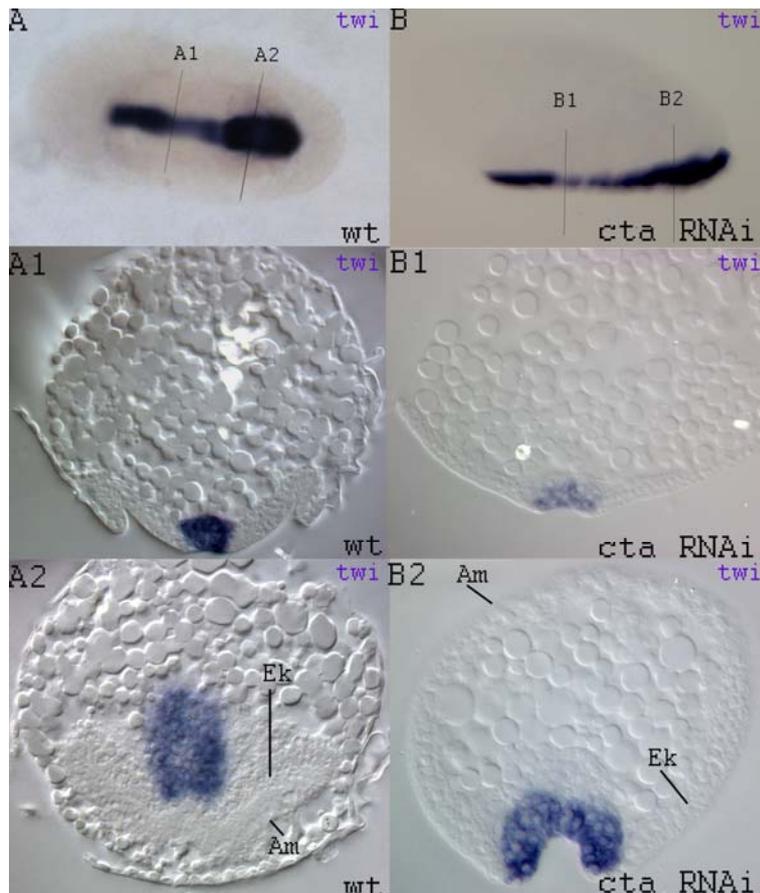


Abb.28: Die Invagination *Tc-twi*-exprimierender Zellen verläuft langsamer in *cta*-RNAi-Embryonen

Tc-twi-in situ

A: Ventralansicht eines *Tc-twi*-angefärbten Wt-Embryos während der Ventralfurchenbildung. **B:**

Lateralansicht eines *Tc-twi*-gefärbten *cta*-RNAi-Embryos in einem etwas fortgeschrittenen Stadium als A (ersichtlich an der beginnenden segmentalen *Tc-twi* Expression). **A1,B1:** Querschnitt mittleren Regionen der Embryonen in A bzw. B. Im Wt sind *Tc-twi*-exprimierende Zellen schon zum großen Teil internalisiert (**A1**), während diese Zellen in *cta*-RNAi-Embryonen noch an der ventralen Oberfläche verbleiben (**B1**). **A2,B2:** Querschnitte in posterioren Regionen der Embryonen in A und B. Im Wt wurden *Tc-twi*-exprimierende Zellen vollständig internalisiert (**A2**), während in *cta*-RNAi-Embryonen noch eine tiefe Furche vorhanden ist (**B2**).

3.3.2.2. *Tc-pnr*- und *Tc-iro* in *cta*-RNAi-Embryonen

Tc-pnr wird neben seiner schon beschriebenen Expression im dorsalen Ektoderm, auch im Amnion und in den Mitteldarmanlagen exprimiert (Berns 2001; van der Zee et al., 2005).

Wie im Wt-Embryo ist auch in einem *cta*-RNAi-Embryo zu Beginn der Gastrulation, eine dorsale *Tc-pnr*-Expression, welche die Amnionanlagen markiert, zu detektieren (Abb.29A,C). In einem späteren Stadium, in welchem der Wt-Embryo mit seinem caudalen Ende schon tief in den Dotter eingesunken ist und ventral vom *Tc-pnr* gefärbten Amnion bedeckt ist, ist im *cta*-RNAi-Embryo eines vergleichbaren Stadiums, nur die posteriore *Tc-pnr*-Expression, vom dorsal verbliebenen Amnion zu detektieren (Abb.29E-H). Der posteriore Teil des Embryos verbleibt also in einem früheren Stadium.

In mittleren Keimstreif-Stadien wird *Tc-pnr* im dorsalen Ektoderm und den anterioren und posterioren Mitteldarmanlagen exprimiert (Abb.29I) (Berns 2001). Die anteriore wie auch posteriore *Tc-pnr*-Expression ist ebenfalls in *cta*-RNAi-Embryonen nachweisbar (Abb.29K). Da das Amnion nicht über den Embryo gewandert ist, bildet die *Tc-pnr*-Expression eine Umrandung um die posteriore, schüsselartige Struktur (Abb.29K,L). Der Keimstreif verlängert sich zwar in *cta*-RNAi-Embryonen, allerdings reißt dieser in posterioren Regionen

ein, wodurch der weitere Wachstumsprozess gestört wird und die abdominalen Bereiche gestaucht werden (Abb.29L,O,P). Im ausgestreckten Wt-Keimstreif-Embryo ist nach erfolgter Mitteldarminvagination keine *Tc-pnr*-Expression mehr in der posterioren Mitteldarmanlage detektierbar (Abb.29M). In *cta*-RNAi-Embryonen ist es aufgrund des verdrehten und gestauchten Abdomens in Keimstreif-Embryonen nicht eindeutig feststellbar, ob *Tc-pnr* noch in der posterioren Mitteldarmanlage exprimiert wird (Abb.29M,O).

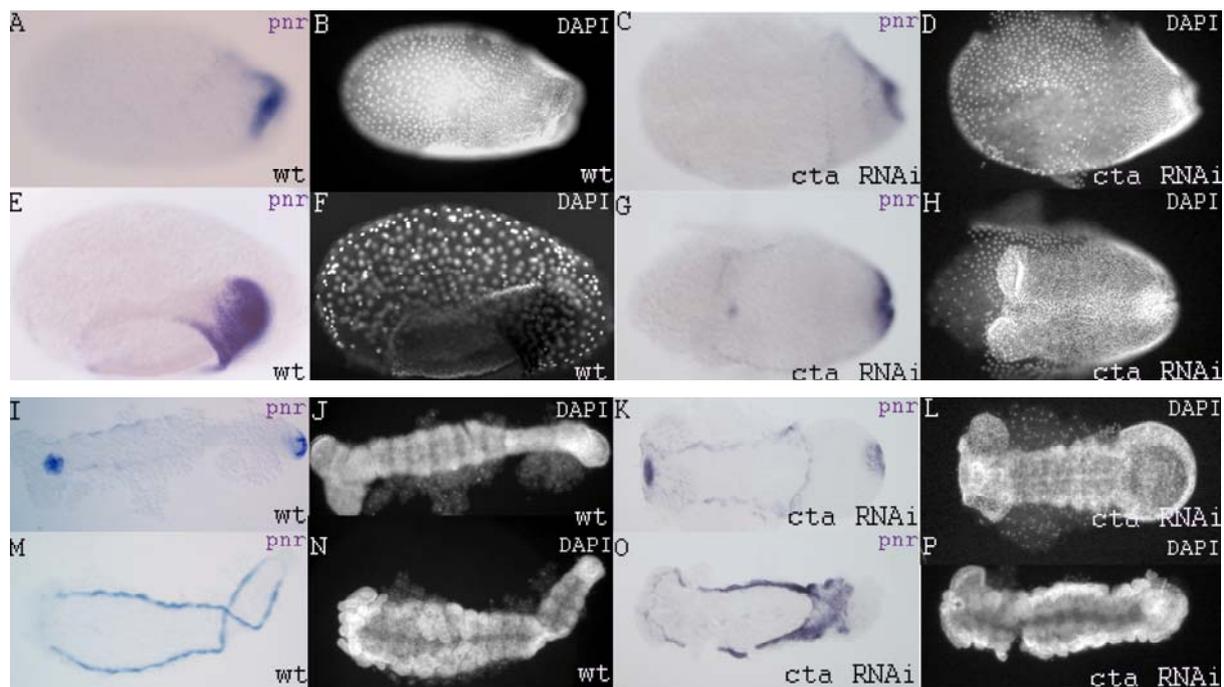


Abb.29: In *cta*-RNAi-Embryonen verbleibt das Amnion dorsal

Tc-pnr-in situ

A-D: *Tc-pnr*-Expression zu Beginn der Gastrulation und die korrespondierenden DAPI-Färbungen. Wie im Wt (A), markiert *Tc-pnr* in *cta*-RNAi-Embryonen dorsal das zukünftige Amnion (C). **E-H:** *Tc-pnr*-Expression in gastrulierenden Embryonen und die korrespondierenden DAPI-Färbungen. In Wt-Embryonen (Ventral-/Lateralansicht) ist deutlich die *Tc-pnr*-Färbung im, den Embryo ventral bedeckenden, Amnion ersichtlich (E,F), während in *cta*-RNAi-Embryonen (Ventralansicht) nur eine posteriore *Tc-pnr*-Expression, im dorsal verbliebenen Amnion, zu detektieren ist (G,H). **I-L:** *Tc-pnr*-Expression in elongierenden Keimstreif-Embryonen und die korrespondierenden DAPI-Färbungen. Im Wt-Embryo wird *Tc-pnr* in der anterioren und posterioren Mitteldarmanlage exprimiert (I). In *cta*-RNAi-Embryonen sind ebenfalls eine anteriore und posteriore Expressionsdomäne von *Tc-pnr* vorhanden. Das dorsale Ektoderm umrandet die posteriore, schüsselartige Struktur (K,L). **M-O:** *Tc-pnr*-Expression in ausgestreckten Wt-Keimstreif-Embryonen und die korrespondierenden DAPI-Färbungen. Im Wt-Embryo ist *Tc-pnr*-Expression nur im dorsalen Ektoderm detektierbar, da die posteriore Mitteldarmanlage vollständig invaginiert ist (M). In *cta*-RNAi-Embryonen ist nicht eindeutig *Tc-pnr*-Expression in der posterioren Mitteldarmanlage detektierbar (O), da das Abdomen gestaucht und verdreht ist (P).

Ferner wurde die Expression von *Tc-iroquois* (*Tc-iro*) in *cta*-RNAi-Embryonen analysiert. *Tc-iro* bietet neben, seiner Expression in Amnion und dorsalem Ektoderm, den Vorteil einer segmentalen Expression. Wie *Tc-pnr* wird *Tc-iro* im ventral gelegenen Amnion in gastrulierenden Wt-Embryonen exprimiert (Abb.30A). In *cta*-RNAi-Embryonen kann *Tc-iro* nicht in dieser Region detektiert werden (Abb.30C).

Im Keimstreif-Stadium wird *Tc-iro* in *cta*-RNAi-Embryonen zunächst in einem segmentalen Muster exprimiert, was auf eine wildtypische Segmentbildung während der Elongationsphase in *cta*-RNAi-Embryonen schließen lässt (Abb.30G). Allerdings sind vollständig elongierte *cta*-RNAi-Embryonen abdominal ineinander verdreht (Abb.30L), wodurch eine segmentale Expression schwierig zu detektieren ist.

Die Initiierung der Segmentbildung während der Elongation scheint ohne die geordnete Anlage der drei Schichten der Wachstumszone, wie in *cta*-RNAi-Embryonen (vergleiche Abb.26D) möglich zu sein. Man kann jedoch nicht eindeutig feststellen, ob die posterioren Segmente gebildet werden.

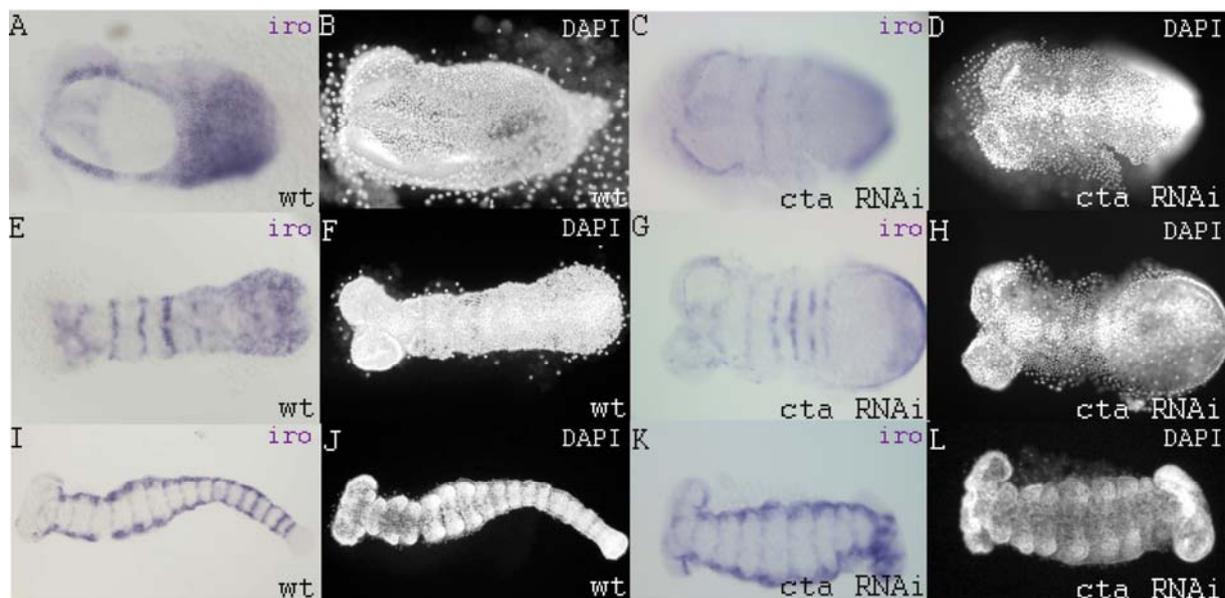


Abb. 30: Die Initiierung der Segmentbildung ist in *cta*-RNAi-Embryonen nicht beeinträchtigt

Tc-iro-in situ

A-D: *Tc-iro*-Expression in gastrulierenden Embryonen und ihre korrespondierenden DAPI-Färbungen. In Ventralansicht; *Tc-iro* wird im anterioren und posterioren Amnion exprimiert (**A,B**). In *cta*-RNAi-Embryonen bestätigt sich die fehlende Bewegung des Amnions über den posterioren Embryo (**C**). **E-G:** Elongierende Embryonen in Ventralansicht; **E:** *Tc-iro* wird ebenfalls in einem segmentalen Muster exprimiert. **G:** Auch in *cta*-RNAi-Embryonen erfolgt diese segmentale Expression (**G**). **I-K:** In elongierten Keimstreif-Embryonen ist die segmentale *Tc-iro*-Expression sowie die Expression im dorsalen Ektoderm im Wt sowie in *cta*-RNAi-Embryonen vorhanden. Aufgrund des gestauchten und verdrehten Abdomens von *cta*-RNAi-Embryonen ist es schwierig zu beurteilen, inwieweit die Segmentierung im Abdomen normal verläuft (**K**).

3.3.2.3. *Tc-zerknüllt (zen)* in *cta*-RNAi-Embryonen

Im Wt-Embryo bewegen sich Amnion und Serosa gemeinsam über den Embryo (Handel et al., 2000). Die Lokalisation der Serosa in *cta*-RNAi-Embryonen wurde mittels des Serosa-Markergens *Tc-zen* beobachtet (van der Zee et al., 2005).

Die Serosa verbleibt in gastrulierenden *Tc-cta*-RNAi-Embryonen an ihrem anteriordorsalen Anlageort (Abb.31B,D) und bedeckt nicht, wie in gastrulierenden Wt-Embryonen (Abb.31A,C), fast den gesamten Embryo.

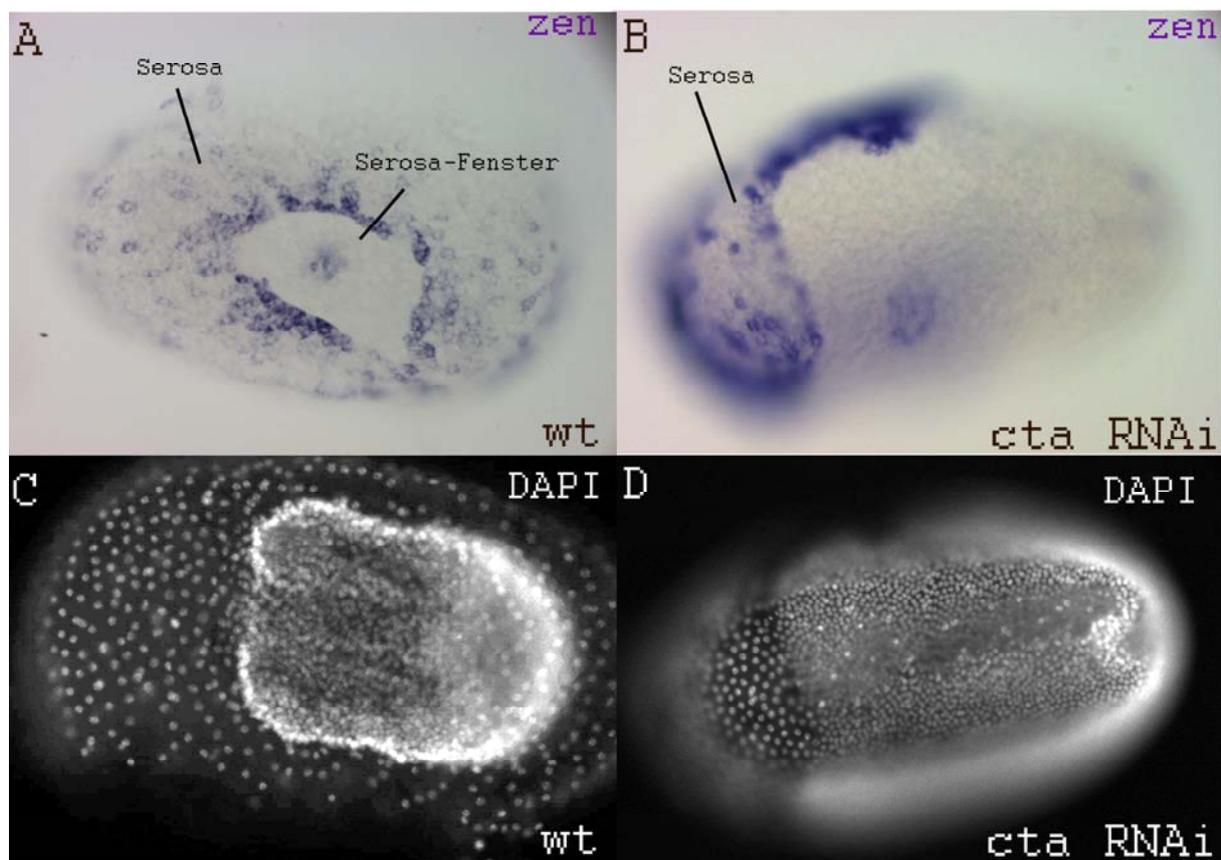


Abb.31: In *cta*-RNAi-Embryonen verbleibt die Serosa an ihrem anteriordorsalen Anlageort

Tc-zen- in situ

A-D: *Tc-zen*-Expression in gastrulierenden Embryonen und ihre korrespondierenden DAPI Färbungen. In Wt-Embryonen wird *Tc-zen* in der gesamten Serosa, welche den Embryo fast vollständig bedeckt, exprimiert (A,C). In *cta*-RNAi-Embryonen verbleibt die Serosa in der anteriordorsalen Position und bewegt sich nicht über den Embryo (B), obwohl sich der Embryo schon in der Gastrulationsphase befindet (D, optische Ebene gegenüber B verändert).

4. Diskussion

In dieser Arbeit wurde ein weiterer Punkt zum Verständnis der DV-Musterbildung bei *Tribolium* bearbeitet. Dabei lag der Fokus in der funktionellen Analyse der aus *Drosophila* bekannten Dorsal-Zielgene *twi* und *sna*. Neben der Analyse ihrer Rolle während der Mesoderminternalisierung, wurden auch die Auswirkungen eines *Tc-twi*- und *Tc-sna*-Verlustes auf andere, entlang der DV-Achse exprimierte Gene, untersucht. Dies soll zu einem besseren Einblick in das zygotisch kontrollierte DV-Musterbildungssystem nach dem Verschwinden des Tc-Dorsal-Gradienten, führen.

Auf der Suche nach bekannten Genen aus *Drosophila*, welche an der Etablierung von Zellformänderungen während der Ventralfurchebildung beteiligt sind, konnte *Tc-cta* identifiziert werden. *Tc-cta*-RNAi-Embryonen zeigen dabei einen neuen Phänotyp, welcher auf die fehlende Bewegung des Amnions zurückzuführen ist.

4.1. Die Funktionen von *Tc-twi* und *Tc-sna* während der Mesoderminternalisierung

Wie bei *Drosophila*, formen auch *Tribolium* *twi*- und *sna*-RNAi-Embryonen keine wildtypische Ventralfurche. Dennoch treten signifikante Unterschiede auf. Erstens ist die Situation von *twi*-RNAi-Embryonen mit der von *twi+sna*-Doppelmutanten bei *Drosophila* vergleichbar, da *Tc-sna* in frühen Stadien absolut abhängig von *Tc-twi* ist. Bei *Drosophila* Doppelmutanten, wie auch in *twi*-RNAi-Embryonen sind keinerlei mesoderm spezifische Zellmorphologieänderungen, die zu einer Internalisierung führen könnten, sichtbar (Abb.5B). Diese Beobachtung trifft ebenfalls für die Wachstumszone zu, in welcher die innere mesenchymale Schicht in *twi*-RNAi-Embryonen, nicht vorhanden ist (Abb.6B). Somit entwickeln *twi*-RNAi-Embryonen kein Mesoderm und sterben am Ende der Embryogenese.

Da *Tc-twi* in *sna*-RNAi-Embryonen exprimiert wird (Abb.3B,D), könnten alle beobachtenden Zellformveränderungen in *sna*-RNAi-Embryonen auf die Funktion von *Tc-twi* zurückzuführen sein. Die ventral gelegene Zellmasse in *sna*-RNAi-Embryonen besitzt mesenchymale Struktur (Abb.5C), was eine Funktion von *Tc-twi* im Übergang der epithelialen zur mesenchymalen Struktur nahe legt. ChIP-on-chip Experimente, verbunden mit Analysen der Bioinformatik, haben bei *Drosophila* zur Identifizierung einer hohen Anzahl *Tw*-regulierter Gene, welche für Prozesse wie Zellproliferation, Morphogenese und Zellmigration benötigt werden, geführt (Sandmann et al., 2007). *Tw* scheint ein wichtiger Integrations- und Kontrollpunkt im gesamten Prozess der Mesodermentwicklung zu sein, wobei es aktivierende und reprimierende Eigenschaften kombiniert. Die Autoren postulieren,

dass Twi dem Mesoderm eine pluripotente Kompetenz verleiht, um eine schnelle Spezifizierung zu durchlaufen und so den rapiden Entwicklungsvorgang von *Drosophila* zu gewährleisten. Es ist also durchaus möglich, dass Twi auch schon in basaleren Insekten, wie *Tribolium*, Vorgänge wie EMT, Zellproliferation und Migration steuert. Gerade der frühe Verlust von Tc-Dorsal bedarf zygotischer Gene, wie *Tc-twi*, welche die Steuerung einer Entwicklungskaskade übernehmen.

Tc-Twi allein scheint über die Kompetenz zu verfügen, eine, wenn auch verspätete Konstriktion ventraler Zellen in *sna*-RNAi-Embryonen, zu initiieren (Abb.5I), die zur Mesoderminternalisierung führt. Auch bei *Drosophila* konnte gezeigt werden, dass prospektive mesodermale Zellen, trotz ungeordneter Zellformveränderungen, internalisiert werden (Seher und Leptin 2000). Ebenfalls konnte die Abtragung flaschenförmiger Zellen in *Xenopus* die Internalisierung der mesodermalen Schicht nicht verhindern (Keller 1981). Somit könnten Prozesse, wie apikale Konstriktion und die epitheliale Einbuchtung, in erster Linie dazu dienen, prospektiv mesodermale Zellen, in eine gute Startposition für die weitere Entwicklung zu bringen (Leptin 2005).

Dies liefert eine Erklärung für die anscheinend normal ablaufende Migration mesodermaler Zellen in *sna*-RNAi-Embryonen liefern, da späte mesodermale Marker wildtypisch exprimiert werden (Abb.7C,F,I). *Tc-twi* wird in *sna*-RNAi-Embryonen, bis auf eine vergrößerte posteriore Domäne, wildtypisch exprimiert und kann als möglicher Hauptregulator der gesamten Mesodermentwicklung bei *Tribolium* ausreichend für die spätere Mesodermmigration sein. Dies steht im Kontrast zu *Drosophila-sna*-Mutanten, in denen keine Expression von mesodermalen Markern stattfindet (Leptin 1991). Dabei ist aber zu bedenken, dass *Drosophila-twi* in *sna*-Mutanten früher verschwindet als im Wt und *sna* in späten Wt-Embryonen nicht mehr im Mesoderm exprimiert wird. Dies lässt eine eher indirekte Rolle von *sna* in der Aktivierung Mesoderm-spezifischer Gene vermuten. (Leptin 1991).

Einen weiteren Hinweis auf die wildtypische Migration mesodermaler Zellen in *sna*-RNAi Embryonen liefert die wildtypische *Tc-Fgf8*-Expression (Abb.8C). Bei *Drosophila* dirigiert der FGF Signalweg mesodermale Zellen in Richtung des Ektoderms, was die effiziente Ausbreitung des Mesoderms, ermöglicht (Beiman et al., 1996; Gryzik und Muller 2004; Stathopoulos et al., 2004). Der FGF-Signalweg kann folglich ausreichend für eine normale Migrationsbewegung mesodermaler Zellen bei *Tribolium-sna*-RNAi-Embryonen sein. Um dies zu überprüfen, müssten *sna*+Fgf-RNAi-Experimente durchgeführt werden. Wären in diesen Embryonen keine späten mesodermalen Derivate vorhanden, würde das beweisen, dass

der FGF-Signalweg für die Migration mesenchymaler Zellen in *sna*-RNAi-Embryonen ausreichend ist.

Der, trotz gestörter Invaginationsbewegung, normal ablaufende Migrationsprozess könnte auf das höhere regulatorische Potential von primitiveren Insekten zurückzuführen sein. Interessant ist dabei, dass hemimetabole Insekten weder eine Ventralfurche bilden noch eine koordinierte Migrationsbewegung durchführen. In diesen Insekten wird eine ungleichmäßige Zellmasse, durch das Zusammentreffen des Ektoderms entlang der ventralen Mittellinie, in den Embryo gedrückt (Roth 2004).

Ein ähnlicher Prozess ist in *sna*-RNAi-Embryonen zu beobachten, wobei allerdings während der Gastrulation keine vollständige Abgrenzung der mesenchymalen Zellen vom Epithel zu beobachten ist. Vielmehr scheint die gesamte ventrale Region einen mesenchymalen Charakter anzunehmen. Tc-Sna muss also bei *Tribolium* eine wichtige Rolle in der Anlage von Gewebegrenzen innehaben. Diese Funktion ist aus *Drosophila* bekannt, wo Sna an der Positionierung des Notch-Signales im Mesektoderm beteiligt ist und es so von den anderen Geweben abgrenzt (Cowden und Levine 2002; Morel et al., 2003). In Ascidien etabliert Sna die Muskel/Chorda-Grenze (Fujiwara et al., 1998), und in Vertebraten scheint es ebenfalls an der Unterteilung der mesodermalen Schicht beteiligt zu sein (Thisse et al., 1995; Mayor et al., 2000).

Tc-sna-RNAi-Embryonen unterscheiden sich zum Wt durch die größere Anzahl mesenchymaler Zellen. Besonders deutlich wird dies in der posterioren Region bzw. der Wachstumszone, da diese breiter als im Wt ist (Abb.5C,L). Dies könnte auf eine erhöhte Zellproliferationsrate hinweisen. Bei *Drosophila* ist die Blockierung von Zellteilungen während der Mesoderminvagination abhängig von *sna* (Grosshans und Wieschaus 2000). Auch in Vertebraten konnte gezeigt werden, dass Sna exprimierende Bereiche invasiver Tumoren eine reduzierte Proliferationsrate haben bzw. dass epitheliale Säugerzellen, nach einer Transfektion mit Sna, ihre Proliferation reduzieren (Blanco et al., 2002; Vega et al., 2004).

Bei *Tribolium* wird die Mitose während der Mesoderminvagination nicht vollständig reprimiert, da Zellen sich schon während der Invagination teilen (Handel et al., 2005). Aufgrund der gewonnenen Ergebnisse scheint Tc-Sna die Proliferationsrate innerhalb der mesenchymalen Zellstruktur zu minimieren.

In der Studie von Sandmann et al. (2007) wurden neue direkte Verbindungen von *Drosophila*-Twi mit vielen Schlüsselkomponenten des Zellzyklus identifiziert. Es ist also durchaus möglich, dass Tc-Twi Zellteilungen aktiviert, Tc-Sna diese dann aber limitiert.

Tc-sna-RNAi-Experimente führten nicht immer zum vollständigen *Tc-sna*-Verlust (Abb.1bB,D) und es ist möglich, dass nicht der stärkste Phänotyp analysiert wurde. Jedoch ist *Tc-sna*-Expression in *sna*-RNAi-Embryonen vor allem während der ZNS-Entwicklung detektierbar (Abb.1bD). Man kann davon ausgehen, dass diese späte Expression in den Neuroblasten kaum Auswirkungen auf die früher stattfindende Invaginationsbewegung hat.

Es lässt sich festhalten, dass Tc-Twi, wie sein Homolog aus *Drosophila*, der Hauptregulator der mesodermalen Entwicklung ist und sowohl Einfluss auf das Zellschicksal wie auch die Morphogenese nimmt. Die frühe Twi-Funktion während der Mesoderminvagination scheint also ein phylogenetisch alter Charakter der Insektenembryogenese zu sein.

Die Rolle von Tc-Sna in diesen Prozessen ist, wie auch bei *Drosophila*, schwieriger zu beurteilen. In *Tribolium* scheint *Tc-sna* keinen direkten Einfluss auf die Mesodermspezifizierung zu nehmen und vielmehr an morphologischen Prozessen beteiligt zu sein. Da das Mesoderm aber in den Embryo gelangt, sind diese vermutlich nicht essentiell für die Mesoderminternalisierung. Tc-Sna scheint die Zellproliferation zu kontrollieren und könnte, wie bei *Drosophila* gezeigt, für die Umorganisation von Zellkontakten nötig sein (Kolsch et al., 2007). Auch in anderen Organismen, wie z.B. in Mollusken (Lespinet et al., 2002), der Spinne *Achaearanea* (Yamazaki et al., 2005) und auch in Vertebraten (Carver et al., 2001) ist Sna eher an morphogenetischen Prozesse und nicht an der Mesodermspezifizierung beteiligt.

4.2. Konsequenzen eines *Tc-twi*- bzw. *Tc-sna*-Verlustes auf die Musterbildung entlang der DV-Achse

Die zweite wichtige Fragestellung dieser Arbeit bestand in der Analyse der Auswirkung eines *Tc-twi*- bzw. *Tc-sna*-Verlustes auf mesektodermal, neuroektodermal und ektodermal exprimierte Gene.

4.2.1. *Tc-twi* ist für die Terminierung der Tc-Dorsal Kernaufnahme verantwortlich

Es konnte gezeigt werden, dass das zygotisch exprimierte Gen *Tc-twi* an der Terminierung des maternalen Tc-Dorsal-Gradienten beteiligt ist, indem es ab dem späten Blastodermstadium die Aktivierung des Tc-Dorsal-Inhibitors *Tc-cactus* übernimmt. Bei einem *Tc-twi*-Verlust kommt es somit zu einer verlängerten Dauer der Tc-Dorsal-Akkumulation in den ventralen Kernen, welche bis zur Gastrulationsperiode anhält. Tc-Twi ist somit an einem

Rückkopplungsmechanismus des NF- κ B-Faktors Tc-Dorsal beteiligt und damit ein Hauptfaktor beim Übergang von maternaler zu zygotischer Regulation der DV-Musterbildung bei *Tribolium*.

Interessanterweise konnten auch in der zygotisch-regulatorischen Regionen von *cactus* bei *Drosophila* Twi-Bindestellen identifiziert werden (Sandmann et al., 2007). Da diese zygotisch-regulatorische Region aber offensichtlich keinen Einfluss auf die DV-Musterbildung nimmt, könnte eine schwache, stabilisierende Funktion dieser Region eine Erklärung liefern, weshalb diese in den höheren Dipteren beibehalten wurde (Roth et al., 1991; Nunes da Fonseca et al., 2008).

In Vertebraten ist *twi* an der Etablierung eines negativen Rückkopplungsmechanismus, welcher den NF- κ B abhängigen Cytokin-Signalweg reprimiert, beteiligt (Sosic et al., 2003). Die Autoren postulieren, die NF- κ B-Twi-Partnerschaft als ein Modul zu betrachten, welches während der Evolution bewahrt wurde und in den nicht verwandten biologischen Prozessen DV-Musterbildung und Immunabwehr eingesetzt wurde. Bemerkenswerterweise wurde auch bei *Drosophila* ein zygotisches Zielgen als negativer Rückkopplungsregulator, für die im Perivitellinspalt ablaufende Aktivierungskaskade von Dorsal, vorgeschlagen. (Misra et al., 1998). Twi könnte aufgrund der gewonnenen Ergebnisse bei *Tribolium* diesem Faktor entsprechen.

Bei *Tribolium* könnte das NF- κ B-Twi-Modul für die Bedürfnisse der DV-Musterbildung in einem Kurzkeiminsekt angepasst worden sein.

Der länger bestehende Tc-Dorsal-Gradient in *twi*-RNAi Embryonen könnte *Tc-sim* und *Tc-rho* weiterhin in einer ventralen Domäne aktivieren, welche in einer breiteren Expression entlang der Mittellinie resultiert (Abb.10B,F, 13B,F).

Das frühe Verschwinden des Tc-Dorsal-Gradienten scheint wichtig für die positionelle Information der *Tc-sim*- und *Tc-rho*-Expression, während der Gastrulation in zwei lateralen Domänen zu sein. An dieser Stelle lässt sich darüber spekulieren, welcher Faktor im Wt diese positionelle Information liefert und die weitere Aktivierung dieser Gene nach dem Verschwinden von Tc-Dorsal übernimmt.

4.2.2. Tc-Sna als potentieller Aktivator

Bei *Drosophila* werden die *sim*- und die *rho*-Expression durch die Repressorfunktion von Sna im prospektiven Mesoderm auf laterale Bereiche beschränkt (Leptin 1991; Hemavathy et al., 1997; Markstein et al., 2002).

Bei *Tribolium* wird *Tc-sna* zusammen mit *Tc-sim* und *Tc-rho* ventral im Blastoderm exprimiert, was eine Repressorfunktion in diesem Stadium ausschließt.

Allerdings werden *Tc-sim* und *Tc-rho*, wie auch *Tc-sna*, in *sna*-RNAi-Embryonen sehr schwach posterior exprimiert (Abb.10C,13C). Das lässt in diesem Fall eine direkte bzw. indirekte Aktivatorfunktion von Tc-Sna vermuten. Die schwache Expression von *Tc-sim* und *Tc-rho* könnte entweder das Resultat eines nicht vollständigen *sna*-RNAi-Effektes oder die Restaktivität der frühen Aktivierung von Tc-Dorsal oder eines anderen Aktivators, sein. Mit Doppelfärbungen könnte geklärt werden, ob die Embryonen, die schwach *Tc-sna* exprimieren, auch diejenigen sind, in denen *Tc-sim* und *Tc-rho* posterior detektiert werden können.

Auch bei *Drosophila* ist die Aktivität von Sna Voraussetzung für die Expression einiger Gene, zu denen zum Einen *serpent* und *zfh-1*, welche für TF kodieren (Lai et al., 1991; Reuter 1994) und zum Anderen die mesodermspezifischen Gene ‚D‘ und ‚G‘ gehören (Casal und Leptin 1996). In diesen Fällen ist allerdings nicht geklärt in welcher funktionellen Beziehung Sna-Aktivität zur Expression dieser Gene steht. Hier bestehen die Möglichkeiten, dass Sna direkt als Aktivator wirken könnte, was allerdings aufgrund seiner Zugehörigkeit zur Zinkfingerproteinklasse - typische Repressoren - unerwartet wäre. Erwähnenswert ist dabei, dass der Sna-Promotor mindestens eine hochaffine Bindestelle für Sna selbst beinhaltet (Ip et al., 1994). Sna könnte somit ebenfalls an seiner eigenen Aktivierung bzw. Reprimierung beteiligt sein. Transfektionsexperimente, in welchen eine Sna-Bindestelle an einen heterologen Promotor gekoppelt wurde, zeigen die Fähigkeit von *Drosophila*-Sna als Aktivator zu wirken (Mauhin et al., 1993). Auch in Vertebraten konnte gezeigt werden, dass Snail2 positiv seine eigene Expression reguliert (Sakai et al., 2006).

Sna könnte aber auch als indirekter Aktivator wirken, indem es z.B. Repressoren der oben genannten Gene hemmt.

Eine Situation, in welcher Tc-Sna nach dem frühen Aktivierungsimpuls von Tc-Dorsal als Aktivator von *Tc-sim* und *Tc-rho* wirkt, ist also vorstellbar. Solch eine Aktivatorfunktion scheint aber nicht essentiell für die Embryonalentwicklung von *Tribolium* zu sein, da ein Großteil der *sna*-RNAi-Embryonen schlüpft. Andere Faktoren müssen demnach ebenfalls an der Aktivierung und Positionierung von *Tc-sim* und *Tc-rho* beteiligt sein.

Eine weitere Erklärung für die Reduzierung von *Tc-sim*- und *Tc-rho*-Expression in *sna*-RNAi-Embryonen könnte ein positiver Regulationsmechanismus von Tc-Sna auf Tc-Dorsal sein. In Vertebraten konnte ein solcher Rückkopplungsmechanismus identifiziert werden (Zhang et al., 2006). NF- κ B wirkt in *Xenopus* als positiver Regulator von Snail1 und Snail2. Snail2 ist aber auch indirekt an der Aktivierung der NF- κ B-Untereinheiten RelA, Rel2 und Rel3

beteiligt. Also wirkt Snail2 hier ebenfalls als indirekter Aktivator, und es könnte möglich sein, dass Sna bei *Tribolium* ebenfalls einen indirekten aktivierenden Einfluss auf Tc-Dorsal hat. Ein *Tc-sna* Verlust würde sich dann negativ auf die Aktivierung von *Tc-sim* und *Tc-rho* auswirken. Aufgrund der später einsetzenden Erstexpression von *Tc-sna* zu Beginn des differenzierten Blastoderms erscheint eine positive Rolle von Tc-Sna im Tc-Dorsal-Rückkopplungsmechanismus allerdings unwahrscheinlich. Hier ist es nötig die Tc-Dorsal Proteinverteilung detailliert in *sna*-RNAi-Embryonen zu untersuchen.

Falls Tc-Sna nicht reprimierend auf *Tc-sim* und *Tc-rho* wirkt, könnten andere Faktoren diese Funktion übernehmen. Bei *Drosophila* aktiviert Dorsal microRNAs, welche, durch ihre Bindung an komplementäre Sequenzen von mRNAs, deren Proteinsynthese verhindern (Biemar et al., 2005; Sokol und Ambros 2005). Zeitlinger et al. (2007) konnten durch ihre ChIP-on-chip Analysen zeigen, dass diese microRNAs das Potential haben, ebenfalls an neuroektodermale Gene, welche von *Drosophila*-Sna reprimiert werden, zu binden (Zeitlinger et al., 2007). Es ist also durchaus möglich, dass bei *Tribolium* microRNAs an der Reprimierung von *Tc-sim* und *Tc-rho* beteiligt sind.

4.2.3. Der Notch/Delta-Signalweg könnte die Positionierungs- bzw. Aktivierungsprozesse in der DV-Musterbildung von *Tribolium* beeinflussen

Tc-Sna könnte für die Reprimierung von *Tc-Delta* zuständig sein, da dessen Expression während der Gastrulation in *sna*-RNAi-Embryonen expandiert (Abb.12F).

Dies könnte aber auch wiederum einen Effekt auf die *Tc-sim* Expression ausüben, da der Notch-Delta Signalweg bei *Drosophila* an der Aktivierung und der Positionierung von *Dm-sim* beteiligt ist (Cowden und Levine 2002; Morel et al., 2003). Wird die wildtypische laterale *Tc-Delta* Expression, wie in *sna*-RNAi-Embryonen, nicht gewährleistet könnte dies zu einer schwachen diffusen *Tc-sim*-Expression führen (Abb.10C).

In frühen *twi*-RNAi-Embryonen wird *Tc-Delta*, bis auf eine kleine posteriore und später auch anteriore Domäne, nicht exprimiert (Abb.12B,E). Dabei ist es möglich, dass im frühen Wt-Embryo *Tc-Delta* in mesodermalen Zellen exprimiert wird, welche in *twi*-RNAi-Embryonen nicht vorhanden sind. Tc-Twi besitzt eine wichtige Rolle im Rückkopplungsmechanismus der Tc-Dorsal-Akkumulation. Vermutlich reguliert Tc-Twi auch gewisse Aspekte des Notch-Delta-Signalweges. Die Analyse von Notch-Mutanten bei *Drosophila* zeigte, dass der Notch-Signalweg essentiell für die *Drosophila*-*twi*-Regulation während der segmentalen Mesodermunterteilung ist (Tapanes-Castillo und Baylies 2004). Interessanterweise konnte in der Spinne *Achaeearanea tepidariorum* (*At*) gezeigt werden, dass *At-Delta* zusammen mit *At-*

twi in den Zellen des prospektiven Mesoderms exprimiert wird und dass *At-Delta*-RNAi zu einer Überproduktion *At-twi*-exprimierender mesodermaler Zellen führt (Oda et al., 2007). Also scheint es in den von Insekten evolutiv entfernten Arthropoden ebenfalls eine regulatorische Interaktion von *Delta* und *twi* zu geben, wobei hier die *twi*-exprimierenden Zellen von *Delta* eingeschränkt werden,

Es wird angenommen, dass regulatorische Hierarchien sehr flexibel sind (Leptin 2005). In diesem Fall würde das bedeuten, dass das regulatorische Notch-Twi-Modul während der Evolution konserviert und an spezielle Bedürfnisse angepasst wurde.

Ein reduziertes Notch-Signal in *twi*-RNAi-Embryonen bzw. ein expandiertes Notch-Signal in *sna*-RNAi-Embryonen, könnte sich also auf die Positionierung bzw. die Aktivierung von *Tc-sim* auswirken. Hier wäre es nötig *Tc*-Notch- oder *Tc-Delta*-RNAi-Embryonen herzustellen und im Hinblick auf die *Tc-sim*, aber auch die *Tc-twi*-Regulation zu untersuchen.

Bei *Drosophila* wird die initiale *sim*-Expression durch gekoppelte Dorsal-, Twi-, und Suppressor of Hairless (Su(H))-Bindestellen in der regulatorischen Region von *sim* etabliert (Kasai et al., 1992; Markstein et al., 2004). Kürzlich wurde postuliert, dass die ancestrale Mittellinie durch eine alleinige Twi-Regulation spezifiziert wird (Zinzen et al., 2006). Die Autoren begründen diese Hypothese mit fehlenden Su(H)-Bindestellen in der regulatorischen Region von *sim* in der Hymenoptere *Apis mellifera* (*A. mell.*). Sie beschreiben ein Modell, in welchem, während der Evolution holometaboler Insekten, Twi-Bindestellen zugunsten von Su(H)-Bindestellen in der *sim*-regulatorischen Region verloren gegangen sind. Die Analyse von *sim*-regulatorischen Regionen in divergenten Drosophiliden (*Drosophila pseudoobscura* und *Drosophila virilis*) zeigte, dass dieser Wechsel schnell und dynamisch verläuft.

Die Auswirkungen dieses Regulationswechsels spiegeln sich in der Breite der Mittellinie wieder. Bei *Drosophila* ist diese nur ein bis zwei Zellen breit, wohingegen sie fünf bis sechs Zellen in der Honigbiene *A. mell* umfasst. Da die Mittellinie bei *Tribolium* ca. drei Zellen breit ist, stellen die Autoren die Hypothese auf, dass bei *Tribolium* die *Tc-sim* Regulation ebenfalls hauptsächlich durch *Tc*-Twi geschieht. Dies ist allerdings nicht in jedem Fall mit den Ergebnissen in *twi*- und *sna*-RNAi-Embryonen vereinbar. Zum Einen ist, wie oben diskutiert, ein Einfluss des Notch Signalweges auf die *Tc-sim* Expression sehr wahrscheinlich und zum Anderen wird *Tc-sim*, trotz normaler *Tc-twi* Expression in *sna*-RNAi-Embryonen, nur sehr schwach dort exprimiert. Würde *Tc*-Twi der entscheidende Faktor bei der *Tc-sim*-Regulation sein, sollte *Tc-sim* in *sna*-RNAi-Embryonen exprimiert werden.

Da in frühen *twi*-RNAi-Embryonen *Tc-sna* nicht exprimiert wird (Abb.3N,P), außerdem *Tc*-Dorsal länger in ventralen Kernen akkumuliert (Abb.20B) und dadurch Gene wie *Tc-sim*

weiterhin aktiviert werden, könnte die wirkliche Funktion von *Tc-twi* im Prozess der *Tc-sim* Regulation überlagert sein.

Um eindeutige Ergebnisse zu erhalten, ist es also nötig, die regulatorischen Regionen von Genen wie *Tc-sim* zu lokalisieren und im Detail zu analysieren. Die Evolution regulatorischer Regionen ist eine entscheidende Komponente für die Entstehung morphologischer Unterschiede (Tautz 2000; Mann und Carroll 2002; Prud'homme et al., 2006).

4.2.4. Unterschiede im EGF-Signalsystem zwischen *Drosophila* und *Tribolium*

Die expandierte ventrale *Tc-sim*-Expression in gastrulierenden *twi*-RNAi-Embryonen resultiert in einer breiteren Mittellinie in Keimstreif-Embryonen, aus der eine erhöhte Neuroblastenanzahl hervorgeht. *Drosophila-sim* wurde als Hauptregulationsgen während der Differenzierung der Mittellinie beschrieben (Nambu et al., 1991). Ektopische *sim*-Expression führt zur ektopischen Aktivierung von z.B. *rho* oder *otd*, wobei *rho* eine Kontroll- und Regulationsfunktion im EGF-Signalweg zukommt (Chang et al., 2001; Freeman 2004). Während die Beziehung von *Tc-sim* zu *Tc-rho* und *Tc-otd* konserviert scheint, da deren Expression der breiteren bzw. schwächeren Expression von *Tc-sim* in *twi*- bzw. *sna*-RNAi-Embryonen folgt, zeigt die von Tc-EGFR aktivierte MAPK eine veränderte Expression gegenüber *Tc-rho* (Abb.14D,13E). Höchste Tc-MAPK-Konzentrationen sind nicht in der gleichen Domäne wie *Tc-rho* aktiv, sondern scheinen die *Tc-rho*-Expression entlang der Mittellinie zu flankieren. Diese Beziehung bleibt auch in *twi*-RNAi-Embryonen bestehen, in welchen die höchsten Tc-MAPK-Konzentrationen die breitere Mittellinie umgeben (Abb.14E). Hier scheint also auf dem evolutionären Weg zur Dipterenentwicklung eine Regulationsverschiebung stattgefunden zu haben. Um genau festzustellen, ob Tc-MAPK-Expression die *Tc-rho*-Expression flankiert, sollten Doppelfärbungen angefertigt werden.

Ein weiterer Unterschied zu *Drosophila* betrifft die Regulation von *Tc-vnd*. Während *vnd* bei *Drosophila* eine frühe Aktivierung durch Dorsal erfährt (Stathopoulos und Levine 2002), ist dies bei *Tribolium*, aufgrund der später einsetzenden *Tc-vnd*-Expression kurz vor der Gastrulation (Abb.15A), unwahrscheinlich, da Tc-Dorsal zu diesem Zeitpunkt nicht mehr in den ventralen Kernen akkumuliert ist (Chen et al., 2000). Außerdem beginnt die Expression von *Tc-vnd* direkt in zwei lateralen Streifen und nicht, wie *Tc-sim* und *Tc-rho*, ventral. Da die *Tc-vnd*-Expression genau der von Tc-MAPK folgt, könnte Tc-EGFR allein für die Aktivierung von *Tc-vnd* zuständig zu sein (Wheeler et al., 2005). Bei *Drosophila* ist EGFR für die Aufrechterhaltung der *vnd*-Expression nötig (Gabay et al., 1996; von Ohlen und Doe

2000; Shilo 2003; Zhao et al., 2007). Somit ist es vorstellbar, dass die frühe *vnd*-Aktivierung durch Dorsal für die schnelle Entwicklung von *Drosophila* nötig ist, da so eine frühe räumliche Aufteilung des Embryos möglich wird.

Um die Aufgabe des EGF-Signalweges bei *Tribolium* näher zu analysieren, wären EGFR RNAi-Experimente sinnvoll.

Bemerkenswert ist allerdings, dass die *Tc-vnd*-Expression in *twi*-RNAi-Embryonen ebenfalls eine gewisse Expansion in ventrale Bereiche zeigt (Abb.16B). Dies könnte zum Einen bedeuten, dass die regulatorische Region von *Tc-vnd* auch Tc-Dorsal-Bindestellen enthält, die allerdings in der wildtypischen Situation keine Funktion haben. Auch an dieser Stelle müsste eine Analyse der regulatorischen Region von *Tc-vnd* erfolgen.

Zum Anderen ist es möglich, dass die Tc-MAPK-Konzentration in der ventralen Region gastrulierender *twi*-RNAi Embryonen höher als im Wt und für eine *Tc-vnd*-Aktivierung ausreichend ist.

In *twi*-RNAi-Keimstreif-Embryonen wird *Tc-vnd* jedoch nicht mehr expandiert, sondern, wie auch Tc-MAPK, in zwei lateralen Domänen exprimiert (Abb.16E). Dies liefert einen weiteren Hinweis für die Aktivatorfunktion von Tc-EGFR auf *Tc-vnd*.

4.2.5. Der Sog/Dpp-Signalweg ist unabhängiger von Tc-Dorsal als bei *Drosophila*

Die Regulation von *sog* bei *Tribolium* zeigt ebenfalls Unterschiede zur Regulation von *sog* bei *Drosophila*. *Tc-sog* wird zwar, wie auch *Tc-sim*, *Tc-rho* und *Tc-Delta*, von Tc-Dorsal aktiviert (Nunes da Fonseca et al., 2008) und ventral im Blastoderm exprimiert, allerdings in einer, vor allem anterior viel breiteren Expressionsdomäne (Abb.18A).

Tc-Dorsal scheint in späteren Stadien keinen Einfluss mehr auf *Tc-sog* auszuüben, da die *Tc-sog* Expression in *twi*-RNAi-Embryonen, in welchen der Tc-Dorsal Gradient länger besteht, fast unverändert zur Wt-Expression ausfällt (Abb.18B,E). Lediglich die posteriore Expression in der inneren Schicht der Wachstumszone fehlt in diesen Embryonen.

Weiterhin hat sich gezeigt, dass *Tc-sna* keinen Einfluss auf die *Tc-sog*-Expression nimmt, da *Tc-sog* auch in *sna*-RNAi-Embryonen wildtypisch exprimiert wird (Abb.18C,F). *Sna* bei *Tribolium* kommt also nicht, wie bei *Drosophila* (Markstein et al., 2002), als Repressor von *Tc-sog* in Frage. Dies würde die These untermauern, dass *Sna* bei *Tribolium* nicht die essentielle Funktion als Repressor zukommt.

In der niederen Diptere *Anopheles gambiae* enthält die regulatorische Region von *Ag-sog* keine *Sna*-Bindestellen (Goltsev et al., 2007). Außerdem wurde für *Anopheles* gezeigt, dass

im Vergleich mit *Drosophila*, in einer größeren dorsalen Region des Embryos der Dpp-Signalweg für die DV-Musterbildung zuständig ist (Goltsev et al., 2007).

In Anbetracht der gewonnenen Ergebnisse bei *Tribolium*, wo das Dpp/Sog-System Funktionen ausführt, welche bei *Drosophila* durch Dorsal übernommen werden (Nunes da Fonseca et al., 2008), könnte dies einen Trend widerspiegeln, in welchem der Dorsal-Gradient innerhalb der Evolution von holometabolen Insekten immer mehr Einfluss in der DV-Musterbildung gewinnt, um eine schnelle und akkurate Expressionsfestlegung zu gewährleisten. Da das Dpp/Sog- bzw. BMP/Chordin-System wahrscheinlich die ancestrale Art der DV-Musterbildung ist (Akiyama-Oda und Oda 2006; Lowe et al., 2006), könnten weitere Studien in basaleren Insekten zur Aufklärung beitragen, wie der in der Immunabwehr eingesetzte Toll-Signalweg für die DV-Musterbildung übernommen wurde (Roth 2003).

Um zu überprüfen, inwieweit der gleichzeitige Verlust von *Tc-twi* sich auf den *sog*-RNAi-Embryo auswirkt, wurden *twi+sog*-RNAi-Embryonen analysiert.

In *twi+sog*-RNAi-Embryonen tritt, ebenso wie in *twi*-RNAi-Embryonen eine Expansion der *Tc-sim*-Expression entlang der Mittellinie auf (Abb.23C). Da Tc-Dorsal, aufgrund des *twi*-Verlustes in *twi+sog*-RNAi-Embryonen länger in den ventralen Kernen akkumuliert und Gene wie *Tc-sim* ventral aktivieren könnte, scheint Tc-Dorsal der entscheidende Faktor für die Polaritätsausprägung von *twi+sog* RNAi Embryonen zu sein.

Der Verlust von *Tc-sog* resultiert im Verlust von Neuroektoderm und führt in Keimstreifen-Embryonen zum „Doppel-dorsal“-Phänotyp. In diesen Embryonen bildet sich ektopisch dorsales Ektoderm entlang der Mittellinie, was vermutlich auf ein selbst organisierendes Musterbildungssystem in der Wachstumszone zurückzuführen ist (van der Zee et al., 2006). In der Wachstumszone wird *Tc-dpp* in zwei Domänen exprimiert, welche die innere, mesenchymale Schicht der Wachstumszone flankieren. In *sog*-RNAi-Embryonen bleibt dieses spezifische Musterbildungssystem der Wachstumszone im Ektoderm der neu gebildeten Segmente bestehen und führt so zum beschriebenen „Doppel-dorsal“-Phänotyp (van der Zee et al., 2006).

Bei gleichzeitigem Verlust von *Tc-twi* kommt es zum Verlust des Mesoderms und der „Doppel-dorsal“-Phänotyp ist nicht mehr zu beobachten. Im Gegensatz zur dorsalen und ventralen *Tc-pnr*-Expression in *sog*-RNAi-Embryonen, kann *Tc-pnr* in *twi+sog*-RNAi-Embryonen nur noch in einzelnen Zellgruppen entlang der AP-Achse detektiert werden (Abb.21D). Dies deutet darauf hin, dass die Mesoderm/Ektoderm-Grenze entscheidend für die Etablierung der vollen Tc-Dpp-Aktivität sein könnte.

Für eine weitere Analyse dieser Embryonen sollte die Tc-Dpp-Aktivität mittels pMAD-Antikörperfärbungen ermittelt werden.

4.2.6. Die Entwicklung des Nervensystems bei *Tribolium* erfolgt unabhängig vom Mesoderm

Die Entwicklung des Nervensystems bei *Tribolium* erfolgt, wie auch bei *Drosophila* (Leptin 1991), unabhängig vom Mesoderm, denn *twi*-RNAi-Embryonen, welche kein Mesoderm bilden, formen den ventralen Nervenstrang (Abb.17E). Dieser zeigt zwar Unregelmäßigkeiten im Vergleich mit dem Wt, welche aber entweder auf die Morphologie von *twi*-RNAi-Embryonen zurückzuführen oder aber das Resultat der breiteren Mittellinie in diesen Embryonen, sind.

Die Mittellinie ist eine Quelle lokalisierter Signale, die zur Entwicklung des Nervenstranges nötig sind. So ist es möglich, dass die breiter angelegte Mittellinie in *twi*-RNAi-Embryonen (Abb.11E) zu Lücken in der Verbindung der Neuronen auf den beiden Seiten des Embryos führt. Die erhöhte Anzahl proneuraler Cluster in *twi*-RNAi-Embryonen (Abb.17B) ist wahrscheinlich die Konsequenz der verbreiterten *Tc-sim*-Expression. Bei *Drosophila* entwickeln *sim*-Mutanten weniger proneurale Cluster (Chang et al., 2000).

Aufgrund der schwachen wiederkehrenden *Tc-sna*-Expression in den Neuroblasten ist an dieser Stelle nicht klar zu beantworten, welche Konsequenzen ein kompletter *Tc-sna*-Verlust für die ZNS-Entwicklung hat. Bei *Drosophila* führt die Deletion aller drei Mitglieder der Sna-Familie zu einem stark unterentwickelten Nervenstrang (Ashraf et al., 1999). Da bei *Tribolium* nur ein *sna*-Gen identifiziert werden konnte, ist ein ähnliches Ergebnis bei einem vollständigen *Tc-sna*-Verlust zu erwarten.

In *sna*-RNAi-Embryonen konnte eine schwache EGFR-Aktivität detektiert werden (Abb.14G). EGFR kontrolliert bei *Drosophila* die Musterbildung des ZNS entlang der DV-Achse (Gabay et al., 1996; Skeath 1998; Zhao und Skeath 2002). Die schwache EGFR-Expression in *sna*-RNAi-Embryonen ist also für die Entwicklung des Nervenstranges ausreichend.

Es sollte weiterhin versucht werden einen Komplettausfall von *Tc-sna* zu generieren. Begonnene *Tc-sna*-Morpholino-Injektionen erbrachten bisher keine Veränderungen der Ergebnisse. Morpholinos verhindern die Translation ihrer Zielgene. Auch Bucher und Klingler (2004) konnten keine Unterschiede zwischen *giant*-RNAi- und Morpholino-injizierten *Tribolium*-Embryonen feststellen (Bucher und Klingler 2004).

Eine genaue Analyse von *sna*-RNAi-Embryonen durch eine Doppelfärbung der *sna*-mRNA sowie eines anderen ZNS-spezifischen Markers ist eine weitere Möglichkeit, genau die Embryonen zu identifizieren, in denen ein Kompletterverlust von *Tc-sna* erzielt wurde.

4.3. Modell zur Twi- und Sna- Funktion bei *Tribolium*

Anhand der folgenden Grafik sollen die in diesem Teil der Arbeit gewonnenen Ergebnisse zusammengefasst werden (Abb.31). Das wichtigste Ergebnis ist die indirekte Kontrollfunktion des zygotischen Gens *Tc-twi* gegenüber dem Tc-Dorsal-Gradienten. Da *Tc-twi* den Tc-Dorsal-Inhibitor *Tc-cactus* aktiviert, führt ein *Tc-twi*-Verlust zu einer länger bestehenden Tc-Dorsal-Akkumulation in den ventralen Kernen. Der länger bestehende Tc-Dorsal-Gradient in *twi*-RNAi-Embryonen scheint für die breitere ventrale Expressionsdomäne der frühen Tc-Dorsal Zielgene *Tc-sim* und *Tc-rho* verantwortlich zu sein. Dies führt wiederum zu einem größeren Abstand der beiden lateralen, EGFR exprimierenden Streifen und somit zu einer Positionsveränderung in der DV-Musterbildung im Neuroektoderm.

Tc-sog wird zwar von Tc-Dorsal aktiviert, ist aber im Gegensatz zu *Tc-sim* und *Tc-rho* unabhängig von der Tc-Twi- und der Tc-Sna-Funktion im weiteren Entwicklungsvorgang.

Tc-Twi konnte eindeutig als Hauptregulator der Mesodermbildung identifiziert werden. *Tc-twi*-RNAi-Embryonen bilden keinerlei Mesoderm und Tc-Twi ist in *sna*-RNAi-Embryonen in der Lage, mesodermales Zellschicksal zu initiieren.

Da es in *sna*-RNAi-Embryonen nur zu einer verspäteten apikalen Konstriktion der ventralen Zellen kommt, scheinen *Tc-twi* und *Tc-sna* gemeinsam für eine wildtypische Invaginationsbewegung nötig zu sein. Tc-Twi könnte eine Funktion in der Kontrolle von Zellmigrations- und EMT-Prozessen haben. In *sna*-RNAi-Embryonen, in welchen *Tc-twi* exprimiert wird, kommt es zur Bildung mesenchymaler Zellen, die in der Lage sind, an ihren Bestimmungsort zu gelangen.

Tc-Sna scheint für die Regulation von Zellproliferation und der Etablierung von Gewebegrenzen wichtig zu sein, da beide Prozesse in *sna*-RNAi-Embryonen gestört ablaufen. Tc-Sna kann potentiell als Aktivator von *Tc-sim* und *Tc-rho* wirken. Eine indirekte Aktivierungs- und Positionsinformation über den Notch/Delta-Signalweg ist möglich, aber auch eine direkte Aktivatorfunktion von Tc-Sna ist nicht auszuschließen.

Da *Tc-twi* essentiell für die frühe *Tc-sna* Expression ist und *Tc-twi* sich positiv auf die *Tc-Delta* Expression auswirkt, *Tc-sna* aber vermutlich *Tc-Delta* reprimiert, könnte dieser Rückkopplungsmechanismus entscheidend für die DV-Musterbildung sein.

Die Herausforderung einen komplexen Vorgang wie die Kontrolle der Mesoderminternalisierung und der DV-Musterbildung zu verstehen, liegt wohl darin, den Einfluss und die Integration, sowie Koordination verschiedener Signalwege in diesem Prozess nachzuvollziehen. Obwohl *Drosophila* eine so schnelle und damit eng kontrollierte Entwicklung durchläuft, konnte hier durch ChIP-on-chip-Analysen festgestellt werden, dass Informationen aus verschiedensten Systemen durch die Genregulation integriert werden (Zeitlinger et al., 2007).

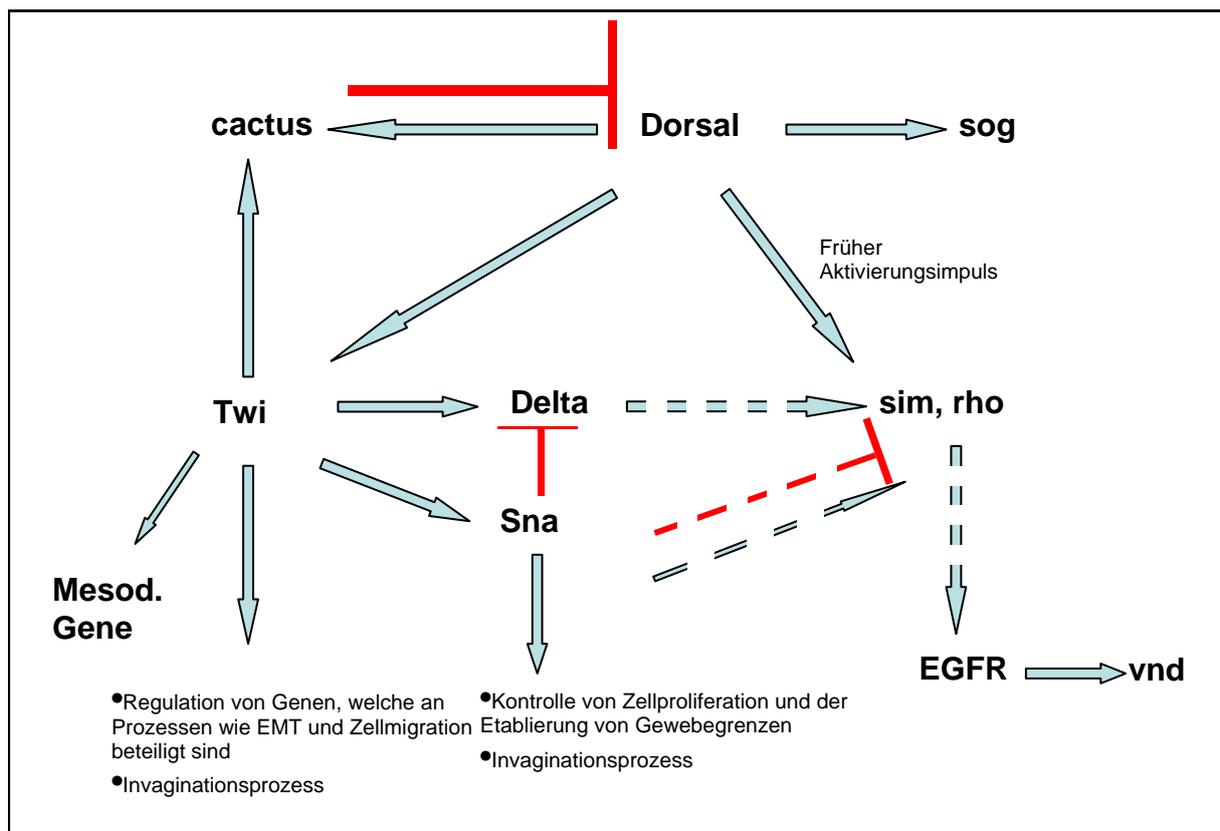


Abb.31.: Modell zur Twi- und Sna-Funktion bei Tribolium

Tc-Dorsal ist ein früher Aktivator von *Tc-twi*, *Tc-sog*, *Tc-sim* und *Tc-rho*. *Tc-twi* ist über die Aktivierung von *Tc-cactus*, indirekt an der Terminierung des Tc-Dorsal-Gradienten beteiligt. Nach dessen Verschwinden könnten *Tc-twi*, *Tc-sna* und *Tc-Delta* an der Aktivierung und Positionierung von *Tc-sim* und *Tc-rho* beteiligt sein. *Tc-vnd* wird vermutlich unabhängig von Tc-Dorsal durch Tc-EGFR aktiviert. *Tc-twi* ist ein Hauptregulationsgen für die Mesodermespezifizierung. *Tc-twi* und *Tc-sna* sind gemeinsam für die Bildung einer Ventralfurche nötig.

4.4. Die Funktion von *Concertina* bei *Tribolium*

Die Morphologie eines Embryos ist das Resultat umfassender Zellbewegungen, die durch komplexe Änderungen im Zytoskelett individueller Zellen erreicht werden. Bisher konnte gezeigt werden, dass *Tc-twi* und *Tc-sna* für die Bildung der Ventralfurche unverzichtbar sind. Allerdings ist bisher nichts über die Mediatoren, deren Aktivität letztendlich zu Veränderungen des Zytoskelettes führt, bei *Tribolium* bekannt.

Ein *cta*-Homolog konnte bei *Tribolium* identifiziert werden. Cta bildet die α -Untereinheit eines G-Proteins, welches an Rezeptoren gekoppelt ist.

Obwohl bei *Drosophila* *cta* und *fog* im selben Signalweg operieren, konnte kein *fog*-Homolog bei *Tribolium* gefunden werden. Da Liganden allgemein zu einer schnellen Evolutionsrate tendieren, besteht die Möglichkeit, dass sich die *fog*-Sequenz im Laufe der Evolution stark verändert hat. Man könnte versuchen Mikrosynten-Analysen der genomischen Regionen durchzuführen, um so ein mögliches *Tc-fog* zu identifizieren. Ebenfalls ist es möglich, dass bei *Tribolium* ein anderes Signalmolekül als Fog für die Rezeptoraktivierung verantwortlich ist.

Es ist unklar, ob die verzögerte Invagination in *cta*-RNAi-Embryonen (Abb.28) auf eine Funktion von Tc-Cta im Vorgang der Ventralfurchenbildung zurückzuführen ist. Es ist ebenso möglich, dass die verhinderte Bewegung des Amnions über den Embryo zu einer Verzögerung der Invaginationsbewegung führt. Das laterale Ektoderm in *cta*-RNAi-Embryonen biegt sich nicht nach ventral (Abb.26B), wodurch eine Kraft fehlen könnte, die im Wt die Invagination ventraler Zellen beschleunigt.

Tribolium und *Anopheles* zeigen eine ungeordnete Mesoderminvagination, die Ähnlichkeiten mit *Drosophila-fog*-Mutanten haben (Handel et al., 2005; Goltsev et al., 2007). Es ist demnach möglich, dass der Fog/Cta-Signalweg erst in höheren Dipteren, wie *Drosophila* für die Ventralfurchenbildung übernommen wurde.

Das wichtigste Ergebnis eines *Tc-cta*-Verlustes ist die fehlende Bewegung des Amnions und der Serosa über den Embryo (Abb.24 und 31). Posteriore Querschnitte gastrulierender *cta*-RNAi-*Tribolium*-Embryonen ähneln Querschnitten von *Drosophila*-Embryonen während der Mesoderminvagination (Abb. 24F). Die Bewegung des Amnions über den *Tribolium*-Embryo ist also ein entscheidender Faktor für die unterschiedliche Morphologie von *Tribolium*- und *Drosophila*-Embryonen.

Tc-cta scheint an der Initiierung von Zellformänderungen, welche für die starken Bewegungen des Amnions nötig sind, beteiligt zu sein. Interessant ist dabei der Vergleich der posterioren Mitteldarminvagination bei *Drosophila* mit der Form der posterioren Amnionfalte bei *Tribolium* (siehe Abb.1.2E,D). Beide Vorgänge entsprechen starken Bewegungen, die sich in ihrer Lateralansicht sehr ähnlich sehen, da in beiden Fällen eine tiefe Einfaltung im Embryo entsteht. Man könnte spekulieren, dass dies die Verbindung der Cta-Funktion bei *Drosophila* und *Tribolium* darstellt. Für die Bildung tiefer embryonaler Einfaltungen sind ähnliche Zellformveränderungen nötig, die von Cta bei der Amnionbewegung bei *Tribolium* und der posterioren Mitteldarminvagination bei *Drosophila* vermittelt werden könnten.

Betrachtet man Gastrulationsbewegungen in verschiedenen Organismen, so können diese sehr variabel ausfallen. Auf der zellulären Ebene sind jedoch viele Gemeinsamkeiten zu finden. Zellformveränderungen bedürfen Veränderungen im Zytoskellet der Zelle und es ist von Vorteil, etablierte Mechanismen in der Evolution beizubehalten. Bezeichnenderweise zeigt *Drosophila-cta* starke Sequenzähnlichkeiten mit den G α -12- und G α -13-Proteinen aus Säugern, die ebenfalls Zellformveränderungen vermitteln. Es scheint also, dass der über heterotrimere G-Proteine vermittelte Signalweg zur Änderung des Zytoskelletes in der Evolution bewahrt wurde (Barrett et al., 1997).

Sollte Cta bei *Tribolium* keine Funktion während der Ventralfurchenbildung und Mitteldarminvagination zukommen, könnte seine Funktion für diese Prozesse bei *Drosophila* rekrutiert worden sein, um eine schnelle geordnete Abfolge von Zellmorphologieänderungen zu vermitteln.

Obwohl die posteriore Region von *Tc-cta*-RNAi-Embryonen morphologisch in einem früheren Stadium verbleibt und die Wachstumszone eine abweichende Anordnung ihrer Schichten zeigt (Abb.26D), verläuft die Initiierung des Segmentierungsprozess wildtypisch (Abb.30).

Durch die wirkenden Zugkräfte während des Elongationsprozesses, reißen *cta*-RNAi-Embryonen in posterioren Regionen ein. Im weiteren Wachstumsprozess entsteht dadurch ein verdrehtes und gestauchtes Abdomen (Abb.27O,30K).

5. Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war eine Ausweitung des Verständnisses evolutionärer Veränderungen der Mesodermentwicklung und der Gastrulation und der damit verbundenden DV-Musterbildung bei Insekten. Zu diesem Zweck wurden die Funktionen der Gene *twi*, *sna* und *concertina* beim Käfer *Tribolium castaneum* (*Tc*) analysiert und mit den bekannten Funktionen aus der Fliege *Drosophila melanogaster* (*Dm*) verglichen.

Bei *Drosophila* aktiviert der stabile Dorsal-Kern-Gradient *twi* und *sna* auf der Ventralseite des frühen Embryos. Zellen dieser Domäne invaginieren durch die Ventralfurche und bilden die mesodermale Schicht im Embryo. Andere DV-Musterbildungsgene werden ebenfalls von Dm-Dorsal in spezifischen Domänen entlang der DV-Achse des Embryos aktiviert.

Bei *Tribolium castaneum*, einem Käfer mit einer anzeutraleren Art der Embryogenese, verschwindet der Tc-Dorsal-Kern-Gradient früher als bei *Drosophila*, er ist aber dennoch in der Lage, *Tc-twi* und weitere DV-Musterbildungsgene ventral zu aktivieren.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass das zygotische Gen *Tc-twi* an der Terminierung des Dorsal-Gradienten beteiligt ist und somit eine wichtige Funktion beim Übergang der maternalen zur zygotischen DV-Musterbildungskontrolle spielt. Zusammen mit *Tc-sna* ist *Tc-twi* für die Etablierung der korrekten Musterbildung von Mesoderm, Mesektoderm und Neuroektoderm während der Gastrulation notwendig.

Tc-Twi ist, wie auch bei *Drosophila*, der Hauptregulator für die Entwicklung des Mesoderms und ein Initiator von Zellmorphologieänderungen für die Ventralfurchenbildung. Des Weiteren ist *Tc-sna* für die Etablierung von Gewebegrenzen und die Kontrolle der Zellproliferation nötig, scheint aber keine fundamentale Rolle während der Mesodermentwicklung zu haben.

Auf der Suche nach Homologen bekannter Effektorgene, die für Zellmorphologieänderungen in der Ventralfurche von *Drosophila* verantwortlich sind, wurde *Tc-concertina* (*cta*) identifiziert. Die essentielle Funktion von Cta bei *Tribolium* scheint allerdings die Bildung der posterioren Amnionfalte zu sein, durch welche die Amnionhöhle entsteht. Ohne die Bewegung des posterioren Amnions ähnelt ein Querschnitt von gastrulierenden *Tribolium* Embryonen auffallend dem von *Drosophila* Embryonen.

Die sehr ähnliche Morphologie der posterioreren Mitteldarminvagination bei *Drosophila* und der posterioren Amnionfaltenbildung bei *Tribolium*, sowie die Tatsache, dass beide Vorgänge Cta benötigen, deutet darauf hin, dass es sich um homologe morphologische Prozesse handelt.

5. Abstract

The aim of this work was to extend the understanding of changes in insect development during the processes of mesoderm formation and gastrulation and related aspects of the patterning of the DV-axis.

To this end, the functions of the genes *twi*, *sna*, and *concertina* were examined in the beetle *Tribolium castaneum* (*Tc*), and were compared to those known from the fruitfly *Drosophila melanogaster* (*Dm*).

In *Drosophila*, *twi* and *sna* transcription in a ventral domain of the embryo is activated by the stable nuclear Dorsal-gradient. Cells from this domain will invaginate through the formation of the ventral furrow and are fated to become mesoderm. Dm-Dorsal also activates other DV-patterning genes in specific domains of the embryo.

In *Tribolium*, a beetle with an ancestral type of embryogenesis, the nuclear Dorsal-gradient is not stable and disappears early, but is still able to direct the early ventral domain of *Tc-twi* and some other DV-patterning genes. In this work it was shown that zygotic *Tc-twi* has a novel function in the termination of the maternal nuclear Dorsal-gradient, indicating that *Tc-twi* plays an important role for the switch from maternal to zygotic control of DV-patterning. Together *Tc-twi* and *Tc-sna* are necessary to establish the correct DV-pattern of mesoderm, mesectoderm and neuroectoderm during gastrulation.

Like in *Drosophila*, *Tc-twi* is a master regulatory gene of mesoderm development and initiates cell shape changes. It was also found that *Tc-sna* is needed for the establishment of tissue boundaries and the control of cell proliferation, but seems to have no fundamental role for mesoderm development.

Looking for homologs of known effectors of cell shape changes during ventral furrow formation in *Drosophila*, *Tc-concertina* (*cta*) was identified. The essential function of *cta* in *Tribolium* seems to be the formation of the posterior amniotic fold which leads to the formation of the amniotic cavity covering the embryo on the ventral side.

Without the amnion movement, cross sections of gastrulating *Tribolium* embryos look strikingly similar to *Drosophila* embryos.

The very similar morphology of the posterior midgut invagination in *Drosophila* and the posterior amniotic fold in *Tribolium*, together with the fact that both require Cta-function suggest that the morphologies are homologous.

6. Literaturverzeichnis

- Akiyama-Oda, Y. und H. Oda (2006). "Axis specification in the spider embryo: *dpp* is required for radial-to-axial symmetry transformation and *sog* for ventral patterning." *Development* **133**(12): 2347-57.
- Ashraf, S. I., X. Hu, J. Roote und Y. T. Ip (1999). "The mesoderm determinant snail collaborates with related zinc-finger proteins to control *Drosophila* neurogenesis." *Embo J* **18**(22): 6426-38.
- Bardin, A. J. und F. Schweisguth (2006). "Bearded family members inhibit Neuralized-mediated endocytosis and signaling activity of Delta in *Drosophila*." *Dev Cell* **10**(2): 245-55.
- Barello-Gimeno, A. und M. A. Nieto (2005). "The Snail genes as inducers of cell movement and survival: implications in development and cancer." *Development* **132**: 3151-3161.
- Barrallo-Gimeno, A. und M. A. Nieto (2005). "The Snail genes as inducers of cell movement and survival: implications in development and cancer." *Development* **132**(14): 3151-61.
- Barrett, K., M. Leptin und J. Settleman (1997). "The Rho GTPase and a putative RhoGEF mediate a signaling pathway for the cell shape changes in *Drosophila* gastrulation." *Cell* **91**(7): 905-15.
- Bate, M. und E. Rushton (1993). "Myogenesis and muscle patterning in *Drosophila*." *C R Acad Sci III* **316**(9): 1047-61.
- Bate, M., E. Rushton und D. A. Currie (1991). "Cells with persistent twist expression are the embryonic precursors of adult muscles in *Drosophila*." *Development* **113**(1): 79-89.
- Beermann, A. u. und R. Schröder (2008). "Sites of FGF signalling and perception during embryogenesis of the beetle *Tribolium castaneum*." *Submitted to Development Genes and Evolution*.
- Beiman, M., B. Z. Shilo und T. Volk (1996). "Heartless, a *Drosophila* FGF receptor homolog, is essential for cell migration and establishment of several mesodermal lineages." *Genes Dev* **10**(23): 2993-3002.
- Belvin, M. P. und K. V. Anderson (1996). "A conserved signaling pathway: the *Drosophila* toll-dorsal pathway." *Annu Rev Cell Dev Biol* **12**: 393-416.
- Belvin, M. P., Y. Jin und K. V. Anderson (1995). "Cactus protein degradation mediates *Drosophila* dorsal-ventral signaling." *Genes Dev* **9**(7): 783-93.
- Berghammer, A. J., M. Klingler und E. A. Wimmer (1999). "A universal marker for transgenic insects." *Nature* **402**(6760): 370-1.
- Bergmann, A., D. Stein, R. Geisler, S. Hagenmaier, B. Schmid, N. Fernandez, B. Schnell und C. Nusslein-Volhard (1996). "A gradient of cytoplasmic Cactus degradation establishes the nuclear localization gradient of the dorsal morphogen in *Drosophila*." *Mech Dev* **60**(1): 109-23.
- Berns, N. (2001). "Untersuchung zur Struktur und Funktion des *Tribolium* Brachyury-Orthologs Tcbyn." *Dissertation Universität Tübingen*.
- Bhat, K. M. (1999). "Segment polarity genes in neuroblast formation and identity specification during *Drosophila* neurogenesis." *Bioessays* **21**(6): 472-85.
- Biehs, B., V. Francois und E. Bier (1996). "The *Drosophila* short gastrulation gene prevents Dpp from autoactivating and suppressing neurogenesis in the neuroectoderm." *Genes Dev* **10**(22): 2922-34.
- Biemar, F., R. Zinzen, M. Ronshaugen, V. Sementchenko, J. R. Manak und M. S. Levine (2005). "Spatial regulation of microRNA gene expression in the *Drosophila* embryo." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(44): 15907-11.

- Blanco, M. J., G. Moreno-Bueno, D. Sarrio, A. Locascio, A. Cano, J. Palacios und M. A. Nieto (2002). "Correlation of Snail expression with histological grade and lymph node status in breast carcinomas." *Oncogene* **21**(20): 3241-6.
- Bloch-Zupan, A., N. Hunter, A. Manthey und J. Gibbins (2001). "R-twist gene expression during rat palatogenesis." *Int J Dev Biol* **45**(2): 397-404.
- Bucher, G. und M. Klingler (2004). "Divergent segmentation mechanism in the short germ insect *Tribolium* revealed by giant expression and function." *Development* **131**(8): 1729-40.
- Bucher, G., J. Scholten und M. Klingler (2002). "Parental RNAi in *Tribolium* (Coleoptera)." *Curr Biol* **12**(3): R85-6.
- Cabrera, C. V. (1990). "Lateral inhibition and cell fate during neurogenesis in *Drosophila*: the interactions between scute, Notch and Delta." *Development* **110**(1): 733-42.
- Carver, E. A., R. Jiang, Y. Lan, K. F. Oram und T. Gridley (2001). "The mouse snail gene encodes a key regulator of the epithelial-mesenchymal transition." *Mol Cell Biol* **21**(23): 8184-8.
- Casal, J. und M. Leptin (1996). "Identification of novel genes in *Drosophila* reveals the complex regulation of early gene activity in the mesoderm." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(19): 10327-32.
- Chang, J., I. O. Kim, J. S. Ahn und S. H. Kim (2001). "The CNS midline cells control the spitz class and *Egfr* signaling genes to establish the proper cell fate of the *Drosophila* ventral neuroectoderm." *Int J Dev Biol* **45**(5-6): 715-24.
- Chang, J., I. O. Kim, J. S. Ahn, J. S. Kwon, S. H. Jeon und S. H. Kim (2000). "The CNS midline cells coordinate proper cell cycle progression and identity determination of the *Drosophila* ventral neuroectoderm." *Dev Biol* **227**(2): 307-23.
- Chen, G., K. Handel und S. Roth (2000). "The maternal NF-kappaB/dorsal gradient of *Tribolium castaneum*: dynamics of early dorsoventral patterning in a short-germ beetle." *Development* **127**(23): 5145-56.
- Chen, Z. F. und R. R. Behringer (1995). "twist is required in head mesenchyme for cranial neural tube morphogenesis." *Genes Dev* **9**(6): 686-99.
- Chu, H., C. Parras, K. White und F. Jimenez (1998). "Formation and specification of ventral neuroblasts is controlled by *vnd* in *Drosophila* neurogenesis." *Genes Dev* **12**(22): 3613-24.
- Corsi, A. K., S. A. Kostas, A. Fire und M. Krause (2000). "*Caenorhabditis elegans* twist plays an essential role in non-striated muscle development." *Development* **127**(10): 2041-51.
- Costa, M., E. T. Wilson und E. Wieschaus (1994). "A putative cell signal encoded by the folded gastrulation gene coordinates cell shape changes during *Drosophila* gastrulation." *Cell* **76**(6): 1075-89.
- Cowden, J. und M. Levine (2002). "The Snail repressor positions Notch signaling in the *Drosophila* embryo." *Development* **129**(7): 1785-93.
- Crews, S., R. Franks, S. Hu, B. Matthews und J. Nambu (1992). "*Drosophila* single-minded gene and the molecular genetics of CNS midline development." *J Exp Zool* **261**(3): 234-44.
- Crews, S. T., J. B. Thomas und C. S. Goodman (1988). "The *Drosophila* single-minded gene encodes a nuclear protein with sequence similarity to the *per* gene product." *Cell* **52**(1): 143-51.
- Cripps, R. M., B. L. Black, B. Zhao, C. L. Lien, R. A. Schulz und E. N. Olson (1998). "The myogenic regulatory gene *Mef2* is a direct target for transcriptional activation by *Twist* during *Drosophila* myogenesis." *Genes Dev* **12**(3): 422-34.

- Dawes-Hoang, R. E., K. M. Parmar, A. E. Christiansen, C. B. Phelps, A. H. Brand und E. F. Wieschaus (2005). "folded gastrulation, cell shape change and the control of myosin localization." *Development* **132**(18): 4165-78.
- De Renzis, S., J. Yu, R. Zinzen und E. Wieschaus (2006). "Dorsal-ventral pattern of Delta trafficking is established by a Snail-Tom-Neutralized pathway." *Dev Cell* **10**(2): 257-64.
- DeLotto, Y., C. Smith und R. DeLotto (2001). "Multiple isoforms of the *Drosophila* Spatzle protein are encoded by alternatively spliced maternal mRNAs in the precellular blastoderm embryo." *Mol Gen Genet* **264**(5): 643-52.
- Doyle, H. J., R. Kraut und M. Levine (1989). "Spatial regulation of *zerknüllt*: a dorsal-ventral patterning gene in *Drosophila*." *Genes Dev* **3**(10): 1518-33.
- Estes, P., J. Mosher und S. T. Crews (2001). "*Drosophila* single-minded represses gene transcription by activating the expression of repressive factors." *Dev Biol* **232**(1): 157-75.
- Fan, X. (2001). *Apis dorsal, gene structure, role in oogenesis, embryonic development and induction of an innate response. Universität zu Tübingen. Inaugural- Dissertation.*
- Ferguson, E. L. (1996). "Conservation of dorsal-ventral patterning in arthropods and chordates." *Curr Opin Genet Dev* **6**(4): 424-31.
- Ferguson, E. L. und K. V. Anderson (1992). "Decapentaplegic acts as a morphogen to organize dorsal-ventral pattern in the *Drosophila* embryo." *Cell* **71**(3): 451-61.
- Fox, D. T. und M. Peifer (2007). "Abelson kinase (Abl) and RhoGEF2 regulate actin organization during cell constriction in *Drosophila*." *Development* **134**(3): 567-78.
- Francois, V., M. Solloway, J. W. O'Neill, J. Emery und E. Bier (1994). "Dorsal-ventral patterning of the *Drosophila* embryo depends on a putative negative growth factor encoded by the short gastrulation gene." *Genes Dev* **8**(21): 2602-16.
- Freeman, M. (2004). "Proteolysis within the membrane: rhomboids revealed." *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**(3): 188-97.
- Fritzenwanker, J. H., M. Saina und U. Technau (2004). "Analysis of forkhead and snail expression reveals epithelial-mesenchymal transitions during embryonic and larval development of *Nematostella vectensis*." *Dev Biol* **275**(2): 389-402.
- Fujiwara, S., J. C. Corbo und M. Levine (1998). "The snail repressor establishes a muscle/notochord boundary in the *Ciona* embryo." *Development* **125**(13): 2511-20.
- Gabay, L., H. Scholz, M. Golembo, A. Klaes, B. Z. Shilo und C. Klambt (1996). "EGF receptor signaling induces pointed P1 transcription and inactivates Yan protein in the *Drosophila* embryonic ventral ectoderm." *Development* **122**(11): 3355-62.
- Gabay, L., R. Seger und B. Z. Shilo (1997). "In situ activation pattern of *Drosophila* EGF receptor pathway during development." *Science* **277**(5329): 1103-6.
- Gachot-Neveu, H., C. Stoetzel, R. Quillet, H. Dollfus und F. Perrin-Schmitt (2002). "Natural TWIST protein variants in a panel of eleven non-human primates: possible implications of TWIST gene-tree for primate species tree." *Dev Genes Evol* **212**(10): 496-503.
- Gailey, D. A., J. C. Billeter, J. H. Liu, F. Bauzon, J. B. Allendorfer und S. F. Goodwin (2006). "Functional conservation of the fruitless male sex-determination gene across 250 Myr of insect evolution." *Mol Biol Evol* **23**(3): 633-43.
- Gajewski, K., Y. Kim, C. Y. Choi und R. A. Schulz (1998). "Combinatorial control of *Drosophila* *mef2* gene expression in cardiac and somatic muscle cell lineages." *Dev Genes Evol* **208**(7): 382-92.
- Gitelman, I. (1997). "Twist protein in mouse embryogenesis." *Dev Biol* **189**(2): 205-14.
- Golembo, M., E. Raz und B. Z. Shilo (1996). "The *Drosophila* embryonic midline is the site of Spitz processing, and induces activation of the EGF receptor in the ventral ectoderm." *Development* **122**(11): 3363-70.

- Goltsev, Y., N. Fuse, M. Frasch, R. P. Zinzen, G. Lanzaro und M. Levine (2007). "Evolution of the dorsal-ventral patterning network in the mosquito, *Anopheles gambiae*." *Development* **134**(13): 2415-24.
- Govind, S. (1999). "Control of development and immunity by rel transcription factors in *Drosophila*." *Oncogene* **18**(49): 6875-87.
- Grau, Y., C. Carteret und P. Simpson (1984). "Mutations and Chromosomal Rearrangements Affecting the Expression of *Snail*, a Gene Involved in Embryonic Patterning in *DROSOPHILA MELANOGASTER*." *Genetics* **108**(2): 347-360.
- Grosshans, J. und E. Wieschaus (2000). "A genetic link between morphogenesis and cell division during formation of the ventral furrow in *Drosophila*." *Cell* **101**(5): 523-31.
- Gryzik, T. und H. A. Muller (2004). "FGF8-like1 and FGF8-like2 encode putative ligands of the FGF receptor *Htl* and are required for mesoderm migration in the *Drosophila* gastrula." *Curr Biol* **14**(8): 659-67.
- Gullaud, M., R. Delanoue und J. Silber (2003). "A *Drosophila* model to study the functions of TWIST orthologs in apoptosis and proliferation." *Cell Death Differ* **10**(6): 641-51.
- Gurdon, J. B. (1987). "Embryonic induction-molecular prospects." *Development* **99**: 285-306.
- Handel, K., A. Basal, X. Fan und S. Roth (2005). "*Tribolium castaneum* twist: gastrulation and mesoderm formation in a short-germ beetle." *Dev Genes Evol* **215**(1): 13-31.
- Handel, K., C. G. Grunfelder, S. Roth und K. Sander (2000). "*Tribolium* embryogenesis: a SEM study of cell shapes and movements from blastoderm to serosal closure." *Dev Genes Evol* **210**(4): 167-79.
- Harfe, B. D., A. Vaz Gomes, C. Kenyon, J. Liu, M. Krause und A. Fire (1998). "Analysis of a *Caenorhabditis elegans* Twist homolog identifies conserved and divergent aspects of mesodermal patterning." *Genes Dev* **12**(16): 2623-35.
- Hayward, D. C., D. J. Miller und E. E. Ball (2004). "snail expression during embryonic development of the coral *Acropora*: blurring the diploblast/triploblast divide?" *Dev Genes Evol* **214**(5): 257-60.
- Hemavathy, K., X. Meng und Y. T. Ip (1997). "Differential regulation of gastrulation and neuroectodermal gene expression by *Snail* in the *Drosophila* embryo." *Development* **124**(19): 3683-91.
- Hopwood, N. D., A. Pluck und J. B. Gurdon (1989). "A *Xenopus* mRNA related to *Drosophila* twist is expressed in response to induction in the mesoderm and the neural crest." *Cell* **59**(5): 893-903.
- Ip, Y. T. und T. Gridley (2002). "Cell movements during gastrulation: snail dependent and independent pathways." *Curr Opin Genet Dev* **12**(4): 423-9.
- Ip, Y. T., K. Maggert und M. Levine (1994). "Uncoupling gastrulation and mesoderm differentiation in the *Drosophila* embryo." *Embo J* **13**(24): 5826-34.
- Ip, Y. T., R. E. Park, D. Kosman, E. Bier und M. Levine (1992). "The dorsal gradient morphogen regulates stripes of rhomboid expression in the presumptive neuroectoderm of the *Drosophila* embryo." *Genes Dev* **6**(9): 1728-39.
- Ip, Y. T., R. E. Park, D. Kosman, K. Yazdanbakhsh und M. Levine (1992). "dorsal-twist interactions establish snail expression in the presumptive mesoderm of the *Drosophila* embryo." *Genes Dev* **6**(8): 1518-30.
- Jazwinska, A., C. Rushlow und S. Roth (1999). "The role of brinker in mediating the graded response to Dpp in early *Drosophila* embryos." *Development* **126**(15): 3323-34.
- Jiang, J., D. Kosman, Y. T. Ip und M. Levine (1991). "The dorsal morphogen gradient regulates the mesoderm determinant twist in early *Drosophila* embryos." *Genes Dev* **5**(10): 1881-91.
- Kasai, Y., J. R. Nambu, P. M. Lieberman und S. T. Crews (1992). "Dorsal-ventral patterning in *Drosophila*: DNA binding of snail protein to the single-minded gene." *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(8): 3414-8.

- Keller, R. E. (1981). "An experimental analysis of the role of bottle cells and the deep marginal zone in gastrulation of *Xenopus laevis*." *J Exp Zool* **216**(1): 81-101.
- Kim, I. O., I. C. Kim, S. Kim, Y. K. Kwon, P. L. Han, S. H. Jeon und S. H. Kim (2005). "CNS midline cells contribute to maintenance of the initial dorsoventral patterning of the *Drosophila* ventral neuroectoderm." *J Neurobiol* **62**(4): 397-405.
- Kim, S. H. und S. T. Crews (1993). "Influence of *Drosophila* ventral epidermal development by the CNS midline cells and spitz class genes." *Development* **118**(3): 893-901.
- Kolsch, V., T. Seher, G. J. Fernandez-Ballester, L. Serrano und M. Leptin (2007). "Control of *Drosophila* gastrulation by apical localization of adherens junctions and RhoGEF2." *Science* **315**(5810): 384-6.
- Kosman, D., Y. T. Ip, M. Levine und K. Arora (1991). "Establishment of the mesoderm-neuroectoderm boundary in the *Drosophila* embryo." *Science* **254**(5028): 118-22.
- Lai, Z. C., M. E. Fortini und G. M. Rubin (1991). "The embryonic expression patterns of *zfh-1* and *zfh-2*, two *Drosophila* genes encoding novel zinc-finger homeodomain proteins." *Mech Dev* **34**(2-3): 123-34.
- Lee, C. M., D. S. Yu, S. T. Crews und S. H. Kim (1999). "The CNS midline cells and spitz class genes are required for proper patterning of *Drosophila* ventral neuroectoderm." *Int J Dev Biol* **43**(4): 305-15.
- Lee, Y. M., T. Park, R. A. Schulz und Y. Kim (1997). "Twist-mediated activation of the NK-4 homeobox gene in the visceral mesoderm of *Drosophila* requires two distinct clusters of E-box regulatory elements." *J Biol Chem* **272**(28): 17531-41.
- Leptin, M. (1991). "twist and snail as positive and negative regulators during *Drosophila* mesoderm development." *Genes Dev* **5**(9): 1568-76.
- Leptin, M. (2005). "Gastrulation Movements: the Logic and the Nuts and Bolts." *Developmental Cell* **8**: 305-320.
- Leptin, M. und B. Grunewald (1990). "Cell shape changes during gastrulation in *Drosophila*." *Development* **110**(1): 73-84.
- Leptin, M. und S. Roth (1994). "Autonomy and non-autonomy in *Drosophila* mesoderm differentiation and morphogenesis." *Development* **120**: 558-568.
- Lespinet, O., A. J. Nederbragt, M. Cassan, W. J. Dictus, A. E. van Loon und A. Adoutte (2002). "Characterisation of two snail genes in the gastropod mollusc *Patella vulgata*. Implications for understanding the ancestral function of the snail-related genes in Bilateria." *Dev Genes Evol* **212**(4): 186-95.
- Lilly, B., S. Galewsky, A. B. Firulli, R. A. Schulz und E. N. Olson (1994). "D-MEF2: a MADS box transcription factor expressed in differentiating mesoderm and muscle cell lineages during *Drosophila* embryogenesis." *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(12): 5662-6.
- Lowe, C. J., M. Terasaki, M. Wu, R. M. Freeman, Jr., L. Runft, K. Kwan, S. Haigo, J. Aronowicz, E. Lander, C. Gruber, M. Smith, M. Kirschner und J. Gerhart (2006). "Dorsoventral patterning in hemichordates: insights into early chordate evolution." *PLoS Biol* **4**(9): e291.
- Maestro, R., A. P. Dei Tos, Y. Hamamori, S. Krasnokutsky, V. Sartorelli, L. Kedes, C. Doglioni, D. H. Beach und G. J. Hannon (1999). "Twist is a potential oncogene that inhibits apoptosis." *Genes Dev* **13**(17): 2207-17.
- Mann, R. S. und S. B. Carroll (2002). "Molecular mechanisms of selector gene function and evolution." *Curr Opin Genet Dev* **12**(5): 592-600.
- Manzanares, M., A. Locascio und M. A. Nieto (2001). "The increasing complexity of the Snail gene superfamily in metazoan evolution." *Trends Genet* **17**(4): 178-81.
- Markstein, M., P. Markstein, V. Markstein und M. S. Levine (2002). "Genome-wide analysis of clustered Dorsal binding sites identifies putative target genes in the *Drosophila* embryo." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(2): 763-8.

- Markstein, M., R. Zinzen, P. Markstein, K. P. Yee, A. Erives, A. Stathopoulos und M. Levine (2004). "A regulatory code for neurogenic gene expression in the *Drosophila* embryo." *Development* **131**(10): 2387-94.
- Mauhin, V., Y. Lutz, C. Dennefeld und A. Alberga (1993). "Definition of the DNA-binding site repertoire for the *Drosophila* transcription factor SNAIL." *Nucleic Acids Res* **21**(17): 3951-7.
- Maxton Kuchenmeister, K., K. Handel, U. Schmidt-Ott, S. Roth und H. JackleJackle (1999). "Toll homologue expression in the beetle *tribolium* suggests a different mode of dorsoventral patterning than in *drosophila* embryos." *Mech Dev* **83**(1-2): 107-14.
- Mayor, R., N. Guerrero, R. M. Young, J. L. Gomez-Skarmeta und C. Cuellar (2000). "A novel function for the Xslug gene: control of dorsal mesendoderm development by repressing BMP-4." *Mech Dev* **97**(1-2): 47-56.
- Mellerick, D. M. und M. Nirenberg (1995). "Dorsal-ventral patterning genes restrict NK-2 homeobox gene expression to the ventral half of the central nervous system of *Drosophila* embryos." *Dev Biol* **171**(2): 306-16.
- Misra, S., P. Hecht, R. Maeda und K. V. Anderson (1998). "Positive and negative regulation of Easter, a member of the serine protease family that controls dorsal-ventral patterning in the *Drosophila* embryo." *Development* **125**(7): 1261-7.
- Morales, A. V. und M. A. Nieto (2004). "The Snail Gene Family during Gastrulation." *Gastrulation From cells to embryo Cold Spring Harbour Laboratory Press*: 631-142.
- Morel, V., R. Le Borgne und F. Schweisguth (2003). "Snail is required for Delta endocytosis and Notch-dependent activation of single-minded expression." *Dev Genes Evol* **213**(2): 65-72.
- Morin-Kensicki, E. M. und J. S. Eisen (1997). "Sclerotome development and peripheral nervous system segmentation in embryonic zebrafish." *Development* **124**(1): 159-67.
- Morisato, D. und K. V. Anderson (1994). "The spatzle gene encodes a component of the extracellular signaling pathway establishing the dorsal-ventral pattern of the *Drosophila* embryo." *Cell* **76**(4): 677-88.
- Morize, P., A. E. Christiansen, M. Costa, S. Parks und E. Wieschaus (1998). "Hyperactivation of the folded gastrulation pathway induces specific cell shape changes." *Development* **125**(4): 589-97.
- Moussian, B. und S. Roth (2005). "Dorsoventral axis formation in the *Drosophila* embryo--shaping and transducing a morphogen gradient." *Curr Biol* **15**(21): R887-99.
- Nambu, J. R., J. O. Lewis, K. A. Wharton, Jr. und S. T. Crews (1991). "The *Drosophila* single-minded gene encodes a helix-loop-helix protein that acts as a master regulator of CNS midline development." *Cell* **67**(6): 1157-67.
- Nederbragt, A. J., O. Lespinet, S. van Wageningen, A. E. van Loon, A. Adoutte und W. J. Dictus (2002). "A lophotrochozoan twist gene is expressed in the ectomesoderm of the gastropod mollusk *Patella vulgata*." *Evol Dev* **4**(5): 334-43.
- Nieto, M. A. (2002). "The snail superfamily of zinc-finger transcription factors." *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**(3): 155-66.
- Nunes da Fonseca, R., C. Von Levetzow, P. Kalscheuer, A. Basal, M. van der Zee und S. Roth (2008). "Self-regulatory circuits in dorsoventral axis formation of the short germ beetle *Tribolium castaneum*." *Dev. cell in press*.
- Oda, H., O. Nishimura, Y. Hirao, H. Tarui, K. Agata und Y. Akiyama-Oda (2007). "Progressive activation of Delta-Notch signaling from around the blastopore is required to set up a functional caudal lobe in the spider *Achaearanea tepidariorum*." *Development* **134**(12): 2195-205.
- Oda, H., S. Tsukita und M. Takeichi (1998). "Dynamic behavior of the cadherin-based cell-cell adhesion system during *Drosophila* gastrulation." *Dev Biol* **203**(2): 435-50.

- Pan, D. J., J. D. Huang und A. J. Courey (1991). "Functional analysis of the *Drosophila* twist promoter reveals a dorsal-binding ventral activator region." *Genes Dev* **5**(10): 1892-901.
- Parks, S. und E. Wieschaus (1991). "The *Drosophila* gastrulation gene *concertina* encodes a G alpha-like protein." *Cell* **64**(2): 447-58.
- Patel, N. H., B. G. Condron und K. Zinn (1994). "Pair-rule expression patterns of even-skipped are found in both short- and long-germ beetles." *Nature* **367**(6462): 429-34.
- Postigo, A. A., E. Ward, J. B. Skeath und D. C. Dean (1999). "zfh-1, the *Drosophila* homologue of ZEB, is a transcriptional repressor that regulates somatic myogenesis." *Mol Cell Biol* **19**(10): 7255-63.
- Prud'homme, B., N. Gompel, A. Rokas, V. A. Kassner, T. M. Williams, S. D. Yeh, J. R. True und S. B. Carroll (2006). "Repeated morphological evolution through cis-regulatory changes in a pleiotropic gene." *Nature* **440**(7087): 1050-3.
- Rao, Y., H. Vaessin, L. Y. Jan und Y. N. Jan (1991). "Neuroectoderm in *Drosophila* embryos is dependent on the mesoderm for positioning but not for formation." *Genes Dev* **5**(9): 1577-88.
- Reuter, R. (1994). "The gene *serpent* has homeotic properties and specifies endoderm versus ectoderm within the *Drosophila* gut." *Development* **120**(5): 1123-35.
- Richards et al. (2008). "The genome of the model beetle and pest *Tribolium castaneum*." *Nature*, in press.
- Roth, S. (2003). "The origin of dorsoventral polarity in *Drosophila*." *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **358**(1436): 1317-29; discussion 1329.
- Roth, S. (2004). "Gastrulation in other insects." *Gastrulation From cells to embryo Cold Spring Harbour Laboratory Press*: 105-122.
- Roth, S., Y. Hiromi, D. Godt und C. Nusslein-Volhard (1991). "cactus, a maternal gene required for proper formation of the dorsoventral morphogen gradient in *Drosophila* embryos." *Development* **112**(2): 371-88.
- Roth, S. und T. Schupbach (1994). "The relationship between ovarian and embryonic dorsoventral patterning in *Drosophila*." *Development* **120**(8): 2245-57.
- Roth, S., D. Stein und C. Nusslein-Volhard (1989). "A gradient of nuclear localization of the dorsal protein determines dorsoventral pattern in the *Drosophila* embryo." *Cell* **59**(6): 1189-202.
- Rusch, J. und M. Levine (1994). "Regulation of the dorsal morphogen by the Toll and torso signaling pathways: a receptor tyrosine kinase selectively masks transcriptional repression." *Genes Dev* **8**(11): 1247-57.
- Rushlow, C. und K. Arora (1990). "Dorsal ventral polarity and pattern formation in the *Drosophila* embryo." *Semin Cell Biol* **1**(3): 137-49.
- Rushlow, C. A., K. Han, J. L. Manley und M. Levine (1989). "The graded distribution of the dorsal morphogen is initiated by selective nuclear transport in *Drosophila*." *Cell* **59**(6): 1165-77.
- Sakai, D., T. Suzuki, N. Osumi und Y. Wakamatsu (2006). "Cooperative action of Sox9, Snail2 and PKA signaling in early neural crest development." *Development* **133**(7): 1323-33.
- Sander, K. (1975). "Pattern specification in the insect embryo." *Ciba Found Symp* **0**(29): 241-63.
- Sandmann, T., C. Girardot, M. Brehme, W. Tongprasit, V. Stolc und E. E. Furlong (2007). "A core transcriptional network for early mesoderm development in *Drosophila melanogaster*." *Genes Dev* **21**(4): 436-49.
- Savagner, P., D. F. Kusewitt, E. A. Carver, F. Magnino, C. Choi, T. Gridley und L. G. Hudson (2005). "Developmental transcription factor slug is required for effective re-epithelialization by adult keratinocytes." *J Cell Physiol* **202**(3): 858-66.

- Savard, J., D. Tautz und M. J. Lercher (2006). "Genome-wide acceleration of protein evolution in flies (Diptera)." *BMC Evol Biol* **6**: 7.
- Savard, J., D. Tautz, S. Richards, G. M. Weinstock, R. A. Gibbs, J. H. Werren, H. Tettelin und M. J. Lercher (2006). "Phylogenomic analysis reveals bees and wasps (Hymenoptera) at the base of the radiation of Holometabolous insects." *Genome Res* **16**(11): 1334-8.
- Schroder, R. (2006). "vasa mRNA accumulates at the posterior pole during blastoderm formation in the flour beetle *Tribolium castaneum*." *Dev Genes Evol* **216**(5): 277-83.
- Seher, T. (2004). *Untersuchungen zur genetischen Kontrolle der Gastrulation von Drosophila melanogaster. Universität zu Köln. Inaugural-Dissertation.*
- Seher, T. C. und M. Leptin (2000). "Tribbles, a cell-cycle brake that coordinates proliferation and morphogenesis during *Drosophila* gastrulation." *Curr Biol* **10**(11): 623-9.
- Seher, T. C., M. Narasimha, E. Vogelsang und M. Leptin (2007). "Analysis and reconstitution of the genetic cascade controlling early mesoderm morphogenesis in the *Drosophila* embryo." *Mech Dev* **124**(3): 167-79.
- Shilo, B. Z. (2003). "Signaling by the *Drosophila* epidermal growth factor receptor pathway during development." *Exp Cell Res* **284**(1): 140-9.
- Shishido, E., N. Ono, T. Kojima und K. Saigo (1997). "Requirements of DFR1/Heartless, a mesoderm-specific *Drosophila* FGF-receptor, for the formation of heart, visceral and somatic muscles, and ensheathing of longitudinal axon tracts in CNS." *Development* **124**(11): 2119-28.
- Simpson, P. (1983). "Maternal-Zygotic Gene Interactions during Formation of the Dorsoventral Pattern in *Drosophila* Embryos." *Genetics* **105**(3): 615-632.
- Skeath, J. B. (1998). "The *Drosophila* EGF receptor controls the formation and specification of neuroblasts along the dorsal-ventral axis of the *Drosophila* embryo." *Development* **125**(17): 3301-12.
- Skeath, J. B., G. F. Panganiban und S. B. Carroll (1994). "The ventral nervous system defective gene controls proneural gene expression at two distinct steps during neuroblast formation in *Drosophila*." *Development* **120**(6): 1517-24.
- Sokol, N. S. und V. Ambros (2005). "Mesodermally expressed *Drosophila* microRNA-1 is regulated by Twist and is required in muscles during larval growth." *Genes Dev* **19**(19): 2343-54.
- Sommer, R. J. und D. Tautz (1993). "Involvement of an orthologue of the *Drosophila* pair-rule gene hairy in segment formation of the short germ-band embryo of *Tribolium* (Coleoptera)." *Nature* **361**(6411): 448-50.
- Sommer, R. J. und D. Tautz (1994). "Expression patterns of twist and snail in *Tribolium* (Coleoptera) suggest a homologous formation of mesoderm in long and short germ band insects." *Dev Genet* **15**(1): 32-7.
- Sosic, D., J. A. Richardson, K. Yu, D. M. Ornitz und E. N. Olson (2003). "Twist regulates cytokine gene expression through a negative feedback loop that represses NF-kappaB activity." *Cell* **112**(2): 169-80.
- Soto, J. G., B. H. Nelson und D. A. Weisblat (1997). "A leech homolog of twist: evidence for its inheritance as a maternal mRNA." *Gene* **199**(1-2): 31-7.
- Spemann, H. (1938). "Embryonic development and induction." *Yale University Press, New Haven.*
- Spring, J., N. Yanze, C. Josch, A. M. Middel, B. Winninger und V. Schmid (2002). "Conservation of Brachyury, Mef2, and Snail in the myogenic lineage of jellyfish: a connection to the mesoderm of bilateria." *Dev Biol* **244**(2): 372-84.
- Srinivasan, S., K. E. Rashka und E. Bier (2002). "Creation of a Sog morphogen gradient in the *Drosophila* embryo." *Dev Cell* **2**(1): 91-101.
- Stathopoulos, A. und M. Levine (2002). "Dorsal gradient networks in the *Drosophila* embryo." *Dev Biol* **246**(1): 57-67.

- Stathopoulos, A., B. Tam, M. Ronshaugen, M. Frasch und M. Levine (2004). "pyramus and thisbe: FGF genes that pattern the mesoderm of *Drosophila* embryos." *Genes Dev* **18**(6): 687-99.
- Stathopoulos, A., M. Van Drenth, A. Erives, M. Markstein und M. Levine (2002). "Whole-genome analysis of dorsal-ventral patterning in the *Drosophila* embryo." *Cell* **111**(5): 687-701.
- Stein, D., S. Roth, E. Vogelsang und C. Nusslein-Volhard (1991). "The polarity of the dorsoventral axis in the *Drosophila* embryo is defined by an extracellular signal." *Cell* **65**(5): 725-35.
- Steward, R. (1989). "Relocalization of the dorsal protein from the cytoplasm to the nucleus correlates with its function." *Cell* **59**(6): 1179-88.
- Sturtevant, M. A., M. Roark und E. Bier (1993). "The *Drosophila* rhomboid gene mediates the localized formation of wing veins and interacts genetically with components of the EGF-R signaling pathway." *Genes Dev* **7**(6): 961-73.
- Sweeton, D., S. Parks, M. Costa und E. Wieschaus (1991). "Gastrulation in *Drosophila*: the formation of the ventral furrow and posterior midgut invaginations." *Development* **112**(3): 775-89.
- Tapanes-Castillo, A. und M. K. Baylies (2004). "Notch signaling patterns *Drosophila* mesodermal segments by regulating the bHLH transcription factor twist." *Development* **131**(10): 2359-72.
- Tautz, D. (2000). "Evolution of transcriptional regulation." *Curr Opin Genet Dev* **10**(5): 575-9.
- Tautz, D. (2002). "Insects on the rise." *Trends Genet* **18**(4): 179-80.
- Tavares, A. T., J. C. Izpisua-Belmonte und J. Rodriguez-Leon (2001). "Developmental expression of chick twist and its regulation during limb patterning." *Int J Dev Biol* **45**(5-6): 707-13.
- Thisse, B., M. el Messal und F. Perrin-Schmitt (1987). "The twist gene: isolation of a *Drosophila* zygotic gene necessary for the establishment of dorsoventral pattern." *Nucleic Acids Res* **15**(8): 3439-53.
- Thisse, C., B. Thisse und J. H. Postlethwait (1995). "Expression of snail2, a second member of the zebrafish snail family, in cephalic mesendoderm and presumptive neural crest of wild-type and spadetail mutant embryos." *Dev Biol* **172**(1): 86-99.
- Tsruya, R., A. Wojtalla, S. Carmon, S. Yogev, A. Reich, E. Bibi, G. Merdes, E. Schejter und B. Z. Shilo (2007). "Rhomboid cleaves Star to regulate the levels of secreted Spitz." *Embo J* **26**(5): 1211-20.
- van der Zee, M. (2006). Case studies on the genes *zerknüllt*, *decapentaplegic* and *short gastrulation* in the beetle *Tribolium* illustrate concepts in evolutionary developmental biology. *Universität zu Köln, Inaugural-Dissertation*.
- van der Zee, M., N. Berns und S. Roth (2005). "Distinct functions of the *Tribolium* *zerknüllt* genes in serosa specification and dorsal closure." *Curr Biol* **15**(7): 624-36.
- van der Zee, M., O. Stockhammer, C. von Levetzow, R. Nunes da Fonseca und S. Roth (2006). "Sog/Chordin is required for ventral-to-dorsal Dpp/BMP transport and head formation in a short germ insect." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(44): 16307-12.
- Vega, S., A. V. Morales, O. H. Ocana, F. Valdes, I. Fabregat und M. A. Nieto (2004). "Snail blocks the cell cycle and confers resistance to cell death." *Genes Dev* **18**(10): 1131-43.
- von Ohlen, T. und C. Q. Doe (2000). "Convergence of dorsal, *dpp*, and *egfr* signaling pathways subdivides the *drosophila* neuroectoderm into three dorsal-ventral columns." *Dev Biol* **224**(2): 362-72.

- Wang, S. M., V. W. Coljee, R. J. Pignolo, M. O. Rotenberg, V. J. Cristofalo und F. Sierra (1997). "Cloning of the human twist gene: its expression is retained in adult mesodermally-derived tissues." *Gene* **187**(1): 83-92.
- Wheeler, S. R., M. L. Carrico, B. A. Wilson, S. J. Brown und J. B. Skeath (2003). "The expression and function of the achaete-scute genes in *Tribolium castaneum* reveals conservation and variation in neural pattern formation and cell fate specification." *Development* **130**(18): 4373-81.
- Wheeler, S. R., M. L. Carrico, B. A. Wilson und J. B. Skeath (2005). "The *Tribolium* columnar genes reveal conservation and plasticity in neural precursor patterning along the embryonic dorsal-ventral axis." *Dev Biol* **279**(2): 491-500.
- Wilkie, A. O. und G. M. Morriss-Kay (2001). "Genetics of craniofacial development and malformation." *Nat Rev Genet* **2**(6): 458-68.
- Wolf, C., C. Thisse, C. Stoetzel, B. Thisse, P. Gerlinger und F. Perrin-Schmitt (1991). "The *M-twist* gene of *Mus* is expressed in subsets of mesodermal cells and is closely related to the *Xenopus X-twi* and the *Drosophila twist* genes." *Dev Biol* **143**(2): 363-73.
- Yamazaki, K., Y. Akiyama-Oda und H. Oda (2005). "Expression patterns of a twist-related gene in embryos of the spider *Achaearanea tepidariorum* reveal divergent aspects of mesoderm development in the fly and spider." *Zoolog Sci* **22**(2): 177-85.
- Yang, J., S. A. Mani, J. L. Donaher, S. Ramaswamy, R. A. Itzykson, C. Come, P. Savagner, I. Gitelman, A. Richardson und R. A. Weinberg (2004). "Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis." *Cell* **117**(7): 927-39.
- Yasui, K., S. C. Zhang, M. Uemura, S. Aizawa und T. Ueki (1998). "Expression of a twist-related gene, *Bbtwist*, during the development of a lancelet species and its relation to cephalochordate anterior structures." *Dev Biol* **195**(1): 49-59.
- Yin, Z., X. L. Xu und M. Frasch (1997). "Regulation of the twist target gene *tinman* by modular cis-regulatory elements during early mesoderm development." *Development* **124**(24): 4971-82.
- Zeitlinger, J., R. P. Zinzen, A. Stark, M. Kellis, H. Zhang, R. A. Young und M. Levine (2007). "Whole-genome ChIP-chip analysis of *Dorsal*, *Twist*, and *Snail* suggests integration of diverse patterning processes in the *Drosophila* embryo." *Genes Dev* **21**(4): 385-90.
- Zhang, C., T. F. Carl, E. D. Trudeau, T. Simmet und M. W. Klymkowsky (2006). "An NF-kappaB and slug regulatory loop active in early vertebrate mesoderm." *PLoS ONE* **1**: e106.
- Zhao, G. und J. B. Skeath (2002). "The Sox-domain containing gene *Dichaete/fish-hook* acts in concert with *vnd* and *ind* to regulate cell fate in the *Drosophila* neuroectoderm." *Development* **129**(5): 1165-74.
- Zhao, G., S. R. Wheeler und J. B. Skeath (2007). "Genetic control of dorsoventral patterning and neuroblast specification in the *Drosophila* Central Nervous System." *Int J Dev Biol* **51**(2): 107-15.
- Zinzen, R. P., J. Cande, M. Ronshaugen, D. Papatsenko und M. Levine (2006). "Evolution of the ventral midline in insect embryos." *Dev Cell* **11**(6): 895-902.

7. Allgemeine Abkürzungen

Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
AP	anteriorposterior
bp	Basenpaare
cDNA	komplementäre DNA
DIG	Digoxigenein
<i>Dm</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DV	dorsoventral
E.coli	Escherichia coli
EtOH	Ethanol
kb	Kilobasenpaare
mRNA	Boten-RNA
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PNS	Peripheres Nervensystem
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA Interferenz
RT	Raumtemperatur
SSC	<i>standard saline citrat</i> Puffer
<i>Tc</i>	<i>Tribolium castaneum</i>
TBE	TRIS/Borat/EDTA-Puffer
TE	TRIS/EDTA-Puffer
TF	Transkriptionsfaktor
Wt	Wildtyp
g	Gramm
h	Stunde
min	Minute
ml	Milliliter (10^{-3} Liter)
μ l	Mikroliter (10^{-6} Liter)
ZNS	Zentralnervensystem

Danksagung

Prof. Dr. Siegfried Roth danke ich für seine Diskussionsbereitschaft und die Möglichkeit an diesem interessanten Projekt zu arbeiten.

Prof. Dr. Maria Leptin danke ich herzlich für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Besonders möchte ich mich bei Siegfried Roth sowie der „International Graduate School for Genetics and Functional Genomics“ der Universität zu Köln dafür bedanken, dass mir ermöglicht wurde die Doktorarbeit mit meinem Sohn zu vereinbaren.

Vielen Dank an meine Laborkollegen: Rodrigo, der immer hilfsbereit und motivierend ist. Danke für das Lesen meiner Arbeit und die Hilfe beim „distance-tree“!

Axel und Jeremy für ihre große Hilfsbereitschaft und die freundschaftliche Atmosphäre in unserem „Käfer-Labor“. Dabei sind natürlich meine „alten“ Kollegen Maurijn, Patrick und Abi nicht zu vergessen. Besonderer Dank geht an meine Korrekturleser: Claudia, Patrick und Olli!

Claudia bin ich dankbar für ihre Hilfe bei der Problemlösung am Konfokalmikroskop.

Allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Roth danke ich für die schöne Zeit.

Meinen Eltern danke ich für ihre Unterstützung und ihr Vertrauen.

Gregor danke ich für die gemeinsame Bewältigung schwieriger Zeiten während unserer Doktorarbeiten und Max dafür, dass er bei uns ist und unser Leben so unglaublich bereichert.

Erklärung

Ich versichere hiermit, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbstständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit - einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen -, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; dass diese Dissertation keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; dass sie - abgesehen von unten angegebenen Teilpublikationen noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, dass ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluss des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde.

Die Bestimmungen dieser Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Herrn Prof. Dr. Siegfried Roth betreut worden.

Teilpublikationen:

van der Zee, M., O. Stockhammer, C. von Levetzow, R. Nunes da Fonseca und S. Roth (2006). "Sog/Chordin is required for ventral-to-dorsal Dpp/BMP transport and head formation in a short germ insect." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(44): 16307-12.

Nunes da Fonseca, R., C. Von Levetzow, P. Kalscheuer, A. Basal, M. van der Zee und S. Roth (2008) "Self-regulatory circuits in dorsoventral axis formation of the short germ beetle *Tribolium castaneum*." Dev. cell **in press**.

Ich versichere, dass ich alle Angaben nach bestem Wissen und Gewissen gemacht habe und verpflichtet mich jedmögliche, die obigen Angaben betreffende Veränderung, dem Dekanat unverzüglich mitzuteilen.

Köln, den 18. März 2008

Cornelia von Levetzow

Lebenslauf

Cornelia von Levetzow, geb. Mikulski	Staatsangehörigkeit: deutsch Familienstand: verheiratet, ein Kind
25.05.1977	Geboren in Lauhhammer, Brandenburg Eltern: Hubertus Mikulski und Angelika Mikulski, geb. Wohllebe
1983-1985	Besuch der Erich-Weinert Schule Lauhhammer-Ost
1985-1989	Besuch der Russischklasse der Erich-Weinert-Oberschule Lauhhammer-Mitte
1989-1990	Besuch des Gymnasiums Nettetal
1990-1997	Besuch des städt. Gymnasiums Olpe
1997-2003	Studium der Biologie an der Albertus-Magnus Universität zu Köln
September 2000	Vordiplom
2001	Dreimonatiges Praktikum im „Centre for Cellular and Molecular Biology“ der Deakin University Melbourne, Australien bei Herrn Prof. Dr. Peter Beech
November 2002	Abschluss der mündlichen Diplomprüfungen Prüfungsfächer: Genetik, Entwicklungsbiologie, Biochemie
Januar-November 2003	Diplomarbeit bei Herrn Prof. Dr. Siegfried Roth am Institut für Entwicklungsbiologie der Universität zu Köln Titel: „Funktionelle Analysen zygotischer dorsoventral Gene bei <i>Tribolium</i> “
Seit Januar 2004	Promotionsstudium in der „International Graduate School for Genetics and Functional Genomics“ der Universität zu Köln Doktorarbeit bei Herrn Prof. Dr. Siegfried Roth am Institut für Entwicklungsbiologie der Universität zu Köln
Köln, den 18.03.2008	Cornelia von Levetzow

