

**Analyse der *cis*- regulatorischen Region
des Gens *hairy*
aus
*Tribolium castaneum***

Inaugural- Dissertation

zur
Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität zu Köln

vorgelegt von
Christoph Eckert
aus München

2003

1. Gutachter: Prof. Dr. Diethard Tautz

2. Gutachter: Prof. Dr. Siegfried Roth

Tag der mündlichen Prüfung: 3.11.2003

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. Diethard Tautz angefertigt .

Ich möchte mich ganz besonders bei Prof. Dr. Diethard Tautz für seine Unterstützung, sein Verständnis und seine Betreuung bedanken. Dank gilt auch Prof. Dr. Martin Klingler für viele Diskussion und hilfreiche Unterstützung. Bedanken möchte ich mich auch bei Siegfried Roth für die Durchsicht der Arbeit und für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Bedanken möchte ich mich auch bei allen Mitgliedern der Arbeitsgruppen Tautz und Klingler für die angenehme Zusammenarbeit und viele Diskussionen. Besonders hervorheben möchte ich Dr. Christian Wolff, für Hilfe bei der Planung von Experimenten, gewährte Gastfreundschaft und viele Diskussionen. Ich bedanke mich bei Andreas Berghammer, Gregor Bucher, Johannes Scholten, Markus Weber, Hilde Wolfrum, Alex Cerny, Dr. Wim Damen, Manuel Aranda, Niko Prpic, Florian Maderspacher und Dr. Reinhard Schröder für viele Diskussionen und die angenehme Zusammenarbeit.

Ich schulde Gabi Büttner, Barbara Wigand und Traudl Feldmaier-Fuchs Dank für technische Assistenz und Hilfe bei der Fliegenarbeit, Brigitte Pichler, Friederike Siegel, Sandra Gottschaller und Claudia Wehner für die Unterstützung bei der Käferarbeit.

Eva Siegmund danke ich für Hilfe bei organisatorischen Problemen.

Für die kritische Durchsicht des Manuskripts danke ich Andreas Berghammer, Gregor Bucher, Johannes Scholten, Markus Weber und Prof. Dr. Diethard Tautz, John Banes für das Lesen der englischsprachigen Zusammenfassung.

Mein größter Dank gilt Pia Schwarz und meinen Eltern.

1. Zusammenfassung

Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist die Regulation des Paarregelsgens *hairy* von *Tribolium castaneum* (*Tc'h*). Dazu wurde die *cis*- regulatorische Region von *Tc'h* analysiert und mit *hairy* aus *Drosophila melanogaster* (*Dm'h*) verglichen.

Mit Hilfe des *piggyBac*- Transposons wurde der Mehlkäfer *T. castaneum* mit Reporterkonstrukten transformiert. Es konnte gezeigt werden, dass ein Fragment von 8,8 kb der 5'- flankierenden Region von *Tc'h* ausreichen, um ein Reportergen in doppelsegmentalen Streifen zu exprimieren.

Anschließend wurden Käfer mit einer Reihe von Konstrukten transformiert, die *lacZ* unter der Kontrolle verschieden großer regulatorischer Regionen von *Tc'h* exprimieren. Durch Analyse der Expressionsmuster konnte der Promotor in zwei Bereiche eingeteilt werden: Eine knapp 4 kb große Region, die für die Streifen eins, zwei, sechs, sieben und acht verantwortlich ist und eine 1,1 kb große Region, welche die Expression der Streifen drei, vier und fünf reguliert.

Um weitere Erkenntnisse über die Regulation von *Tc'h* zu gewinnen, wurde *D. melanogaster* mit denselben Reporterkonstrukten transformiert. Dabei vermitteln unterschiedlich große Regionen die Expression von *lacZ* in der Mitte des Embryos in jeweils drei Streifen. Diese drei Streifen ähneln weitgehend den Streifen drei, vier und fünf von *Dm'h*. Auch die 8,8 kb große Region, die in *T. castaneum* die Expression aller Streifen von *Tc'h* reguliert, generiert in *D. melanogaster* nur drei Streifen. Dies liegt daran, dass die Regulation der anterioren und der posterioren Streifen in *D. melanogaster* und *T. castaneum*, im Gegensatz zu den drei zentralen Streifen, unterschiedlich ist.

Um die Annahme abzusichern, dass die Regulation der Streifen drei, vier und fünf von *Dm'h* und *Tc'h* konserviert ist, wurde eine Linie mit Reporterkonstrukt in die *Drosophila*- Segmentierungsmutanten *even-skipped*, *runt*, *giant*, *hunchback*, *Krüppel* und *knirps* eingekreuzt. Diese Hypothese wurde durch die Analyse des Expressionsmusters des Reportergens in den verschiedenen genetischen Hintergründen unterstützt.

Ein Sequenzvergleich ergab, dass sich knapp 60 bp der nicht- codierenden Sequenz von *Tc'h* und ein Abschnitt im Homeobox- Komplex von *T. castaneum* stark ähneln. Dies kann als Hinweis auf ein konserviertes regulatorisches Element gedeutet werden. Zusammen mit der Firma Genomatix wurden die regulatorischen Sequenzen von *Dm'h*, *hairy* aus *Drosophila virilis* (*Dv'h*) und *Tc'h* miteinander verglichen. Dabei wurden die 5'- flankierenden Sequenzen nach Bindungsstellen von den Transkriptionsfaktoren *hunchback*, *Krüppel*, *knirps*, *caudal* und *tailless*, welche an der Regulation von *Dm'h* beteiligt sind, durchsucht. Ähnlichkeiten in der Verteilung der Bindungsstellen ergaben sich für einen Bereich, der in *Drosophila* die Expression des Streifen fünf steuert. Der korrespondierende Bereich bei *Tc'h* liegt in derselben Region, die in Versuchen als regulatorische Region der Streifen drei, vier und fünf identifiziert wurde.

In einem weiteren Ansatz wurde versucht, mit den 5'- flankierenden Sequenzen von *Dm'h*, *Dv'h* und *Tc'h* eine Regulationseinheit zu identifizieren, welche an der Expression der Streifen drei und vier aller drei Gene maßgeblich beteiligt ist. Diese Voraussage wurde experimentell getestet und konnte widerlegt werden.

2. Abstract

I analyzed the regulation of the orthologue of the pair-rule gene *hairy* from the flour beetle *Tribolium castaneum*.

By *piggyBac* mediated germ line transformation, I was able to show that a 8.8 kb region of *Tribolium hairy* (*Tc h*) is sufficient to drive *lacZ* expression in a pattern that mimics the expression of *Tc h* in every other segment, but not along the midline. By transforming beetles with different deletion constructs, two discrete enhancer elements were identified that regulate expression of stripes 1,2,6,7,8 and stripes 3 to 5, respectively.

Flies were transformed with the same constructs. None of these induced expression in more than 3 stripes. The pattern of these stripes is very similar to stripes 3,4 and 5 of *Drosophila hairy* (*Dm h*). I conclude that regulation of stripe 3, 4 and 5 of *Dm h* and *Tc h* is conserved, whereas the other stripes are regulated in a different manner. This view is supported by crossing one of the different constructs into various mutant backgrounds of *D. melanogaster*.

In silico analysis of *Tc h* upstream region, done partially in collaboration with Genomatix, provided additional cues for functional conserved elements. One of these elements was tested, but did not display the predicted function. The others remain to be verified by further experimental procedures.

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung	1
2. Abstract.....	3
3. Einleitung.....	6
4. Ergebnisse.....	19
4.1 Aktivität der regulatorischen Region von <i>Tc'h</i> in <i>T. castaneum</i>	19
4.2 Aktivität der regulatorischen Region von <i>Tc'h</i> in <i>D. melanogaster</i>	28
4.3 Expression von <i>Tc'h</i> -XhoI/NcoI8.8 in Segmentierungsmutanten von <i>D.</i> <i>melanogaster</i>	36
4.4 Die Expression eines Reportergens unter der Kontrolle der regulatorischen Region von <i>Dm'h</i> in <i>T. castaneum</i>	41
4.5 Die Expression eines Reportergens unter der Kontrolle der regulatorischen Region von <i>her1</i> in <i>T. castaneum</i>	42
4.6 <i>In silico</i> Analyse der regulatorischen Region von <i>Tc'h</i>	43
5. Diskussion	51
6. Material und Methoden.....	64
6.1 Molekularbiologische Methoden.....	64
6.2 Genetische und embryologische Methoden	70
7. Literatur	74
8. Lebenslauf.....	81

Abkürzungen

A	Adenin
Abb.	Abbildung
bzw.	beziehungsweise
bp	Basenpaar
°C	Grad Celsius
C	Cytosin
EL	Eilänge
G	Guanin
h	Stunde
kb	1000 Basenpaare
Mb	1 Million Basenpaare
min	Minute
mM	Millimolar
mRNA	Boten-RNA
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
RNAi	RNA-vermittelte Interferenz
s	Sekunden
T	Thymin
UTR	untranslated region, nicht- codierende Bereiche der mRNA
WT	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel

3. Einleitung

Wie funktioniert Musterbildung in Embryonen, wenn aus einer befruchteten Keimzelle ein mehrzelliger Organismus geformt wird? Dies ist eine zentrale Frage der Entwicklungsbiologie. Dabei interessieren vor allem die frühen Ereignisse zu Beginn der Entwicklung und insbesondere die Einteilung des Embryos in ontogenetische Einheiten. Wie entsteht dieses Muster und welche Faktoren sind daran beteiligt? Dank neuer genetischer und molekularbiologischer Methoden konnten in den letzten Jahrzehnten wichtige Erkenntnisse gewonnen werden, die zum Verständnis der Musterbildung während der Embryonalentwicklung und der Organogenese beitragen. Dabei haben sich die Entwicklungsbiologen auf ein überschaubare Anzahl an Modellorganismen konzentriert. So wurde der Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* als Modellorganismus innerhalb Nematoden etabliert. Er dient als Beispiel für die Entwicklung eines Organismus mit exakt definierten Zelllinien. Zebrafisch, der afrikanische Krallenfrosch *Xenopus*, Huhn und Maus sind Vertebratenmodelle. Innerhalb der Insekten ist die Taufliege *Drosophila* der bevorzugte Modellorganismus. Bei der Wahl von *Drosophila* spielten die kurze Generationszeit, die leichte Haltung, die polytären Riesenchromosomen und die oft einfache Identifikation von mutanten Phänotypen eine Rolle.

Ein gut untersuchtes Beispiel der Musterbildung ist die Segmentierung in *Drosophila*. In Experimenten wurden chemisch Mutationen induziert. Anschließend wurden die Phänotypen und die entsprechenden Gene einer genaueren Untersuchung unterzogen. So konnte ein Großteil der an der embryonalen Musterbildung beteiligten Gene identifiziert, in verschiedene Klassen eingeteilt und daraus ein Modell für die Embryonalentwicklung erstellt werden (Nüsslein-Volhard und Wieschaus, 1980). Für diese Arbeit erhielten Christiane Nüsslein-Volhard und Eric Wieschaus zusammen mit Ed Lewis 1995 den Nobelpreis für Medizin und Physiologie.

Segmentierung in *Drosophila melanogaster*

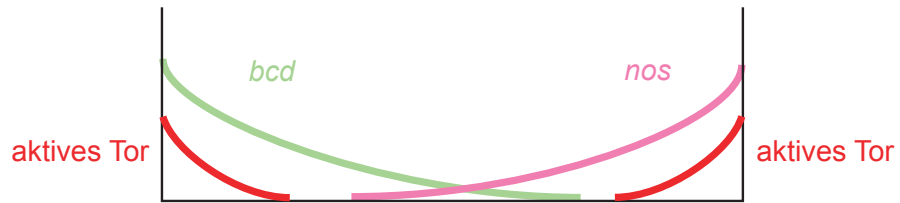
Die maternalen Determinanten stehen an der Spitze der so genannten Segmentierungskaskade in *Drosophila*. Die Kaskade besteht aus den maternalen Genen, den Gapgenen, den Paarregelgenen und den Segmentpolaritätsgenen (siehe auch Abb. 1-1).

In *Drosophila* sind verschiedene maternale Systeme an der Musterbildung beteiligt. Die Informationen dieser Systeme werden bereits in der Oozyte bereitgestellt. Entlang der antero-posterioren Achse gibt es drei verschiedene Systeme: Ein anteriores, ein posteriores und ein terminales System. Eine Schlüsselrolle im anterioren System spielt das Homeobox-Gen *bicoid* (*bcd*). Im Zytoplasma der Oozyte wird die mRNA von *bcd* mit Hilfe der Mikrotubuli an den anterioren Pol transportiert und dort verankert. Nach der Befruchtung, wird die mRNA translatiert. Das Protein diffundiert innerhalb des syncytialen Blastoderms und bildet einen Gradienten aus (St Johnston und Nüsslein-Volhard, 1992). Das Bcd- Protein aktiviert die Transkription von Zielgenen durch Bindung an deren Promotoren. Dabei wirkt Bcd als Morphogen: Schwache Konzentrationen von Bcd aktivieren andere nachgeschaltete Gene als hohe Konzentrationen. So wird zum Beispiel *hunchback* (*hb*) bereits durch niedrige Konzentrationen von Bcd aktiviert (Driever et al., 1989), während das im Kopf exprimierte Gen *orthodenticle* (*otd*) nur bei höheren Konzentrationen transkribiert wird (Gao und Finkelstein, 1998). Zu den Zielgenen gehören die Kopfgene *otd*, *empty spiracle*, *buttonhead* und die Gapgene *hb*, *Krüppel* (*Kr*), *knirps* (*kni*) und *giant* (*gt*) (Bate und Martinez Arias, 1993).

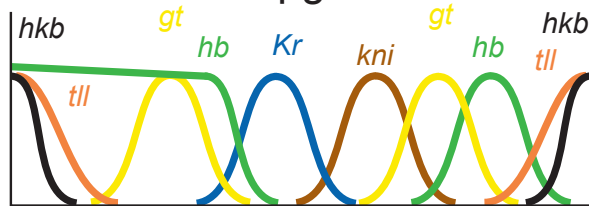
Eine wichtige Rolle im posterioren System hat *nanos* (*nos*). Die mRNA von *nos* wird am posterioren Pol der Oozyte deponiert und nach der Befruchtung translatiert. Das Protein bildet einen nach anterior abnehmenden Gradienten aus. Zusammen mit Pumilio bindet Nos an maternale *hb* mRNA und verhindert deren Translation. Das posterior exprimierte Gapgen *kni* und die posterior exprimierte Domäne von *gt* können somit gebildet werden, da sonst das Zinkfingerprotein Hb deren Transkription verhindern würde (Pankratz und Jäckle, 1993; Rivera-Pomar und Jäckle, 1996; St Johnston und Nüsslein-Volhard, 1992).

Im terminalen System besitzt das Gen *torso* (*tor*) eine zentrale Aufgabe. Diese Rezeptor- Tyrosin- Kinase ist nicht nur auf die terminalen Bereiche der Zygote beschränkt, sondern auf der gesamten Eioberfläche verteilt. Aktiviert wird Tor an den

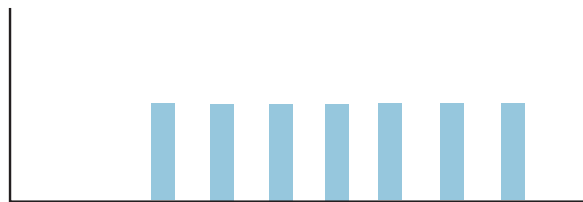
maternale Determinanten



Gapgene



Paarregelgene



Segmentpolaritätsgene

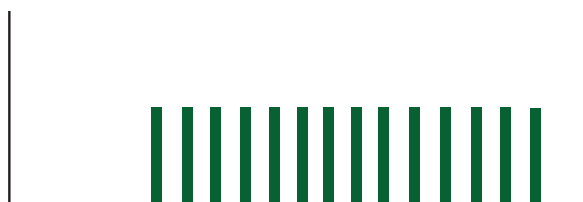


Abb. 1-1 Schematische Darstellung der Segmentierungskaskade in *Drosophila*.

beiden Polen von einem extrazellulären Liganden, wahrscheinlich dem c-terminalen Abschnitt des Proteins Trunk (Casali und Casanova, 2001). Der aktivierte Rezeptor leitet das Signal über eine Signaltransduktionskaskade weiter und bewirkt die Expression der terminalen Gapgene *huckebein (hkb)* und *tailless (tll)* (Greenwood und Struhl, 1997; Pankratz und Jäckle, 1993).

Gapgene

An nächster Stelle in der Segmentierungskaskade stehen die Gapgene. Sie werden zygotisch exprimiert. Alle Gapgene codieren Proteine, die zur Klasse der Transkriptionsfaktoren gehören. Fällt ein Gapgen aus, sind mehrere zusammenhängende Segmente betroffen. So fehlen im Falle von *Kr* die thorakalen und die vorderen abdominalen Segmente und bei *kni* größere Bereiche des Abdomens (Pankratz und Jäckle, 1993). Die Expressionsdomänen der Gapgene korrelieren mit den Ausfallregionen der jeweiligen Mutanten.

Die Regulation der zentralen Gapgene, *gt*, *hb*, *Kr* und *kni* hängt hauptsächlich von den maternalen Genen *hb* und *bcd* ab. Zum Beispiel wird die zygotische Expression von *hb* in erster Linie von Bcd und maternalem Hb reguliert. Neben der Regulation durch die maternalen Gene, interagieren die Gapgene auch untereinander. So wird *Kr* von Bcd und maternalem Hb aktiviert und von den angrenzend exprimierten Gapgenen reprimiert. Die ektopische Expression der Gapgene *kni* und *gt* in der *Kr*-exprimierenden Domäne führt zu einer Reduzierung von *Kr* (Rivera-Pomar und Jäckle, 1996).

Paarregelgene

Die Gapgene regulieren zusammen mit den maternalen Genen die Expression der primären Paarregelgene, zu denen *even-skipped (eve)*, *runt (run)* und *hairy (Dm^h)* gehören. Die Paarregelgene werden in einem doppelsegmentalen Muster in sieben Streifen exprimiert. Das bedeutet, dass ein Paarregelgen in jedem zweiten Segment exprimiert wird. Dies kennzeichnet den Übergang vom aperiodischen Muster der

Gapgene zu einem periodischen Muster entlang der antero-posterioren Achse. In Paarregelgen- Mutanten fällt jedes zweite Segment aus (Nüsslein-Volhard und Wieschaus, 1980).

Die Promotoren von *eve* und *Dm^h* zeigen einen modularen Aufbau. Das bedeutet, dass für einzelne Streifen *cis*- regulatorische Regionen identifiziert werden konnten, welche die Informationen verarbeiten können, die für die zeitlich und räumlich richtige Expression notwendig sind. So wurden Mutanten von *Dm^h* untersucht, bei denen nur einzelne Expressionsbereiche von Störungen betroffen sind. Diese Mutationen konnten regulatorischen Regionen zugeordnet werden (Howard et al., 1988). In den betreffenden Bereichen wurde *Dm^h* nicht exprimiert. Eine erste grobe Kartierung der verschiedenen Elemente wurde vorgenommen (Hooper et al., 1989; Howard et al., 1988). So kann ein streifenspezifisches Element ein Reporter gen mit basalem Promotor in der gleichen Domäne wie das endogene Paarregelgen exprimieren (Abb. 1-2). Die Regulation einzelner streifenspezifischer Elemente wurde genauer analysiert. Es wurde untersucht, welche Transkriptionsfaktoren an die Promotorelemente binden können und welchen Einfluss diese Transkriptionsfaktoren auf die Expression haben.

Ein gut untersuchtes Beispiel ist der Enhancer für den sechsten Streifen von *Dm^h*: *Gt*, in dessen Domäne der Streifen sechs liegt, hat keinen Einfluss auf dessen Bildung (Langeland et al., 1994). Ohne maternales Caudal (*cad*), einem allgemein aktivierenden Transkriptionsfaktor mit Homeobox, dessen Translation von Bcd im anterioren Bereich des Embryos verhindert wird (Rivera-Pomar et al., 1995), ist dieser Streifen stark reduziert und nicht mehr eindeutig von den Streifen fünf und sieben trennbar (Hader et al., 1998). Zwischen dem streifenspezifischen Element von Streifen sechs und *Kni* wurde durch Immunoprecipitation (Pankratz et al., 1990) und DNaseI- Footprinting (Langeland et al., 1994) eine direkte Interaktion gezeigt. Dabei scheint *kni* an der Bildung des Streifens beteiligt zu sein, da in *kni*⁻ Mutanten der Streifen verspätet erscheint (Hader et al., 1998). *Kr* ist maßgeblich an der Positionierung der anterioren Grenze beteiligt. Diese ist in *Kr*⁻ Embryonen nach anterior verschoben. Durch DNaseI- Footprinting wurde gezeigt, dass *Kr* *in vitro* an die regulatorische Region bindet (Langeland et al., 1994). Nach posterior ist der Streifen in *hb*⁻ (Langeland et al., 1994) und in *tll*⁻ Mutanten (Pankratz et al., 1990; Riddihough und Ish-Horowicz, 1991) verbreitert. Durch diese Versuche wird deutlich,

hairy in *Drosophila melanogaster*

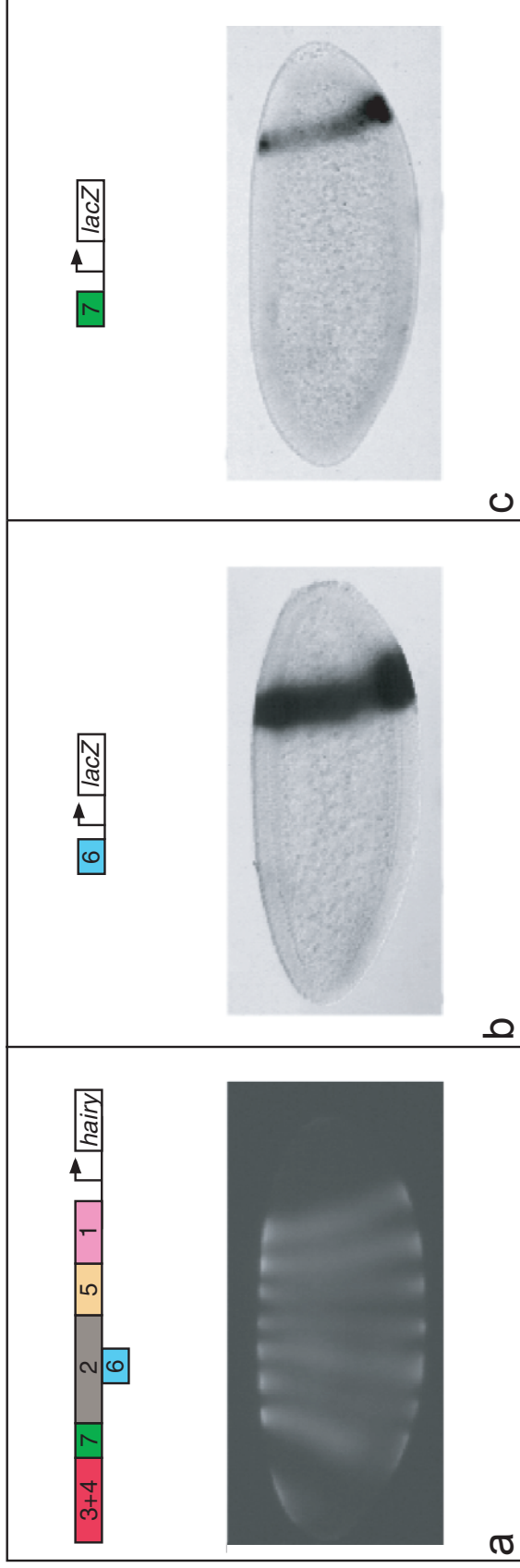


Abb. 1-2 **a** Übersicht über die Organisation des Promotors von *Dm'h*, Lage der *cis*-regulatorischen Regionen der verschiedenen Streifen und Färbung der *Dm'h* mRNA mit fluoreszierendem sekundärem Antikörper. Das heißt, die hellen Regionen zeigen die gefärbten Bereiche. **b** schematische Zeichnung des Reporterkonstrukts mit spezifischen Element für den 6. Streifen von *Dm'h* und Färbung der *lacZ* mRNA unter der Kontrolle jener Region **c** Färbung von *lacZ* mRNA unter der Kontrolle des spezifische Elements für den siebten Streifen von *Dm'h* und graphische Darstellung des Reporterkonstrukts. In **b** und **c** zeigen die dunklen Bereiche die Färbung.

dass viele verschiedene Faktoren für die Regulation eines Paarregelstreifens notwendig sind.

Segmentpolaritätsgene

Die Segmentpolaritätsgene stehen an letzter Stelle in der Segmentierungskaskade. Sie werden in je 14 Streifen exprimiert. Ungefähr zu dem Zeitpunkt ihrer Expression wird die Zellularisierung abgeschlossen. Durch die Segmentpolaritätsgene werden sowohl die Grenzen der Parasegmente definiert, als auch die Polarität innerhalb eines jeden Parasegments. Dabei spielen die Gene *engrailed (en)*, *hedgehog (hh)* und *wingless (wg)* eine zentrale Rolle. *En* und *hh* werden in der anterioren Zellreihe jedes Parasegments exprimiert, *wg* in der posterioren Zellreihe (siehe (DiNardo et al., 1994) und (Perrimon, 1994)). Mit der Expression der Segmentpolaritätsgene ist die segmentale Musterbildung des Embryos abgeschlossen.

Homeotische Gene

Die Identität der einzelnen Segmente wird schließlich von den homeotischen Selektorgenen bestimmt (Lewis, 1978). Sie legen fest, welche thorakalen, gnathalen oder abdominalen Eigenschaften ein Segment ausbildet.

Embryogenese in *Tribolium castaneum*

Die vergleichende Entwicklungsbiologie hat sich zur Aufgabe gemacht, die grundlegenden Prinzipien der Musterbildung zu identifizieren, die bei einer Vielzahl rezenter Arten konserviert sind und somit höchstwahrscheinlich ursprüngliche Mechanismen repräsentieren. Aus diesem Grund werden bestimmte Aspekte in verschiedenen Arten miteinander verglichen.

Die meisten Insekten besitzen einen partiell- superfiziellen Furchungstyp. Sie erreichen während der Embryogenese das sogenannte phylotypische Stadium, das durch den vollständig segmentierten Keimstreif repräsentiert wird (Tautz et al., 1994). Der Weg zu diesem Stadium differiert in Insekten im unterschiedlichen Verlauf von Oogenese und Embryogenese. Bei *Drosophila* findet die Oogenese in meroistisch polytrophen Ovariolen statt. Das bedeutet, dass die Oozyte von 15 Nährzellen umgeben ist. Die Nährzellen sind an der Versorgung der reifenden Oozyte beteiligt und spielen bei der Produktion der maternalen Determinanten, die für die Achsenbildung notwendig sind, eine Rolle. Dabei scheint das Signal für die Lokalisation von *bcd* mRNA von den Nährzellen abzuhängen, während das Signal für die Verankerung von *nos* mRNA von den Follikelzellen generiert wird (Tautz et al., 1994). In viele Insekten läuft die Oogenese ohne Nährzellen ab. Bei ihnen findet die Oogenese in panoistischen Ovariolen statt. Es ist nicht geklärt, zu welchem Zeitpunkt in der Evolution sich die beiden Typen der Oogenese voneinander getrennt haben. Die Oogenese in meroistischen Ovariolen scheint jedoch weniger ursprünglich zu sein (Davis und Patel, 2002; Patel et al., 1994; Tautz et al., 1994).

Ein weiterer Unterschied ist die Einteilung der Insekten in Lang- und Kurzkeimer. Langkeimer, zu denen *Drosophila* gehört, zeichnen sich dadurch aus, dass alle Segmente simultan in einem syncytialen Blastodermstadium angelegt werden. Bei Kurzkeimern wird nur ein Teil der Segmente im syncytialen Blastoderm gebildet. Die fehlenden Segmente entstehen in einem sekundären Wachstumsprozess in einer zellularisierten Umgebung (Davis und Patel, 2002; Tautz et al., 1994). Dabei ist nicht geklärt, ob und wie Gradienten in einem zellularisierten Milieu ausgebildet werden.

Da die Ordnung der Dipteren keinesfalls als ursprünglich zu bezeichnen ist und die Embryogenese von *Drosophila* kein ursprünglicher Entwicklungsmodus ist (Tautz et al., 1994), stellt sich die Frage, welche der aus den Versuchen mit *Drosophila* gewonnenen Erkenntnisse auch auf andere Insekten übertragbar sind.

Der Mehlkäfer *Tribolium castaneum* besitzt eine meroistisch telotrophe Oogenese (Patel et al., 1994). Das bedeutet, dass die Nährzellen im Germarium bleiben und mit der Oozyte über Nährstränge verbunden sind. Des Weiteren ist *T. castaneum* ein Vertreter der Kurzkeimer. Während des Blastodermstadiums werden nur die Kopf- und die Thoraxsegmente angelegt. Dagegen werden die meisten abdominalen Segmente während der Keimstreifverlängerung gebildet. Dieser Typ stellt eine

ursprüngliche Form der Embryogenese dar (Tautz et al., 1994). Daher ist der Käfer ein geeigneter Organismus, um die basalen Mechanismen der Segmentierung in Insekten zu erforschen. Die Linien, die zu *Tribolium* und *Drosophila* führen, haben sich vor ca. 250 Millionen Jahren getrennt.

Segmentierung in *Tribolium castaneum*

Um zu überprüfen, ob Homologe der Gene, die in *Drosophila* an der Segmentierung beteiligt sind, auch bei *Tribolium* Aufgaben während der Segmentierung wahrnehmen, wurde begonnen, Orthologe aus *T. castaneum* zu klonieren und die Expressionsmuster zu vergleichen. Um die homologen Gene aus *D. melanogaster* und *T. castaneum* deutlicher zu unterscheiden, wurden vor die Namen der Gene aus *T. castaneum* die Buchstaben Tc gesetzt.

Auf der Ebene der Segmentpolaritätsgene wurden die Orthologe von *wg* und *en*, *Tc'wg* und *Tc'en* untersucht. Beide sind in segmentalen Streifen exprimiert (Brown et al., 1994b; Nagy und Carroll, 1994; Patel, 1994).

Als Homologen von Gapgenen wurden *Tc'Kr* (Sommer und Tautz, 1993), *Tc'hb* (Wolff et al., 1995), *Tc'gt* (Bucher, 2002) und *Tc'tll* (Schröder et al., 2000) kloniert. Auf dieser Ebene treten Unterschiede im Vergleich zu *D. melanogaster* auf. So wird *Tc'tll* zu einem Zeitpunkt exprimiert, an dem vermutlich nicht die posterioren abdominalen Segmente determiniert werden (Schröder et al., 2000). Im Gegensatz zu *hb* wird *Tc'hb* nicht von *bcd*, sondern unter anderen von *cad* aktiviert (Wolff et al., 1998). Des Weiteren ist die posteriore Expressionsdomäne von *Tc'gt* im Vergleich zu der posterioren Expressionsdomäne *gt* nach anterior verschoben (Bucher, 2002).

Auf der Ebene der maternalen Determinanten wurden *Tc'cad* (Schulz et al., 1998) und *Tc'hb* (Wolff et al., 1995) kloniert.

Die Paarregelgene *Tc'eve* (Brown et al., 1997; Patel et al., 1994), *Tc'fushi tarazu* (*Tc'ftz*) (Brown et al., 1994a), *Tc'run* (Brown und Denell, 1996), *Tc'h* (Sommer und Tautz, 1993) und *Tc'paired* (*Tc'prd*) (Davis et al., 2001) werden alle in je acht doppelsegmentalen Streifen exprimiert. In einer Deletionsmutante, die *Tc'ftz* betrifft, kann allerdings kein Paarregelphänotyp beobachtet werden (Stuart et al., 1991). Dies ist auf die vergleichsweise schnelle Evolution von *ftz* zurückzuführen. *Ftz* liegt im

Hox- Komplex und wird in basaleren Arthropoden in einem an homeotische Gene erinnernden Muster exprimiert (Damen, 2002a). Überexpression von *Tc ftz* in *D. melanogaster* resultiert unter anderem in schwachen homeotischen Transformationen (Lohr et al., 2001). Ursprünglich scheint *ftz* folglich kein Paarregelgen gewesen zu sein. Neben den Expressionsmustern der übrigen Paarregelgene gibt es jedoch weitere Argumente für einen Paarregelmechanismus in *Tribolium*. Bei den chemisch induzierten Mutanten *itchy* und *scratchy* (Maderspacher et al., 1998) sind alternierende Segmente deletiert. Sie können somit der Klasse der Paarregel-Phänotypen zugeordnet werden können. Auch bei der Mutante *godzilla* (Sulston und Anderson, 1996; Sulston und Anderson, 1998) gibt es Argumente, die auf ein defektes Paarregelgen hinweisen. Durch das gezielte Inaktivieren von Tc´Eve durch CALI (chromophore-assisted laser inactivation) konnten Phänokopien mit Defekten, die jedes zweite Segment betreffen, erzeugt werden (Schröder et al., 1999).

Betrachtet man Homologe von Segmentierungsgenen in verschiedenen Insekten und anderen Arthropoden, fällt auf: Je näher man dem phylotypischen Stadium -dem segmentierten Keimstreif- kommt, desto stärker sind die Expressionsmuster konserviert. So ist die Expression des Segmentpolaritätsgens *en* in Insekten, Crustaceen und in Cheliceraten analysiert worden. Dabei ist *en* immer in segmentalen Streifen exprimiert (Damen, 2002b; Patel, 1994; Telford und Thomas, 1998).

Auch wurden weitere Experimente durchgeführt, deren Resultate dafür sprechen, dass der Paarregelmechanismus ein innerhalb der Insekten bzw. Arthropoden konserviertes Prinzip darstellt. Außer bei *Drosophila* und *Tribolium* gibt es bei den Hymenoptera und den Orthoptera Hinweise auf einen Paarregelmechanismus. In der Wespe *Nasonia vitripennis* wurden Mutanten erzeugt, deren Kutikulae auf einen defekten Paarregelmechanismus schließen lassen (Pultz et al., 2000). Obwohl Eve in *Schistocerca* nur als breite Domäne im jungen Embryo exprimiert wird (Patel et al., 1992), gibt es Hinweise auf einen Paarregelmechanismus im Grashüpfer. *Pairberry1*, ein Ortholog zu *paired (prd)*, das in *Drosophila* im Paarregelmuster exprimiert wird, bildet in *Schistocerca* ebenfalls ein doppelsegmentales Muster aus (Davis et al., 2001). Experimente in Cheliceraten deuten ebenfalls auf einen doppelsegmentalen Mechanismus hin. In der Kammspinne *Cupiennius salei* werden die Homologen der Gene *even-skipped*, *runt* und *hairy* in Streifen exprimiert, wobei nicht geklärt ist, ob es sich um ein segmentales oder doppelsegmentales Expressionsmuster handelt

(Damen et al., 2000). In der Spinnmilbe *Tetranychus urticae* wird ein Homolog zu *prd*, *Tu-pax3/7*, im Prosoma zuerst in den ungeradzahligen, dann in den geradzahligen Segmenten exprimiert (Dearden et al., 2002). Obwohl natürlich weitere Experimente durchgeführt werden müssen, erhärten diese Indizien die Hypothese, dass es sich bei der Expression von Genen im doppelsegmentalen Muster um einen ursprünglichen Mechanismus innerhalb der Arthropoden handeln könnte. Wie kann, trotz unterschiedlicher Entwicklungs- und Segmentierungstypen in verschiedenen Spezies ein Paarregelmechanismus erzeugt werden? Die *cis*- regulatorischen Region ist für die zeitlich und räumlich richtige Expression eines Gens verantwortlich. Diese Aufgabe, aus aperiodischen Determinanten ein Paarregelmuster zu generieren, wird in *Drosophila* durch streifenspezifische Elemente erfüllt (siehe oben). Es ist unklar welche Faktoren die Aktivierung der Gene in doppelsegmentalen Streifen in anderen Taxa steuern.

Evolution und Konservierung von *cis*- regulatorischen Regionen

Die Wichtigkeit der Evolution von *cis*- regulatorischen Sequenzen demonstrieren Versuche mit den Promotoren von *prd* und *gooseberry* (*gsb*). Diese Gene zeigen auf der Ebene der Aminosäuren große Übereinstimmung, sie sind jedoch beide unterschiedlich exprimiert. Es wurde gezeigt, dass Prd unter der Kontrolle des *gsb*- Promotors *gsb*⁻ Embryonen so transformieren kann, dass sie in den wesentlichen Merkmalen dem Wildtyp entsprechen (Li und Noll, 1994). Umgekehrt können *prd*⁻ Embryonen mit Gsb unter der Kontrolle des Promotors von *prd* zu lebensfähigen Imagines werden (Xue und Noll, 1996). Folglich vermitteln die verschiedenen *cis*- regulatorischen Sequenzen die unterschiedlichen Aufgaben der beiden Gene.

Durch andere Experimenten wurde die Bedeutung der Konservierung von *cis*- regulatorischen Regionen in der Entwicklung hervorgehoben. So wurden Mäuse mit Teilen des Enhancers des homeotischen Gens *deformed* (*dfd*) aus *D. melanogaster* transformiert. Es wurde gezeigt, dass der Promotor von *dfd* in Mäuseembryonen ein Reportergen exprimieren kann. Dabei wird das Reportergen in einem Teil derjenigen Zellen exprimiert, in denen die Orthologe von *dfd* in der Maus exprimiert werden (Awgulewitsch und Jacobs, 1992). Umgekehrt wurden Fliegen mit der *cis*-

regulatorischen Region eines Homologs von *dfd* aus dem Menschen, *Hox4B*, transformiert. Dabei wurde das Reporterogen in einem Teil der Zellen exprimiert, in denen auch *dfd* exprimiert wird (Malicki et al., 1992). Folglich ist die Regulation von *dfd* und seiner Orthologe zwischen Vertebraten und Arthropoden zum Teil konserviert.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die *cis*- regulatorische Region von *Tc'h* untersucht. Damit sollte geprüft werden, ob die aus *Drosophila* gewonnenen Daten über die Segmentierung auch auf andere rezente Insekten, mit einem ursprünglicheren Entwicklungsmodus übertragbar sind. Ein ursprünglicherer Entwicklungsmodus lässt sich bei *Tribolium castaneum* finden.

Warum wurde der Augenmerk dabei auf *cis*- regulatorische Region des Paarregelgens *Tc'h* gelegt? Wie oben beschrieben stehen die Paarregelgene in der Segmentierung an einer zentralen Stelle. Sie kennzeichnen den Übergang von einem aperiodischen zu einem periodischen Muster. Das doppelsegmentale Muster ist innerhalb der Insekten konserviert und der Paarregelmechanismus ist vermutlich Teil der ursprünglichen Segmentierungskaskade. Es stellt sich die Frage, auf welche Art und Weise dieses Muster in den verschiedenen Typen der Embryonalentwicklung gebildet wird. Den *cis*- regulatorischen Regionen der Paarregelgene fällt dabei die wichtige Aufgabe zu, die entweder in Kurzkeimern oder in Langkeimern bereitgestellten Informationen so zu verarbeiten, dass ein doppelsegmentales Muster entsteht. Bei *Dm'h* handelt es sich um ein primäres Paarregelgen, dessen Promotor in *Drosophila* gut untersucht ist. Einerseits sollte die Regulation des Homolog von *Dm'h* in *Tribolium*, *Tc'h* analysiert werden, andererseits sollte *Drosophila* mit verschiedenen *cis*- regulatorischen Regionen von *Tc'h* transformiert werden, um Erkenntnisse über konservierte Mechanismen zu gewinnen.

Ein weiterer Grund für die Wahl von Orthologen von *Dm'h* kommt aus der Somitogenese des Zebrafisch *Danio rerio*. Ein Homolog zu *Dm'h* und *Tc'h*, *her1* wird während der Embryogenese von *Danio rerio* im präsomitischen Mesoderm exprimiert. Ursprünglich wurde dieses Muster so interpretiert, dass dieses Gen in jeder zweiten Somitenanlage exprimiert wird (Muller et al., 1996). Obwohl es andere Untersuchungen gibt, die von einer Expression des Gens in jeder Somitenanlage ausgehen (Holley et al., 2000), zeigt eine Mutante, die unter anderem auch *her1* und

ein weiteres Homolog von *Dm'h*, *her7*, betrifft, dass die Bildung alternierender Somitengrenzen gestört ist (Henry et al., 2002). Natürlich gilt es zu bedenken, dass die Segmentierung in Insekten in ektodermalem Gewebe stattfindet, dagegen die Somitogenese der Vertebraten im Mesoderm. Die Existenz eines Mechanismus während der Somitogenese in Vertebraten, der jeden zweiten Somiten bzw. jede zweite Somitengrenze betrifft und in den ein Ortholog des Paarregelgens *Dm'h* involviert ist, war folglich überraschend.

Es sollte der Hypothese nachgegangen werden, ob die Regulation von *her1* und den Homologen in Insekten konserviert ist.

4. Ergebnisse

4.1 Aktivität der regulatorischen Region von *Tc'h* in *T. castaneum*

Dm'h ist ein Transkriptionsfaktor mit einem basischen Helix-Loop-Helix Motiv als DNA- bindender Domäne. Ursprünglich wurde das Ortholog von *Dm'h* in *Tribolium*, *Tc'h*, von Ralf Sommer durch PCR mit degenerierten Primern kloniert (Sommer, 1992; Sommer und Tautz, 1993). Mit Hilfe dieses Fragments wurde eine genomische Bibliothek durchsucht und ein Phage isoliert. Aus diesem Phagen wurden 11,6 kb als XhoI- Fragment von Christian Wolff in pBluescript II KS (Stratagene) (= pBst-hTc-X11.0, in beiden Orientierungen) subkloniert. Durch Vergleich mit einem fast vollständigen cDNA- Klon wurde die Lage von Exons und Introns bestimmt (Wolff, 1997). Die 11,6 kb große Region, bestehend aus 5'- flankierender Region, 3 Exons, 2 Introns und 3'- flankierenden Bereichen, wurde von Barbara Wiegand und Christian Wolff sequenziert (Zugangsnummer AJ457831).

Ausgehend von diesen 11,6 kb genomischer Sequenz wurden in dieser Arbeit verschieden große Bereiche der regulatorischen Region entweder direkt mit dem Reportergen *lacZ* fusioniert oder vor *lacZ* mit basalem *hs43*- Promotor aus *D. melanogaster* eingesetzt, in den Transformationsvektor umkloniert und Käfer damit transformiert. Die Organisation der untersuchten Region, sowie die Größe und Lage der verschiedenen Fragmente sind in Abbildung 2-1 schematisch dargestellt.

Um zu überprüfen, inwieweit die isolierte genomische Region, die für die Expression des Reportergens im Paarregelmuster notwendigen *cis*- regulatorischen Bereiche enthält, wurde zunächst der gesamte 5'- flankierende Bereich, der eine Größe von 8,8 kb hat, mit *lacZ* fusioniert. Mit diesem Konstrukt, *Tc'h*-XhoINcoI8.8, wurden Käfer transformiert.

Dazu wurde ein von Berghammer et al. (1999b) entwickeltes Transformationssystem verwendet. Es basiert auf dem *piggyBac* Transposon (Cary et al., 1989) und hat einen universellen, in den Augen sichtbaren Transformationsmarker. Dazu wird GFP (green fluorescent protein) aus *Aequoria victoria* unter der Kontrolle von drei optimierten Pax6- Bindungsstellen exprimiert. Der Promotor sorgt für eine Expression von GFP in den Augen und im Nervensystem. Die Nachkommen der injizierten Tiere können

Locus von *Tribolium castaneum hairy*

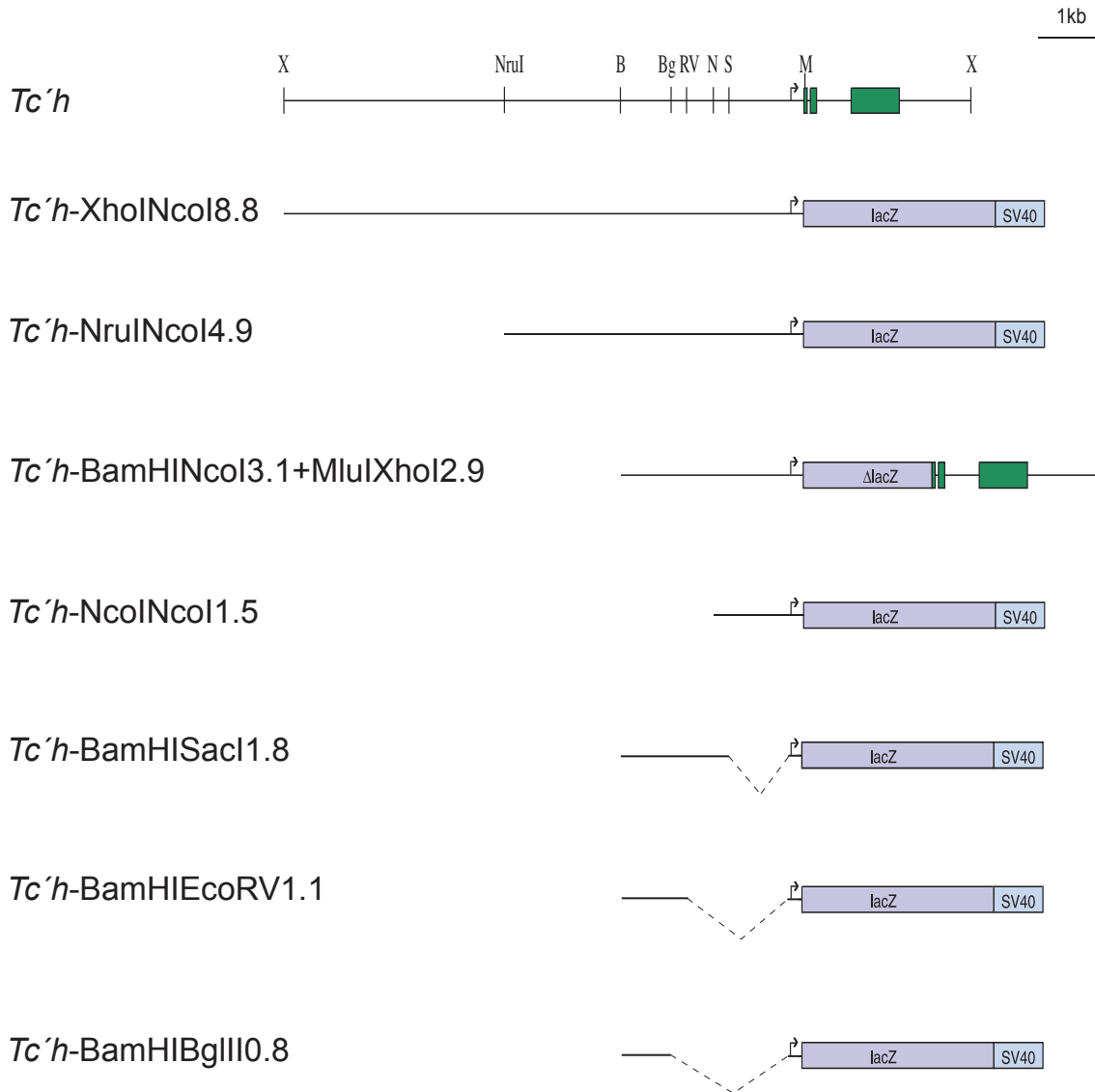


Abb. 2-1 Schematische Darstellung des Locus von *Tc'h* und der untersuchten Konstrukte und Regionen. Die Konstrukte *Tc'h*-XhoI NcoI 8.8, *Tc'h*-NruI NcoI 4.9, *Tc'h*-BamHI NcoI 3.1 + MluI XhoI 2.9 und *Tc'h*-NcoI NcoI 1.5 wurden direkt am Starcodon mit *lacZ* fusioniert (siehe Material und Methoden). Bei *Tc'h*-BamHI SacI 1.8, *Tc'h*-BamHI EcoRV 1.1 und *Tc'h*-BamHI BglII 0.8 wurde der basale *hs43*- Promotor aus *Drosophila* verwendet. Die gestrichelten Linien kennzeichnen die deletierten Regionen. Schnittstellen: B, BamHI; Bg, BglII; RV, EcoRV; M, MluI; N, NcoI; NruI; S, SacI; X, XhoI. Es wurden nur die relevanten Schnittstellen eingezeichnet.

deshalb einfach auf den in den Augen exprimierten Transformationsmarker untersucht werden (Berghammer et al., 1999b; Lorenzen et al., 2003). Dieses System ermöglicht es, die Keimbahn verschiedener Arthropoden mit demselben System zu transformieren und stabile Linien zu erzeugen. In dieser Arbeit wurde das Transformationssystem benutzt, um in *Tribolium* und *Drosophila* die Reportergene *lacZ* und *eGFP* unter der Kontrolle verschiedener regulatorischer Regionen zu exprimieren. Um die transgenen Tiere leichter identifizieren zu können, wurde Stämme verwendet, bei denen die Ommatidien nicht pigmentiert sind.

Tc^h wird im syncytialen Blastoderm in zwei Streifen exprimiert (Abb. 2-2, a). Kurz vor Beginn der Gastrulation erscheint am posterioren Pol ein weiterer Streifen (Abb. 2-2, b). Diese Domäne spaltet sich im jungen Keimstreif in Streifen drei und vier auf (Abb. 2-2, c). Je länger der Keimstreif wird, desto mehr *Tc^h*- Streifen werden gebildet, bis schließlich acht Streifen sichtbar sind (Abb. 2-2, d-g). Die Streifen zwei bis acht spalten sich, nachdem sie die Wachstumszone verlassen haben, in ein segmentales Muster auf (Sommer, 1992; Sommer und Tautz, 1993). Zusätzlich kann entlang der Mittellinie des Keimstreifs von anterior nach posterior Expression von *Tc^h* detektiert werden (Abb. 2-2, c-g). Insgesamt werden acht Streifen in einem Paarregelmuster exprimiert. Es wird also ein Streifen mehr als in *Drosophila* exprimiert, da embryonal in *Tribolium* zwei abdominale Segmente mehr angelegt werden.

Die Expressionsdomänen von *lacZ* unter der Kontrolle von *Tc^h-XhoI*NcoI8.8 in *Tribolium* bilden ein Muster, das bis auf die Expression entlang der Mittellinie der Expressionen von *Tc^h* entspricht. Im frühen Blastodermstadium werden die Streifen eins und zwei exprimiert. Sie liegen bei ca. 65-55% und ca. 40-25% EL, wie in Abb. 2-2, h zu sehen ist (0% EL = posteriores Ende des Ei). Während die Zellkerne in Richtung des posterioren Pols wandern, verschieben sich die beiden Streifen in die gleiche Richtung. Durch Doppelfärbungen wurde verifiziert, dass die Expression von *lacZ* mit der Expression von *Tc^h* übereinstimmt (Abb. 2-3, a+b). Später erscheint am posterioren Pol erscheint der dritte Streifen (Abb. 2-2, i). Die drei Streifen sind in der Keimscheibe gut sichtbar. Im jungen Keimstreif spaltet sich die verbreiterte dritte Domäne in Streifen drei und vier auf (Abb. 2-2, j). Während des Wachstums des Keimstreifens teilt sich von der posterioren Domäne der Streifen fünf ab (Abb. 2-2, k). Die bereits gebildeten Streifen, abgesehen vom ersten, beginnen sich ab diesem

Tc'h

Tc'h-XN8.8

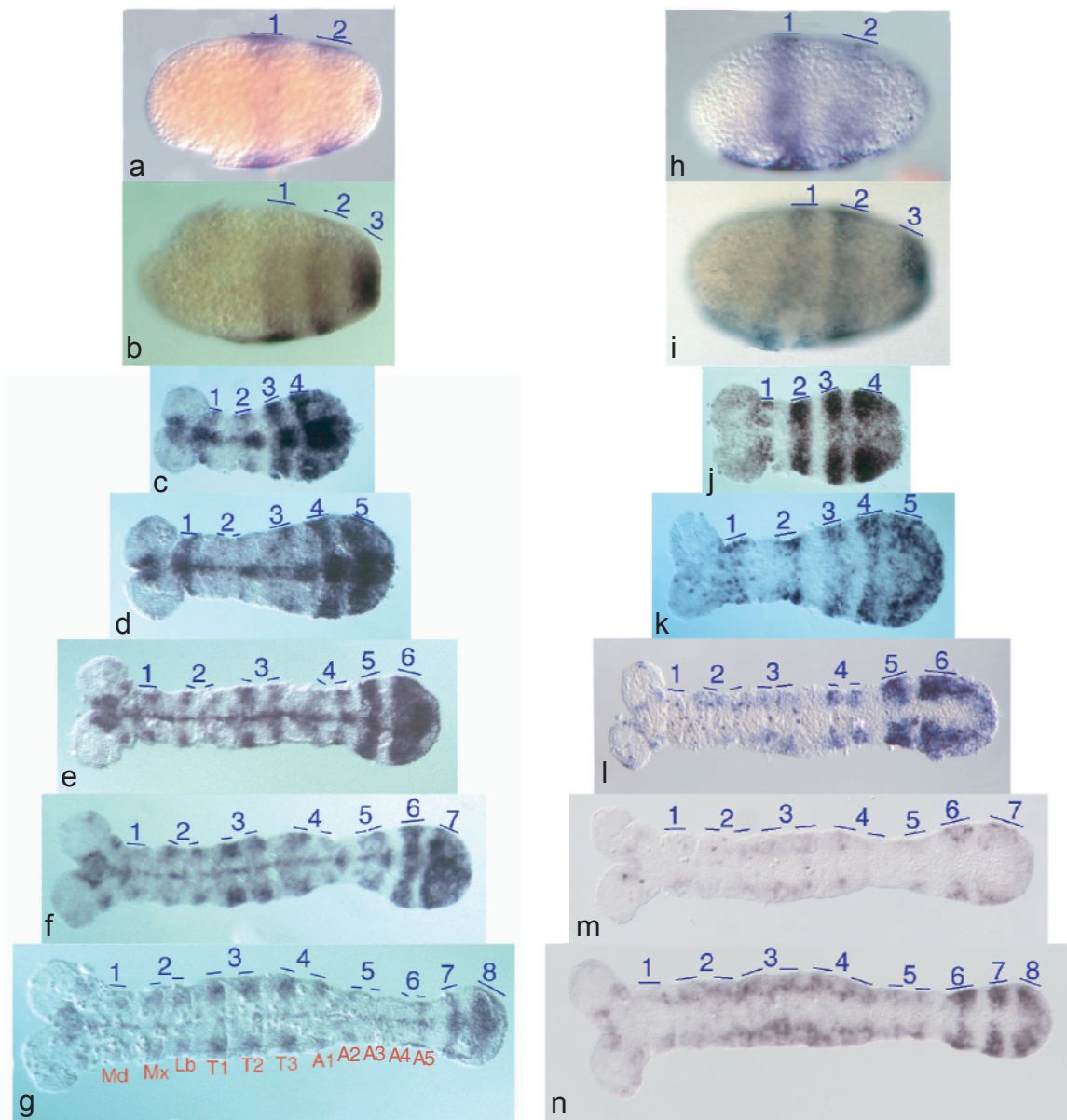


Abb.2-2 Färbung in *Tribolium* gegen **a- g** *Tc'h* mRNA und **h- n** *lacZ* mRNA unter der Kontrolle von *Tc'h*-XhoI/NcoI8.8. **a, h** Blastodermstadium, **b, i** kurz vor Gastrulationsbeginn, **c, j** junger Keimstreif **d- g** und **k- n** sukzessive ältere Stadien. Man beachte die Expression in der Mittellinie in **c- g**. Abkürzungen: Md= Mandibel, Mx= Maxille, Lb= Labium, T1= 1. thorakales Segment, T2= 2. thorakales Segment, T3= 3. thorakales Segment, A1= 1. abdominales Segment, A2= 2. abdominales Segment und so fort. Orientierung der Embryonen: **a, b, h** und **i** anterior ist links und dorsal oben, **c- g** und **j- n** anterior ist links, ventrale Ansicht. **m** und **n** wurden mir von Manuel Aranda zur Verfügung gestellt.

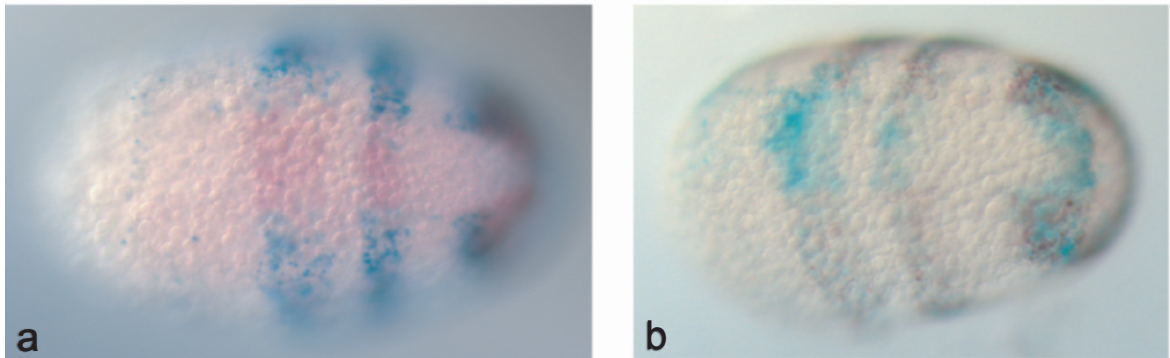


Abb. 2-3 Doppelfärbungen von *Tc'h* mRNA und *lacZ* mRNA unter der Kontrolle von *Tc'h*-XhoI NcoI 8.8 in *Tribolium castaneum* während der Gastrulation. **a** grün: *lacZ* mRNA; braun: *Tc'h* mRNA, **b** grün: *Tc'h* mRNA; braun: *lacZ* mRNA. Da *lacZ* durch *Tc'h*-XhoI NcoI 8.8 nicht ventral exprimiert wird, ist *Tc'h* ventral exklusiv exprimiert. Die Expression der beiden Gene ist bis auf die ventrale Mittellinie gleich.

Orientierung der Embryonen: Anterior ist links, ventrale Aufsicht

Zeitpunkt in jeweils zwei segmentale Domänen aufzuteilen. Der Segmentierungsprozess schreitet mit der Expression des sechsten Streifens fort (Abb. 2-2, l). Die Färbung der Embryonen auf den Abbildungen 2-2, m und 2-2, n wurden von Manuel Aranda durchgeführt und die Bilder wurden mir von ihm freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Man kann auf ihnen die Expression der Streifen sieben und acht erkennen. Während der Expression des achten Streifens ist der fünfte Streifen bereits in ein segmentales Muster aufgetrennt.

Im Gegensatz zu der Expression von *Tc'h*, das zusätzlich entlang der Mittellinie als Streifen von anterior nach posterior im Mesoderm und/oder Neuroektoderm exprimiert wird, wird das Reportergen dort nicht exprimiert.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass das doppelsegmentale Muster des Reportergens mit dem Muster von *Tc'h* übereinstimmt.

Ausgehend von dieser Region, wurden Käfer mit weiteren Konstrukten, bei denen verschiedene Bereiche deletiert oder addiert waren, transformiert. Keine andere getestete Region exprimiert das Reportergen in acht Streifen.

Das Muster von *lacZ* unter der Kontrolle des Konstrukts *Tc'h-NruINcoI4.9*, bei dem 3,9 kb der 5' gelegenen Region deletiert wurden, verhält sich folgendermaßen: Im Blastoderm zeigt sich zuerst am posterioren Pol eine Expressionsdomäne in Form einer Kappe, die dem dritten Streifen von *Tc'h* entspricht (Abb. 2-4, a). Im jungen Keimstreif kann dann das Abspalten des Streifen drei von Streifen vier beobachtet werden (Abb. 2-4, b). Zusätzlich kann auch im Bereich von Streifen zwei eine schwache Expression detektiert werden. Während der Keimstreifverlängerung werden sukzessive die Streifen vier und fünf exprimiert (Abb. 2-4, c). Die drei Streifen spalten sich, nachdem sie die Wachstumszone verlassen haben, in segmentale Domänen auf. In der Wachstumszone wird mit zunehmender Verlängerung des Keimstreifs nach dem fünften Streifen kein weiterer Streifen mehr gebildet (Abb. 2-4, d). Die Streifen sechs, sieben und acht werden nicht exprimiert.

Sehr ähnlich verhält sich *lacZ* unter der Kontrolle von *Tc'h-BamHINcoI3.1-MluIXhoI2.9*. Dieses Konstrukt besteht aus 3,1 kb 5' flankierendem Bereich und aus einer 2,9 kb großen Region, welche das erste Exon partiell, Exon zwei, Exon drei, beide Introns und 3' liegende Sequenzen enthält.

Tc'h-NruI NcoI 4.9

Tc'h-BamHI NcoI 3.1
+ MluI XhoI 2.9

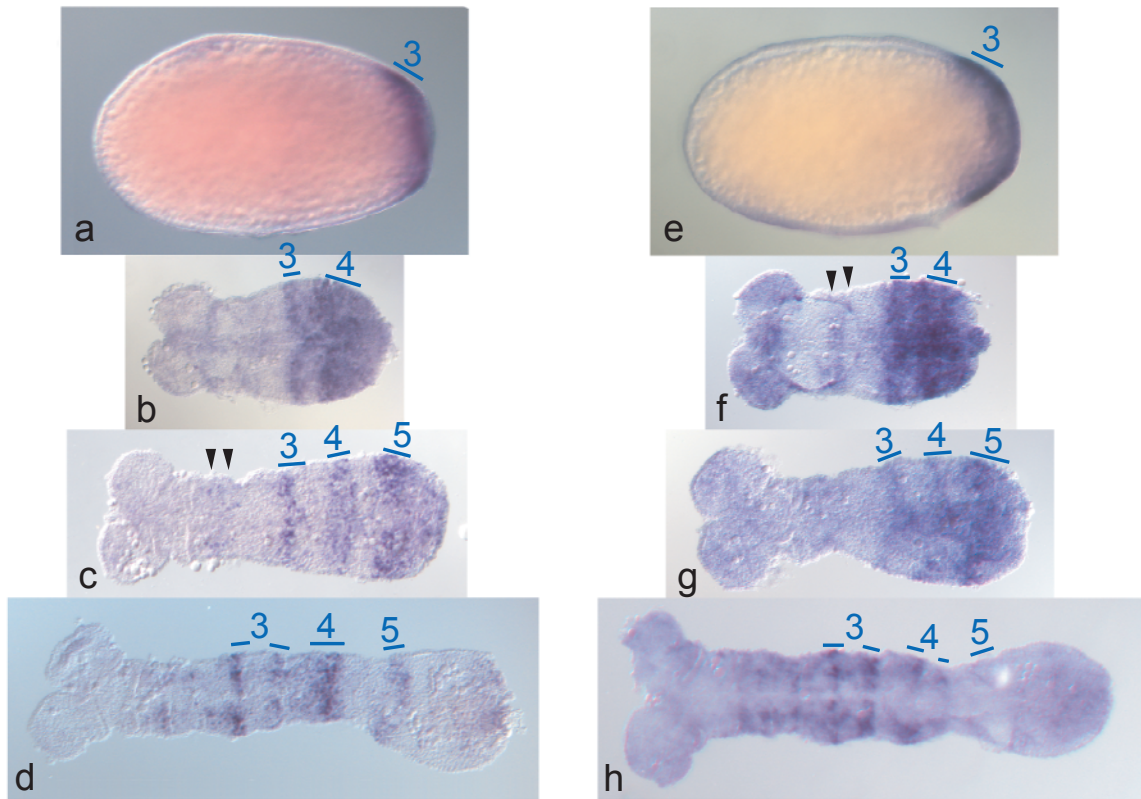


Abb. 2-4 Färbung von *lacZ* mRNA in *Tribolium* unter der Kontrolle von **a-d** *Tc'h*-NruI NcoI 4.9 und **e-h** *Tc'h*-BamHI NcoI 3.1-MluI XhoI 2.9. **a, e** spätes Blastodermstadium kurz vor Gastrulationsbeginn, **b, f** Streifen 3 und 4 im jungen Keimstreif, **c, g** Streifen 3, 4 und 5 in wenig älteren Embryonen, **d, h** der fünfte Streifen hat die Wachstumszone verlassen und die anterioren Streifen haben sich in segmentale Domänen aufgespalten. Pfeilspitzen in **c, f** markieren die schwache Expression von Streifen 2.

Hier kann die früheste Expression von *lacZ* im späten Blastoderm am posterioren Pol beobachtet werden (Abb. 2-4, e). Auch mit diesem Konstrukt kann eine schwache Expression des zweiten Streifen beobachtet werden, die im jungen Keimstreif am besten sichtbar ist. Die Domäne am posterioren Pol verbreitert sich und im jungen Keimstreif spaltet sich die Domäne in die Streifen drei und vier auf (Abb. 2-4, f). Während der Keimstreifverlängerung spaltet sich dann der vierte Streifen ab (Abb. 2-4, g). Der fünfte Streifen ist schließlich der letzte Streifen, der exprimiert wird. Nachdem dieser Streifen die Wachstumszone verlassen hat, trennen sich die doppelsegmentalen Streifen in ein segmentales Muster auf (Abb. 2-4, h). Die beiden Introns und der 3'-flankierende Bereiche vermitteln kein verändertes Expressionsmuster.

Ein weiteres Deletionskonstrukt, *Tc^h-NcoIINcoI1.5*, welches 1,5 kb regulatorische Region enthält, zeigt keine Expression während der Segmentierung in *T. castaneum*. Es konnte weder ein spezifisches Signal noch Hintergrundfärbung beobachtet werden. Daraus folgt, dass die 1,6 kb große Region zwischen den Schnittstellen BamHI und NcoI maßgeblich an der Regulation der Streifen drei, vier und fünf in *Tribolium* beteiligt ist. Um die verantwortlichen Bereiche weiter einzugrenzen wurden Käfer mit weiteren Deletionskonstrukten transformiert und die Expression der Reportergene analysiert. Dazu wurden verschiedene große Fragmente, ausgehend vom Startcodon, deletiert (siehe Abb. 2-1). Als basaler Promotor wurde für die folgenden Konstrukte der 5' UTR von *hs43* aus *D. melanogaster* verwendet.

Eine 1,8 kb große Region, *Tc^h-BamHISacI1.8*, welche außer der erwähnten 1,5 kb großen Region noch zusätzlich ca. 300 bp enthält, zeigt im späten Blastodermstadium eine Expressionsdomäne, die den posterioren Pol bedeckt (Abb. 2-5, a). Die Expression wird in der Keimscheibe und im frühen Keimstreif beibehalten (Abb. 2-5, b). Während des Wachstumsprozesses verbreitert sich die Domäne. Zu dem Zeitpunkt, an dem sich bei *Tc^h* Streifen drei von Streifen vier bereits abgetrennt hat, kann kein solches Aufspalten der Domäne beobachtet werden (Abb. 2-5, c). Dabei dürfte die schwache Expression des Reportergens eine höhere Auflösung behindern. Betrachtet man jedoch wenig älteren Keimstreifen, kann ein abgetrennter dritter Streifen identifiziert werden (siehe Pfeilspitzen in Abb. 2-5, d). Bei dieser Abbildung 2-5, d sollten neben Streifen drei, auch die Streifen vier und fünf sichtbar sein. Auch

Tc'h-BamHISacI1.8

Tc'h-BamHIBgIII0.8

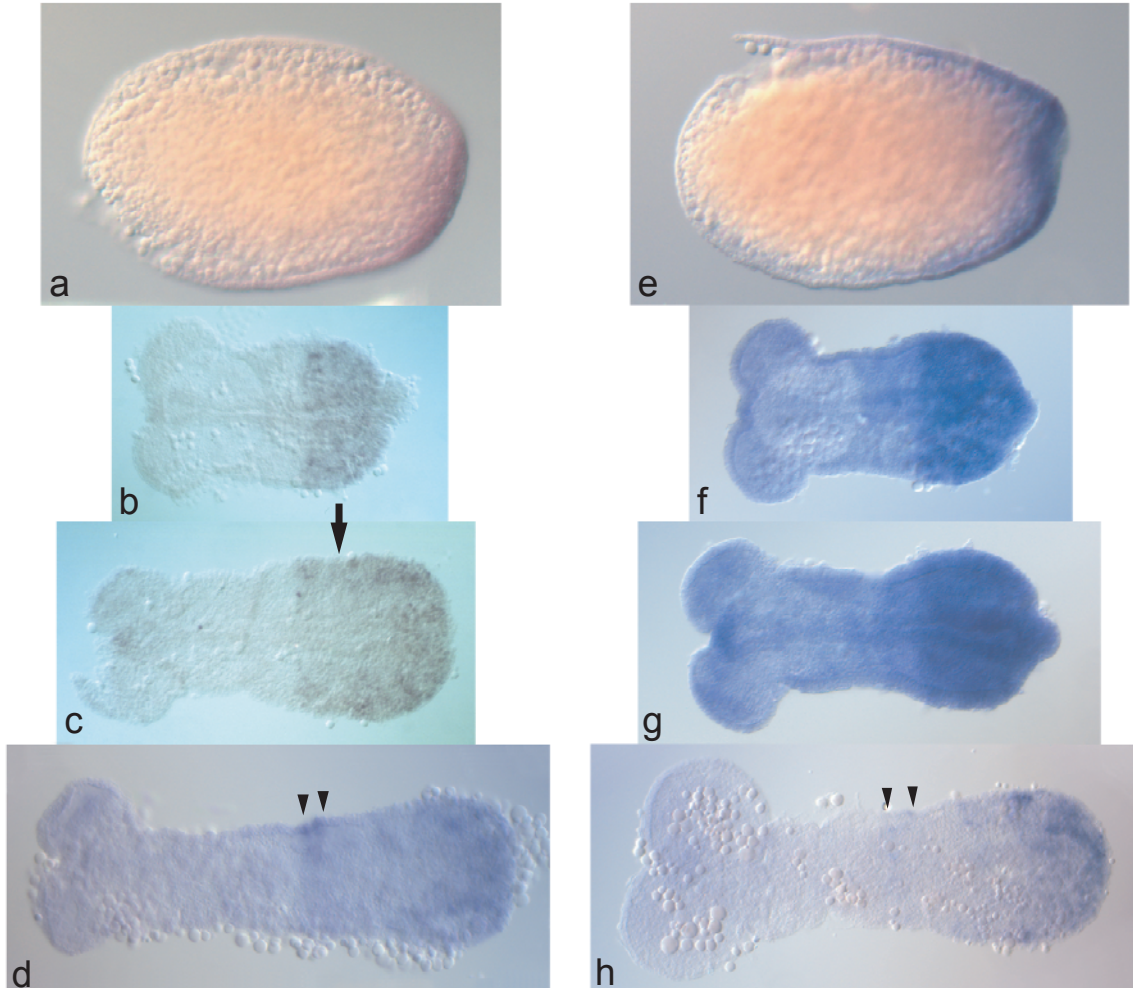


Abb. 2-5 Färbung von *lacZ* mRNA in *Tribolium*. **a-d** *lacZ* unter der Kontrolle von *Tc'h*-BamHISacI1.8 und **e-h** *lacZ* unter der Kontrolle von *Tc'h*-BamHIBgIII0.8.
a, e Blastodermstadium, **b, f** junger Keimstreif, **c, g** wenig ältere Stadien, in denen sich bei *Tc'h* der Streifen 3 von Streifen 4 abgetrennt hat. Der Pfeil zeigt diesen Bereich.
d, h Keimstreifen, bei denen sich bei *Tc'h* der Streifen 4 von Streifen 5 abgespalten hat. Hier ist der abgespaltene Streifen 3 sichtbar (siehe Pfeilspitzen).

hier kann man eine Auftrennung der posterioren Domäne nur vermuten. Die Expression wird sukzessive schwächer.

Die Expression von *Tc'h*-BamHIEcoRV1.1 und *Tc'h*-BamHIBgIII0.8, die 1,1 kb bzw. 0,8 kb 5' gelegene Region enthalten, sind der Expression von *Tc'h*-BamHISacI1.8 sehr ähnlich. Das Muster ist, wie für *Tc'h*-BamHIBgIII0.8 in Abbildung 2-5, e-h beobachtet werden kann, im Wesentlichen mit dem oben beschriebenen Muster identisch. Auch hier kann der abgespaltene Streifen drei erst später identifiziert werden (Abb. 2-5, h). Die Expression der kleineren Konstrukte wirkt leicht schwächer.

4.2 Aktivität der regulatorischen Region von *Tc'h* in *D. melanogaster*

Eine weitere Möglichkeit, Erkenntnisse über die Regulation von *Tc'h* zu gewinnen, besteht in der Transformation von Fliegen mit verschiedenen großen Bereichen der regulatorischen Regionen von *Tc'h*. Dabei sollte untersucht werden, ob ein Streifenmuster in Fliegen erzeugt wird und ob sich Hinweise für eine konservierte Regulation finden lassen.

Mit Konstrukten verschiedener Regionen von *Tc'h* (Abb. 2-6) wurden *yw*- Fliegen transformiert. Dabei wurden die Konstrukte *Tc'h*-XhoINcoI8.8, *Tc'h*-BamHINcoI3.1-MluIXhoI2.9 und *Tc'h*-BamHINcoI3.1 von Ernst Wimmer in Bayreuth injiziert und die transgenen Fliegen mit Balancer- Chromosomen stabilisiert. Die mit den Regionen *Tc'h*-BamHISacI1.8, *Tc'h*-BamHIEcoRV1.1 und *Tc'h*-BamHIBgIII0.8 transformierten Fliegen wurden homozygotisiert.

Expression in *yw*- Fliegen

Die Expression von *Tc'h*-XhoINcoI8.8 zeigt in *Drosophila* zu Beginn der Zellularisierung eine anteriore Domäne und eine zentrale Domäne. Die vordere Domäne reicht fast bis zum anterioren Pol (Abb. 2-7, a). Sie zieht sich dann von diesem zurück und wird schwächer. Ihre posteriore Begrenzung reicht bis maximal 70% EL. Sie überschneidet sich nur minimal mit dem ersten Streifen von *Dm'h*. Die

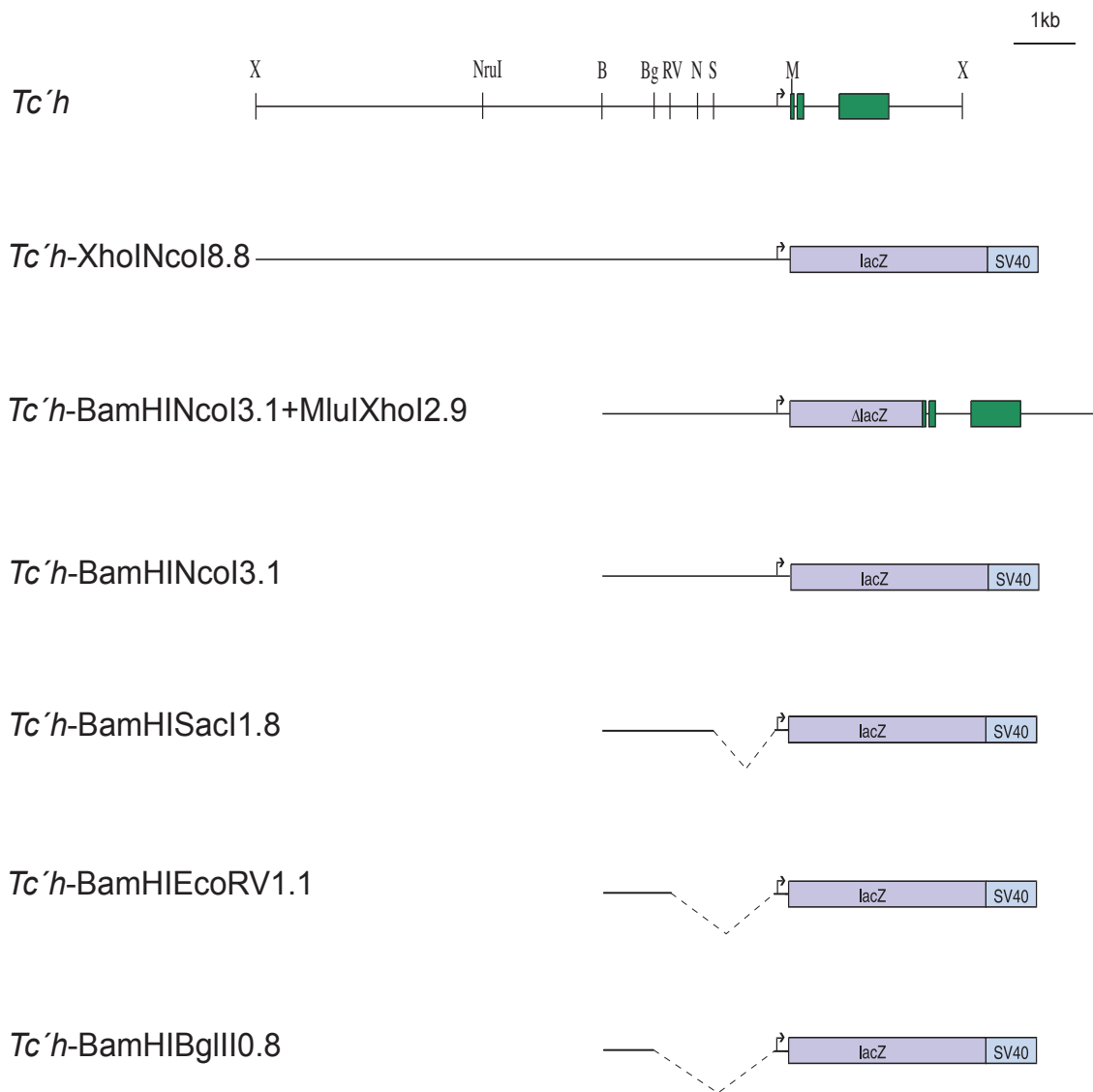


Abb. 2-6 Graphik von *Tc'h* und den Konstrukten, mit denen *D. melanogaster* transformiert wurde. Abkürzungen siehe Abb. 2-1.

*Tc'h-XhoI*NcoI8.8 und *Dm'h* in *Drosophila melanogaster*

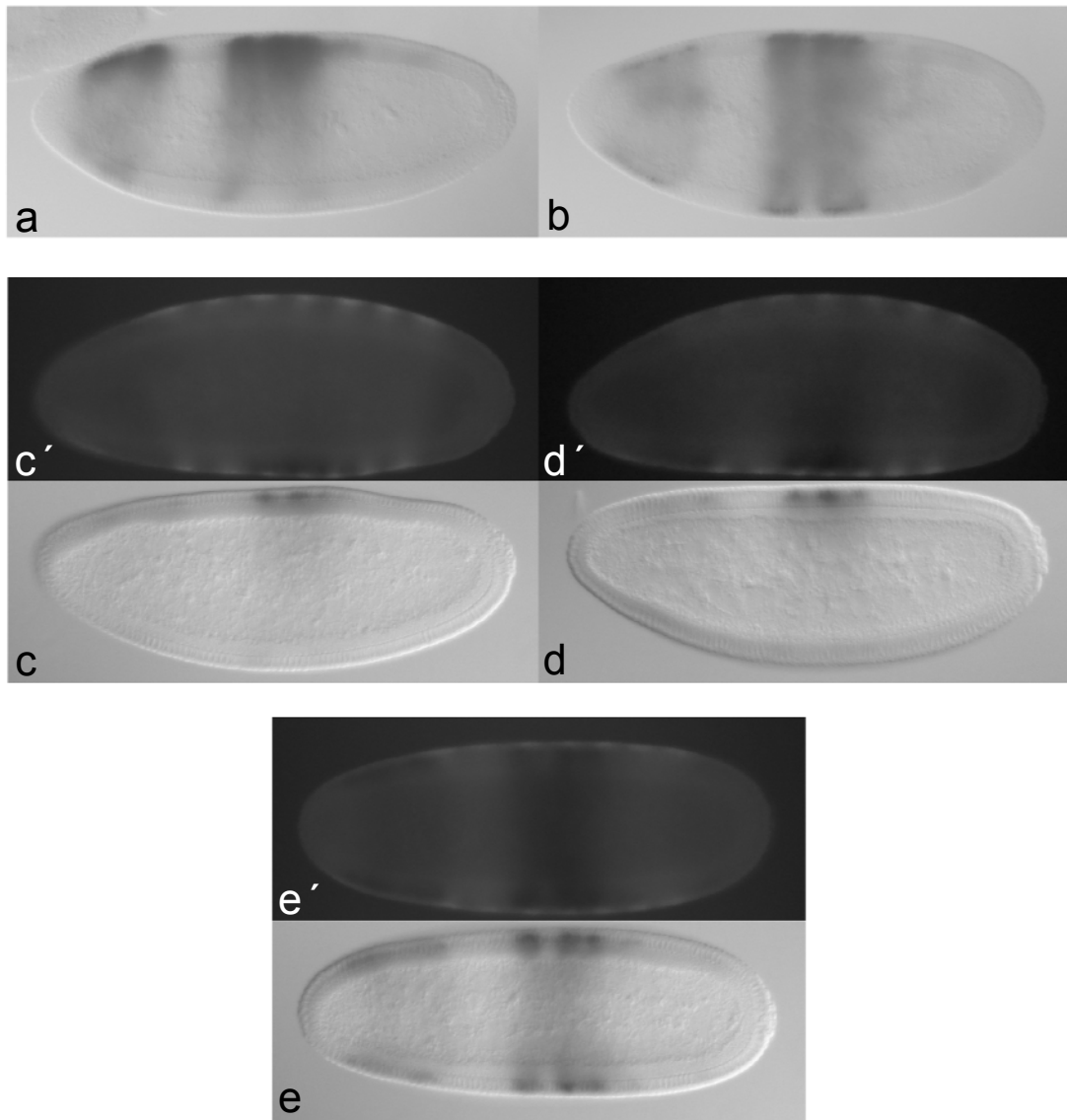


Abb.2-7 Expressionsmuster von *Tc'h-XhoI*NcoI8.8 und *Dm'h* in *D. melanogaster*. **a, b, c, d, e** *lacZ* mRNA unter der Kontrolle von *Tc'h-XhoI*NcoI8.8. **c', d', e'** *Dm'h* mRNA; Färbung mit fluoreszierendem sekundären Antikörper. **c'** zeigt denselben Embryo wie **c**, **d'** denselben wie **d** und **e'** denselben wie **e**. **c', d', e'** sind horizontal gespiegelt. Orientierung der Embryone: **a, c, d** anterior ist links, oben dorsal, **c', d'** anterior ist links, oben ventral, **b, e, e'** anterior ist links, dorsale Aufsicht

zentrale Domäne wird im Bereich von ca. 35%- 65% EL exprimiert. Aus dieser Domäne gehen drei Streifen hervor. Dabei wird zuerst der vorderste Streifen als einzelner Streifen sichtbar (Abb. 2-7, b). Kurz darauf teilt sich der posteriore Bereich in Streifen zwei und drei (Abb. 2-7, c). Der dritte Streifen ist ein wenig schwächer exprimiert als die anderen beiden und ein wenig schmaler. Sein Abstand zu Streifen zwei ist etwas geringer als der Abstand zwischen Streifen zwei und Streifen eins (Abb. 2-7, d+e).

Durch Doppelfärbungen konnte gezeigt werden, dass die ersten beiden Streifen fast an der gleichen Stelle, wie die Streifen drei und vier von *Dm'h* exprimiert sind. Im Vergleich dazu, sind die Streifen des Reportergens um ca. eine Zellreihe nach anterior verschoben. Der dritte Streifen des Reportergens überschneidet sich mit Streifen fünf von *Dm'h* und ist abhängig vom Stadium, um ca. zwei Zellreihen weiter anterior exprimiert (Abb. 2-7, vgl. c mit c', d mit d' und e mit e'). In stark gefärbten Embryonen ist manchmal noch eine posteriore Domäne sichtbar. Sie hat eine Ausdehnung von weniger als 10% EL und liegt posterior des siebten Streifens von *Dm'h*.

Die Expression von *Tc'h-BamHINcoI3.1* in *D. melanogaster* unterscheidet sich nur geringfügig von der Expression von *Tc'h-XhoINcoI8.8*. Auch hier erscheint eine zentrale Expressionsdomäne, die sich schließlich in drei Streifen aufspaltet (Abb. 2-8, a+b). Zusätzlich zu der anterioren Domäne kann auch, wie in den mit *Tc'h-XhoINcoI8.8* transformierten Linien, posterior der zentralen Expression noch ein gefärbter Bereich beobachtet werden. Diese Domäne ist während des Blastodermstadiums sichtbar.

Die Expression von *Tc'h-BamHINcoI3.1-MluIXhoI2.9* in *D. melanogaster* ist im Vergleich zur Expression von *Tc'h-BamHINcoI3.1* wesentlich schwächer. Der Hauptgrund dafür ist vermutlich in dem zu *Tc'h-BamHINcoI3.1* unterschiedlichen 3'UTR zu suchen. Während *lacZ* bei *Tc'h-BamHINcoI3.1* den SV40- Terminator enthält, stammt der bei *Tc'h-BamHINcoI3.1-MluIXhoI2.9* verwendete Terminator von *Tc'h*. Dadurch könnte die Stabilität der mRNA in Fliegen herabgesetzt werden. Deswegen erhält man eine geringere Zahl von Transkripten und folglich eine schwächere Färbung. Dennoch kann man eine anteriore Domäne und eine zentrale Domäne, die sich in drei Streifen auflöst erkennen. Eine posteriore Domäne ist nicht detektierbar.

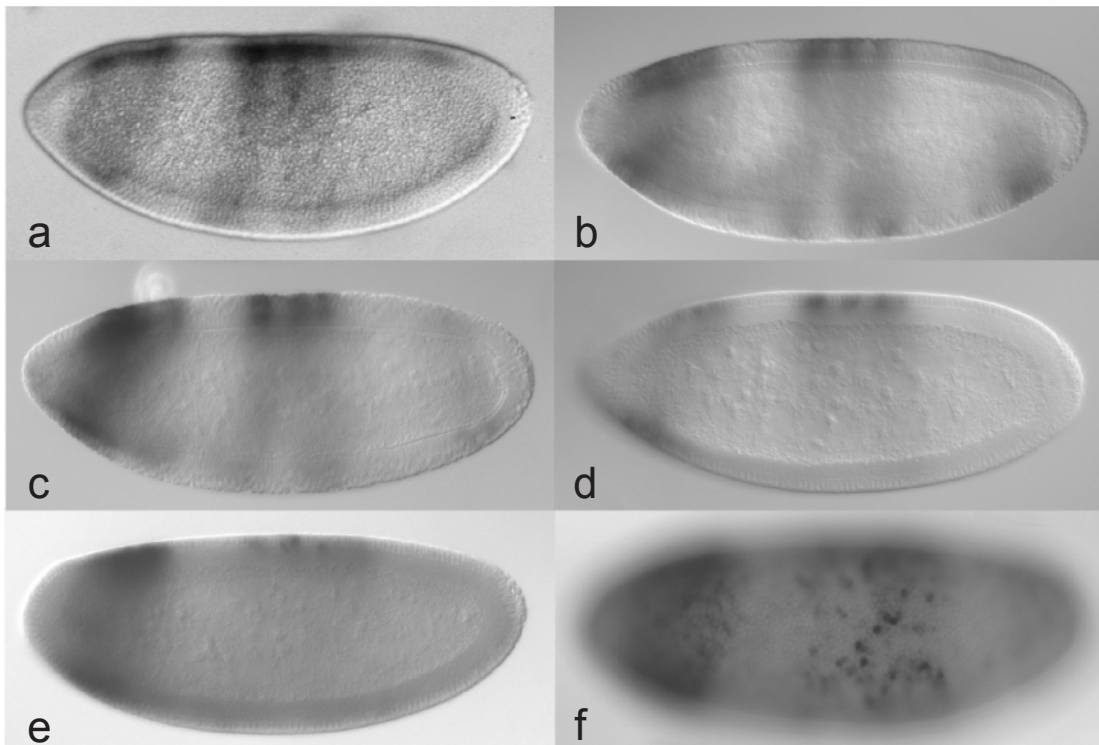


Abb.2-8 *In situ*-Hybridisierungen in *Drosophila melanogaster* gegen *lacZ* mRNA unter Kontrolle verschiedener Regionen von *Tc'h*. **a, b** Expression von *Tc'h*-BamHINcoI3.1, **c** *Tc'h*-BamHISacI1.8, **d** Expression von *Tc'h*-BamHIEcoRV1.1, **e, f** Expression von *Tc'h*-BamHIBglII0.8. Zwei verschiedene Embryonen der stärker exprimierenden Linie, von denen **e** ein Muster in drei Streifen zeigt. Bei **f** ist auf die Oberflächen fokussiert, um das "fleckige" Muster zu zeigen.

Die Expression von *Tc h-BamHISacI1.8* und *Tc h-BamHIEcoRV1.1* in *Drosophila* unterscheidet sich kaum von dem für *Tc h-XhoINcoI8.8* und *Tc h-BamHINcoI3.1* beschriebenen Muster. Es wird auch hier eine anteriore Domäne exprimiert, gefolgt von einer zentralen Domäne. Die zentrale Domäne löst sich mit der oben beschriebenen Dynamik in drei Streifen auf. Auch die posteriore Domäne kann identifiziert werden. Die Färbung ist auch nicht schwächer, wie aufgrund der Ergebnisse aus *Tribolium* zu erwarten gewesen wäre (Abb. 2-8, c+d).

Die Expressionsmuster der beiden mit *Tc h-BamHIBglIII0.8* generierten Linien unterscheiden sich voneinander. Die eine Linie bildet ein Muster aus, welches dem bereits beschriebenen Muster ähnlich ist: Die anteriore Domäne verhält sich wie in den Linien mit größeren Konstrukten (Abb. 2-8, e). Die zentrale Domäne löst sich nicht so klar in drei Streifen auf. Der Grund dafür liegt in der "fleckigen" Expression der Linie. Das heißt, dass einzelne Zellen bzw. sich bildende Zellen sehr stark färben, während unmittelbar benachbarte keine oder kaum Expression zeigen (Abb. 2-8, f). Dies kommt bei Linien mit schwach exprimiertem *lacZ* öfter vor (persönliche Mitteilung von Martin Klingler). Die andere der beiden Linien zeigt nur sehr schwach zwei Expressionsdomänen. Eine anteriore Domäne, deren Lage mit der oben beschriebenen in Übereinstimmung zu bringen ist und eine zentrale, die extrem schwach exprimiert wird und eine geringere Ausdehnung besitzt. Es kann bei dieser Linie keine Auflösung in Streifen beobachtet werden.

Alle getesteten Deletionskonstrukte, mit Abstrichen auch *Tc h-BamHIBglIII0.8*, zeigen in *D. melanogaster* ein fast identisches Muster. Dabei überschneidet sich die anteriore Domäne nur minimal mit *Dm h* Streifen eins und die posteriore Domäne, abhängig vom Stadium, nicht oder nur leicht mit dem sieben Streifen von *Dm h*. Die Regulation und Bedeutung der beiden Domänen erschließen sich nicht aus den durchgeführten Experimenten. Vermutlich sind beide Domänen auf eine in *Tribolium* nicht vorhandene Kombination von Transkriptionsfaktoren zurückzuführen. So besteht die Möglichkeit, dass sie durch einen oder mehrere Faktoren aktiviert werden. Eine andere Möglichkeit besteht in der fehlenden Repression in diesen Bereichen oder einer Überlagerung beider Phänomene. So wurde unter anderem für den *eve* Streifen zwei gezeigt, dass ein ganzes Set an aktivierenden und reprimierenden Faktoren für die Expression in einem bestimmten Bereich notwendig ist. Dabei müssen auch Gene

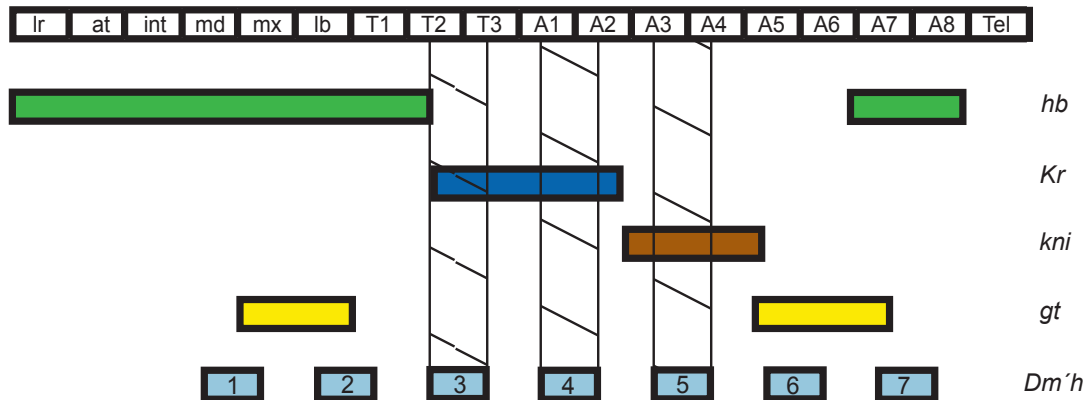
beachtet werden, die nicht in unmittelbarer räumlicher Nähe des *eve*- Streifen zwei exprimiert werden (Andrioli et al., 2002).

Da die drei Streifen, in denen *lacZ* durch verschiedene 5'-flankierende Sequenzen von *Tc^h* in *D. melanogaster* exprimiert wird, an fast der gleichen Stelle, wie die Streifen drei, vier und fünf von *Dm^h* gebildet werden, stellt sich die Frage, ob die drei Streifen von *Dm^h* und *Tc^h* auf gleiche oder ähnliche Art und Weise reguliert werden. Betrachtet man das Entstehen der Streifen von *Dm^h*, erkennt man, dass die meisten Streifen in *Drosophila de novo* entstehen und sich nicht aus einer Domäne abspalten. Die Streifen drei und vier von *Dm^h* unterscheiden sich hier von den anderen dadurch, dass beide zuerst als eine gemeinsame Domäne erscheinen, die sich dann in zwei Streifen aufspaltet (Pankratz et al., 1990). Auch gibt es für beide Streifen nur ein gemeinsames regulatorisches Element, welches sich nicht weiter auftrennen lässt (Hartmann et al., 1994). Dagegen entsteht der fünfte Streifen von *Dm^h* nicht aus einer Domäne, sondern *de novo*. Er wird zeitlich leicht verzögert zu den Streifen drei und vier exprimiert (Pankratz et al., 1990).

Eine Voraussetzung für konservierte Regulation wäre, dass die gleichen Orthologen der Gapgene, die in *Drosophila* an der Ausbildung der einzelnen Streifen beteiligt sind, auch in *Tribolium* so exprimiert sind, dass sie die entsprechenden Streifen regulieren können. Trotz einiger Unterschiede und noch nicht klonierter Orthologe wie *Tc^{kni}*, ist dies aufgrund der Anordnung der Expressionsdomänen der Gapgene und ihrer Homologen durchaus vorstellbar, wie auch durch Abb. 2-9 deutlich wird. In *Drosophila* ergibt sich folgendes Bild: Der dritte Streifen von *Dm^h* liegt in der Expressionsdomäne von *Kr*. Anterior des dritten Streifens wird *hb* exprimiert. Posterior der *Kr*- Domäne wird, wenn auch mit Distanz zu Streifen drei, als nächstes Gapgen *kni* exprimiert. Auch der vierte Streifen von *Dm^h* liegt in der *Kr*- Domäne. Posterior grenzt an den Streifen *kni*, während in anteriorer Richtung als nächstes Gapgen *hb* exprimiert wird. *Kr* begrenzt anterior den fünften Streifen, der in der Expressionsdomäne von *kni* liegt. Posterior schließt *gt* an den Streifen an (nach Hooper et al., 1989; Langeland et al., 1994; Pankratz und Jäckle, 1993; Riddihough und Ish-Horowicz, 1991).

Wie der dritte Streifen von *Dm^h*, liegt auch der dritte Streifen von *Tc^h* in *Tribolium* in der Expressionsdomäne von *Tc^{Kr}*. Anterior von Streifen drei wird *Tc^{hb}* und posterior des Streifens wird *Tc^{gt}* exprimiert. Die *Tc^{Kr}* - Domäne überlappt mit dem

Drosophila



Tribolium

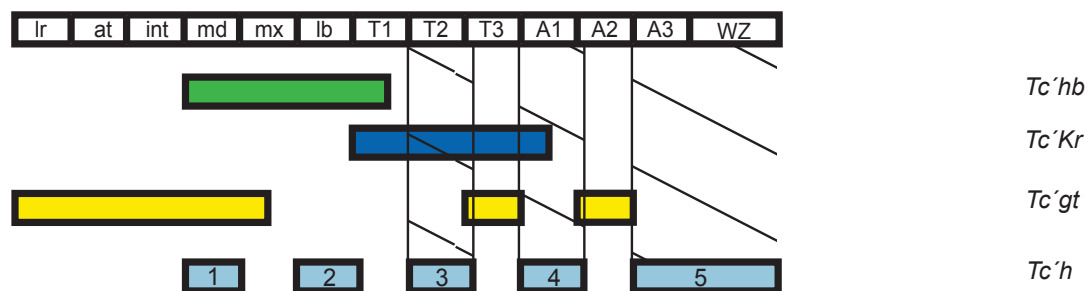


Abb. 2-9 Schematische Darstellung der Expressionsdomänen von *hb*, *Kr*, *kni*, *gt* und *Dm'h* in *Drosophila* und von *Tc'hb*, *Tc'Kr*, *Tc'gt* und *Tc'h* im wachsenden Keimstreif von *Tribolium*. Posterior der Domäne von *Tc'gt* ist nur noch die hintere Expressionsdomäne von *Tc'hb* bekannt. Sie liegt posterior des 6. Streifens von *Tc'h* und erstreckt sich über den 7. und 8. Streifen von *Tc'h*. (Modifizierte Graphik nach Bucher, 2002; Expression der Gene nach Brown und Denell, 1996; Langeland et al., 1994; Pankratz und Jackle, 1993; Bucher, 2002; Sommer und Tautz, 1993; Wolff et al., 1995)

Abkürzungen: lr= Labrum; at= Antenne; int= intercalares Segment; md= Mandibel; mx= Maxille; T1= 1. Thoraxsegment; T2= 2. Thoraxsegment; T3= 3. Thoraxsegment; A1-A8 = 1.- 8. Abdominalsegment; WZ= Wachstumszone; Tel= Telson; 1-7 Nummerierung der Streifen von *Dm'h* und *Tc'h*.

vierten Streifen von *Tc'h*. Dieser Streifen liegt eingebettet zwischen zwei Domänen von *Tc'gt*. *Tc'gt* schließt anterior an den fünften Streifen an. In einem Abstand von mehr als zwei Segmenten, posterior des sechsten *Tc'h*- Streifens wird später *Tc'hb* exprimiert (nach Alexander Cerny (persönliche Mitteilung), (Bucher, 2002; Sommer und Tautz, 1993; Wolff et al., 1995)).

Erwartungsgemäß sind die Domänen der Gappene bezüglich ihrer Lage zu den einzelnen Streifen von *Dm'h* bzw. *Tc'h* nicht exakt gleich. Die bekannten Daten stehen der Annahme einer konservierten Regulation der drei Streifen nicht entgegen. Sie zeigen, dass für die Streifen drei, vier und fünf in *Drosophila* und *Tribolium* bezüglich der Expressionsdomänen der Gappene ähnliche Bedingungen herrschen.

4.3 Expression von *Tc'h*-XhoINcoI8.8 in Segmentierungsmutanten von *D. melanogaster*

Um weitere Erkenntnisse über den Einfluss verschiedener, an der Segmentierung beteiligter Transkriptionsfaktoren zu gewinnen, wurde *Tc'h*-XhoINcoI8.8 in verschiedene mutante Hintergründe in *Drosophila* eingekreuzt. Dafür wurden Allele der Gappene *gt*, *hb*, *Kr* und *kni* und die beiden primären Paarregelgene *eve* und *run* ausgewählt. Es wurden Mutanten mit amorphem Phänotyp verwendet. In die Mutante des Gens *kni* wurde das Konstrukt *Tc'h*-BamHINcoI3.1 eingekreuzt. Dieses zeigt in Fliegen das gleiche Expressionsmuster wie das Konstrukt *Tc'h*-XhoINcoI8.8 (siehe oben). Bekannte Daten zur Veränderung von *Dm'h* in mutanten Hintergründen (*Dm'h* in Gapmutanten (Carroll et al., 1988; Carroll und Vavra, 1989; Hooper et al., 1989; Klingler und Gergen, 1993) und *Dm'h* in *run*⁻ und *eve*⁻ (Carroll und Vavra, 1989; Ingham und Gergen, 1988)) wurde mit der Expression der Reporterkonstrukte in denselben mutanten Hintergründen verglichen. Aufgrund der Ähnlichkeit der Expression von *Tc'h*-XhoINcoI8.8 mit den *Dm'h*- Streifen drei, vier und fünf wurde die Aufmerksamkeit auf die Expression dieser Streifen gelegt. Die anteriore Domäne zeigt in keiner der Mutanten eine dramatische Veränderung.

Bei der Expression eines Reporterkonstrukts mit der regulatorischen Region von *Dm'h* für die Streifen drei und vier in *run*⁻- Embryonen kann im Blastodermstadium keine Trennung der beiden Streifen beobachtet werden (Hartmann et al., 1994). Betrachtet man die endogene Expression von *Dm'h* in *run*⁻- Embryonen, so ist der

Abstand zwischen den Streifen drei und vier bzw. sechs und sieben zwar verringert, die Streifen sind jedoch deutlich voneinander getrennt (Carroll und Vavra, 1989; Ingham und Gergen, 1988).

Das Expressionsmuster von *Tc^h-XhoI*NcoI8.8 zeigt in *run*⁻ Embryonen im Vergleich zu Wildtyp- Embryonen wenig Veränderungen (Abb. 2-10, a). Das Reportergen wird in drei Streifen exprimiert. Alle drei Streifen erscheinen leicht verbreitert, die Abstände sind geringer, aber klar erkennbar. Es besteht die Möglichkeit, dass *run* einer Expression von *Tc^h* in breiteren Streifen entgegenwirkt, eine ausschließliche Repression durch *run* ist jedoch nicht gegeben.

Das Expressionsmuster von *Dm^h* in *eve*⁻ Mutanten ist verändert: Der zweite Streifen ist signifikant schmaler und schwächer exprimiert. Die anderen Streifen sind allgemein weniger breit und die Abstände zwischen den einzelnen Streifen sind unregelmäßig (Carroll und Vavra, 1989; Ingham und Gergen, 1988).

Folgendes Bild ergibt sich in *eve*⁻ Mutanten für die Expression von *Tc^h-XhoI*NcoI8.8: Es werden drei Streifen exprimiert, welche sich fast nicht von der Expression des Reporterkonstrukts im Wildtyp unterscheiden. Die Streifen sind nicht expandiert und der dritte Streifen ist, wie auch in Wildtyp- Embryonen, schwächer exprimiert (Abb. 2-10, b).

Die Expressionsmuster der Reporterkonstrukte in den Gapmutanten sind ähnlich wie die Expressionsmuster der endogenen Paarregelgene in den Gapmutanten sehr schwer zu interpretieren. Die größte Schwierigkeit dabei liegt in der starken Abhängigkeit der Gappene untereinander. Fehlt ein Gappgen, so sind Expressionsdomänen der anderen Gappene in den verschiedenen mutanten Hintergründen verändert. So ist z.B. die *Kr*-Domäne in *hb*⁻ Embryonen nach anterior und in *kni*⁻ Embryonen nach posterior erweitert (Carroll und Vavra, 1989). Es lässt sich dabei schwer feststellen, ob ein Effekt auf das Fehlen eines Gappgens oder die expandierte Domäne eines anderen Gappgens zurückzuführen ist.

In *hb*⁻ Embryonen erscheint die Expression der *Dm^h*- Streifen zwei, drei und vier gestört. Dagegen scheint der fünfte Streifen nicht gestört zu sein. Ein Reporterkonstrukt, das spezifisch den fünften Streifen reguliert, zeigt in *hb*⁻ Embryonen keine Veränderung (Langeland et al., 1994).

*Tc^h-XhoI*NcoI8.8 wird in *hb*⁻ Embryonen in zwei Streifen exprimiert. Einem posterioren Streifen, welcher mit Streifen fünf von *Dm^h* überlappt und einem

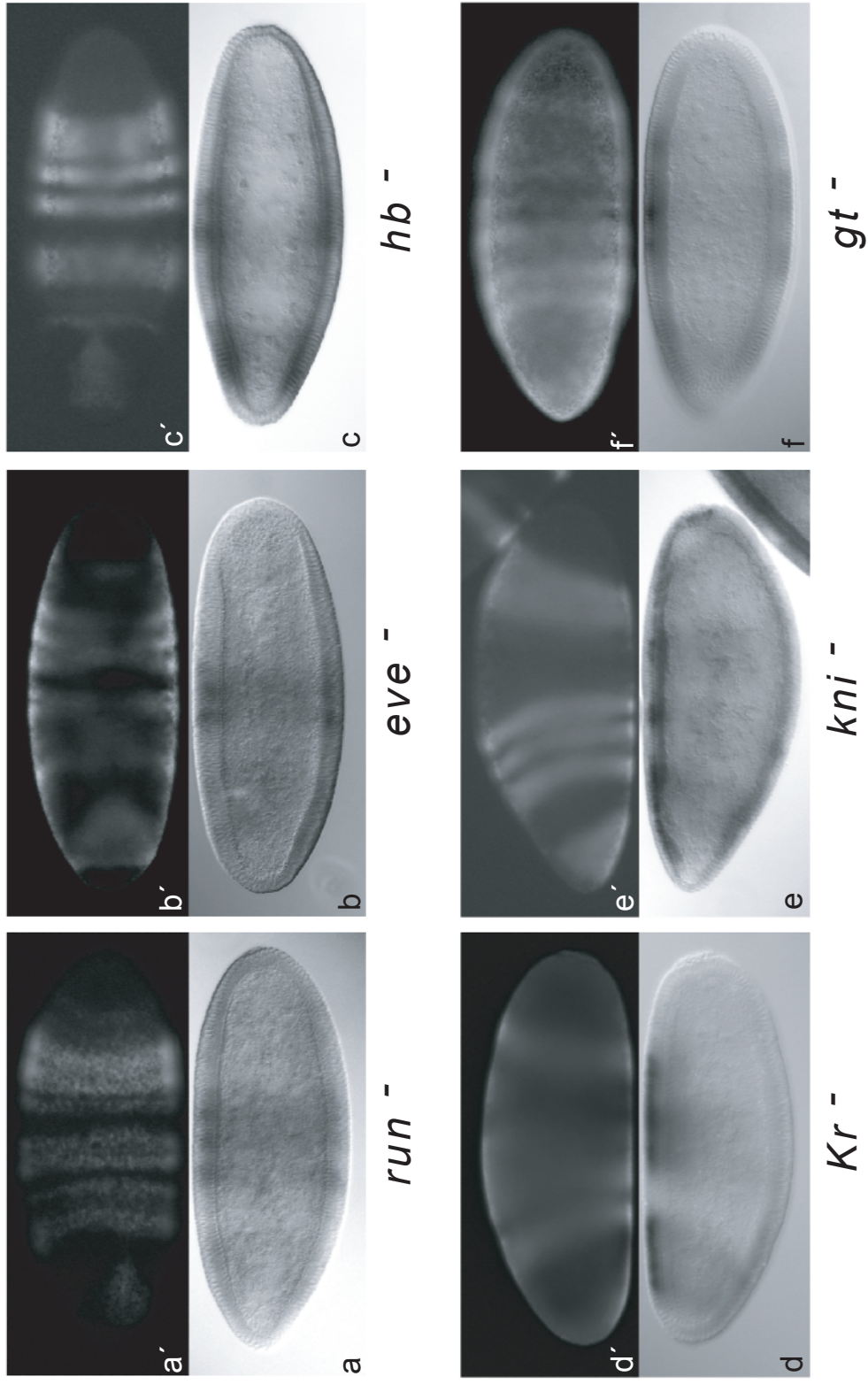


Abb. 2-10 Expression von der regulatorischen Region von *Tc'h* in verschiedenen Mutanten von *Drosophila*. **a,b,c,d,f** zeigen die Expression von *lacZ* mRNA unter der Kontrolle von *Tc'h-XhoI*Ncol8.8, **e** zeigt die Expression von *lacZ* mRNA unter der Kontrolle von *Tc'h-BamHI*Ncol3.1. **a' -f'** *Dm'h* mRNA Expression der selben Embryonen, die im Vergleich zu **a-f** horizontal gespiegelt sind. Die Färbung wurde mit fluoreszierendem sekundären Antikörper (Chromophor:CY2) sichtbar gemacht. **a** *run⁻*, **b** *eve⁻*, **c** *hb⁻*, **d** *Kr⁻*, **e** *kni⁻*, **f** *gt⁻*. Orientierung der Embryonen: anterior ist links.

anterioren, leicht verbreiterten Streifen (Abb. 2-10, c). Dieser Streifen überschneidet sich nicht mit einer Expressionsdomäne von *Dm'h*. Er wird aber ähnlich, wie von Hartmann et al. (1994) für das Element der *Dm'h*- Streifen drei und vier beschrieben, als Domäne in der Mitte des Embryos exprimiert.

Das Expressionsmuster von *Dm'h* in *Kr*⁻- Embryonen besteht abgesehen von der Kopfexpression aus vier Domänen (Carroll und Vavra, 1989). Dabei repräsentieren die erste und die vierte Domäne die Streifen eins und sieben. Die beiden mittleren Domänen umfassen jeweils mehrere Segmente. Das Verhalten der einzelnen Streifen in *Kr*⁻-Embryonen wurde durch Experimente mit streifenspezifischen Elementen untersucht. Zusätzlich wurde zwischen *Kr* und den Streifen drei, vier und fünf *in vitro* eine direkte Interaktion nachgewiesen. Es wurde durch Immunopräzipitationsversuche gezeigt, dass *Kr* an das Element für die Streifen drei und vier bindet (Pankratz et al., 1990). Durch DNaseI- Footprinting (Langeland et al., 1994) und durch Immunopräzipitation (Pankratz et al., 1990) wurde *in vitro* eine direkte Bindung zwischen der *cis*-regulatorischen Region von Streifen fünf und Krüppel demonstriert. Die Expression des Reportergens unter der Kontrolle des regulatorischen Elements für die Streifen drei und vier verschmilzt in *Kr*⁻- Embryonen zu einem Streifen in der Mitte (Hartmann et al., 1994). Mit dem für den fünften Streifen spezifischen Enhancer- Element wurde gezeigt, dass sich in *Kr*⁻- Mutanten die anteriore Grenze des fünften Streifen verschiebt (Langeland et al., 1994).

In *Kr*⁻- Embryonen wird durch *Tc'h*-XhoI/NcoI 8.8 eine zentrale Domäne von etwa 30% bis 60% EL exprimiert und reicht damit bis zum siebten Streifen von *Dm'h*. Folglich ist die Domäne nach posterior erweitert. Ein Auftrennen der Domäne in zwei oder drei Streifen findet nicht statt (Abb. 2-10, d).

Die Streifen eins, zwei und drei von *Dm'h* zeigen in *kni*⁻- Embryonen fast kein verändertes Muster. Dagegen werden die *Dm'h*- Streifen vier bis sieben stark verändert oder gar nicht exprimiert (Klingler und Gergen, 1993). Das für die *Dm'h*- Streifen drei und vier verantwortliche Element zeigt in *kni*⁻- Embryonen nur eine Expression in der Region von Streifen drei (Hartmann et al., 1994). Eine direkte Interaktion zwischen Streifen drei und vier und *Kni* wurde durch Immunopräzipitationsversuche nachgewiesen (Pankratz et al., 1990). Zusätzlich wurde gezeigt, dass *Kni* an der Aktivierung von *Dm'h*- Streifen fünf beteiligt ist (Langeland et al., 1994).

Die Expression von *Tc^h-BamHINcoI3.1* verhält sich in diesem mutanten Hintergrund folgendermaßen: Der erste Streifen des Reportergens in *kni⁻*-Embryonen wird an der gleichen Stelle wie der *Dm^h*-Streifen in *yw*-Embryonen exprimiert. Dagegen wird der mittlere Streifen nicht exprimiert oder verschmilzt mit dem letzten der drei Streifen zu einer Domäne, die breiter als ein einzelner Streifen ist. Zwischen den beiden Domänen kann keine Färbung beobachtet werden (Abb. 2-10, e).

In *gt⁻*-Embryonen werden die ersten vier Streifen von *Dm^h* unverändert exprimiert. Die Streifen fünf, sechs und sieben sind nicht voneinander getrennt und verschmelzen miteinander. Dies wurde durch Experimente mit streifenspezifischen Elementen unterstrichen. So werden mit dem Element für die *Dm^h*-Streifen drei und vier in *gt⁻*-Embryonen keine Veränderungen festgestellt (Hartmann et al., 1994). Dagegen wird die posteriore Grenze des fünften Streifen verschoben, während die anteriore Grenze unverändert bleibt (Langeland et al., 1994).

Der mittlere Streifen des von *Tc^h* regulierten Reportergens erscheint fast unverändert und überlappt mit dem *Dm^h*-Streifen vier. Nach posterior ist der Streifen nicht klar begrenzt, sondern verblasst langsam. Der vordere Streifen ist im Vergleich zu *Dm^h*-Streifen drei nach anterior verschoben. Posterior des mittleren Streifens kann noch eine weitere schwache Domäne bei knapp 30% El identifiziert werden (Abb. 2-10, f). Ob es sich dabei um den weit nach posterior verschobenen dritten Streifen oder eine *de novo* entstandene Domäne handelt kann nicht bestimmt werden. In diesem Bereich, in dem normalerweise *gt* exprimiert wird, könnte durch *gt* eine Domäne reprimiert und somit erst durch die Wegnahme von *Gt* exprimiert werden.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass Paarregelgene wenig Einfluss auf die Expression des Reporterkonstrukts haben, während offenbar alle untersuchten Gaggene an der Regulation beteiligt sind. Das deutet darauf hin, dass auch in *T. castaneum* die Orthologen der Gaggene an der Regulation der Streifen drei, vier und fünf beteiligt sind.

4.4 Die Expression eines Reportergens unter der Kontrolle der regulatorischen Region von *Dm'h* in *T. castaneum*

Ein weiterer Ansatz zur Analyse bestand in der Transformation von *Tribolium* mit charakterisierten regulatorischen Regionen von *Dm'h*. Dazu wurden die gut untersuchten streifenspezifische Elemente der Streifen sechs und sieben ausgewählt (Hader et al., 1998; Howard und Struhl, 1990; La Rosee et al., 1997; Langeland et al., 1994; Pankratz et al., 1990). Zusätzlich wurde ein Fusionskonstrukt, das beide streifenspezifischen Elemente enthält, injiziert. Alle drei Konstrukte mit den minimalen, streifenspezifischen Elementen und *lacZ* als Reportergen wurden von Ernst Wimmer in den *piggyBac*- Vektor umkloniert und in *D. melanogaster* injiziert. Das beobachtete Expressionsmuster in *Drosophila* entsprach dem erwarteten bzw. dem in der Literatur beschriebenen Muster (Hader et al., 1998; Howard und Struhl, 1990; La Rosee et al., 1997; Langeland et al., 1994). Mit diesen drei Konstrukten wurden Käfer transformiert. Keines der Konstrukte zeigte während der Segmentierung in *Tribolium* eine durch *in situ*- Hybridisierung nachweisbare Expression.

In Anbetracht der Ergebnisse der Experimente mit regulatorischen Regionen von *Tc'h* in *Drosophila*, bei denen drei Streifen exprimiert werden, erstaunt es nicht übermäßig, dass keine Färbung detektiert werden kann. Eine Färbung wäre nach den bisherigen Ergebnissen nur mit den Elementen für die *Dm'h*- Streifen drei, vier und fünf erwartet worden.

Um dies zu untersuchen, wurden in einem weiteren Versuch Käfer mit *eGFP* unter der Kontrolle von 14 kb regulatorischer Region von *Dm'h* transformiert. Dieses 14 kb große Fragment enthält alle für die Expression von *Dm'h* in sieben Paarregelstreifen notwendigen *cis*- regulatorischen Elemente (Riddihough und Ish-Horowicz, 1991). Dennoch zeigte auch dieses Konstrukt in *Tribolium* keine Expression.

Dafür dürften mehrere Faktoren verantwortlich sein, die allesamt die Sensitivität der Detektion betreffen. Da der Transformationsvektor sehr groß zu werden drohte, wurde anstatt von *lacZ* das wesentlich kürzere *eGFP* (0,7 kb statt 3,5 kb) als Reportergen benutzt. Das kürzere Transkript wird mit entsprechend kürzeren Sonden hybridisiert und das Signal ist folglich schwächer, als es mit *lacZ* gewesen wäre. Wie bereits oben beschrieben, können Terminatoren und basale Promotoren, obwohl sie keine spezifischen Signale vermitteln müssen, die Stärke der Expression eines Gens

beeinflussen. Durch den verwendeten Promotor von *Dm'h* kann die Transkriptionsaktivität des Konstrukts in *Tribolium* herabgesetzt worden sein.

4.5 Die Expression eines Reportergens unter der Kontrolle der regulatorischen Region von *her1* in *T. castaneum*

Das Gen *her1* aus dem Zebrafisch *Danio rerio*, gehört zur *hairy/ Enhancer of split*-Genfamilie. Zu dieser Familie gehören auch die beiden Gene *Dm'h* und *Tc'h*. Weiterhin wird *her1* während der Embryogenese von *Danio rerio* in den Somiten exprimiert. Dabei wurde das Expressionsmuster zuerst so gedeutet, dass das Gen in alternierenden Somitenanlagen exprimiert wird (Muller et al., 1996). Später wurde vermutet, dass es in jedem Somiten exprimiert wird und genauso, wie *chairy1* im Hühnchen (Palmeirim et al., 1997), im präsomitischen Mesoderm oszilliert bzw. Teil eines oszillierenden Mechanismus ist (Holley et al., 2000). In einer Mutante mit einer Deletion, die neben *her1* auch *her7* und weitere Gene betrifft, treten Störungen bei der Somitogenese auf (Henry et al., 2002). Bei Injektionen von Morpholino-Oligonukleotide, welche die Translation von mRNA verhindern, gegen die beiden genannten Gene wurden ebenfalls Defekte bei der Somitenbildung beobachtet. Dabei scheinen die Grenzen der Somiten abwechselnd stark und schwach ausgebildet zu werden (Henry et al., 2002). Neben einem oszillierenden Mechanismus scheint bei der Somitogenese ein Mechanismus involviert zu sein, der nicht jeden, sondern jeden zweiten Somiten betrifft. Folglich könnte auch bei *Danio rerio* ein Paarregelmechanismus existieren. Es stellt sich die Frage, ob *cis*-regulatorische Elemente konserviert sind.

Von Christian Wolff und Klaus Rohr wurde ein Klon identifiziert, der ungefähr 14 kb 5'-gelegene Region von *her1* enthält. Christian Wolff transformierte mit knapp 10 kb dieser Region *D. melanogaster*. Dieses Konstrukt zeigte eine gerade noch erkennbares Muster in 7 Streifen (persönliche Mitteilung von Christian Wolff). Ausgehend von diesem Ergebnis sollte untersucht werden, ob ein Reportergen unter der Kontrolle einer möglichst großen regulatorischen Region auch in *T. castaneum* ein doppelsegmentales Muster exprimiert. Mit insgesamt 11,4 kb regulatorischer Region von *her1* und *eGFP* als Reportergen wurden Käfer transformiert und auf Expression untersucht.

Weder durch *in situ*-Hybridisierung noch durch direkte Anregung von *eGFP* mittels UV-Licht und geeigneten Filtern konnten Signale detektiert werden, die nicht auf den Transformationsmarker zurückzuführen waren.

4.6 *In silico* Analyse der regulatorischen Region von *Tc'h*

Ein anderer Ansatzpunkt, um die Regulation von *Tc'h* besser zu verstehen bzw. für die Regulation wichtige Elemente zu identifizieren, war die Sequenzanalyse der gesamten genomischen Region mit Hilfe von Analyseprogrammen. Dazu wurde einerseits die Sequenz von *Tc'h* auf Ähnlichkeiten zu bekannten, in Datenbanken verfügbaren Sequenzen untersucht. Andererseits wurde in Kollaboration mit Thomas Werner und Matthias Frisch von der Firma Genomatix die Sequenz von *Tc'h* mit den regulatorischen Sequenzen von *hairy* aus *Drosophila virilis* (*Dv'h*) und *Drosophila melanogaster* verglichen. Dabei wurden von mir die Ausgangsinformationen wie Sequenzen, experimentell ermittelte Bindungsstellen von Transkriptionsfaktoren an Genomatix übermittelt. Diese analysierte die Daten mit von ihnen entwickelten Programmen. Die Interpretation der Ergebnisse wurde wiederum größtenteils von mir vorgenommen.

Datenbanksuche nach homologen Regionen

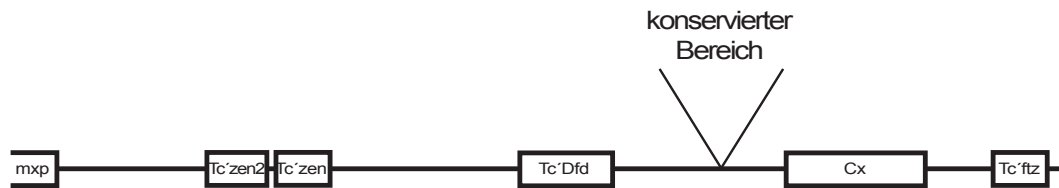
Die genomische Region von *Tc'h* wurde auf mögliche konservierte Bereiche geprüft. Dazu wurden mit dem Programm BLAST (Altschul et al., 1997) die verfügbaren Datenbanken durchsucht (siehe <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>).

Die Sequenzbereiche, die untersucht wurden, wurden in codierende und nicht-codierende Abschnitte aufgeteilt. Die codierenden Sequenzen ergaben, wie erwartet, hochsignifikante Treffer, die sich allesamt auf Gene der *hairy/Enhancer of split* Familie bezogen oder nicht näher identifiziert waren. Bei der Analyse der nicht-codierenden Bereiche wurden die Parameter verändert. Einerseits um zu vermeiden, dass konservierte Bereiche übersehen werden und andererseits, um möglichst wenige "falsche" Treffer und für die Regulation unwichtige Basenabfolgen, wie z.B. repetitive Sequenzen, zu erhalten.

a

```
Tc'h 1560 tacaaactgaacccaaaagtaaggacaaaattttcatatctttggtatgaatcattttt 1618
      ||||| ||||||||||||||||||||| | ||||||| ||||||||||| |||||||||||
HoxC 44755 tacagactgaacccaaaagtaacgcacaaaatata-atatctttgttacgaatcattttt 44698
```

b



c



Abb.2-11 Vergleich zwischen den konservierten Sequenzen der nicht- codierenden Regionen von *Tc'h* und nicht- codierenden Bereich im HoxC- Komplex von *Tribolium*. **a** 51 von 59 bp sind zwischen beiden Regionen konserviert. Senkrechte Striche markieren identische Nukleotide. **b** Lage der homologen Region im HoxC- Komplex (nach Brown et al., 2001) von *Tribolium*. **c** Die konservierte Region liegt ca. 7,2 kb 5' des Startcodons von *Tc'h*.

Abkürzungen: *ftz*, *fushi-tarazu*; *Cx*, *Cephalothorax*; *Dfd*, *Deformed*; *mxp*, *maxillopedia*; *zen*, *zerknüllt*.

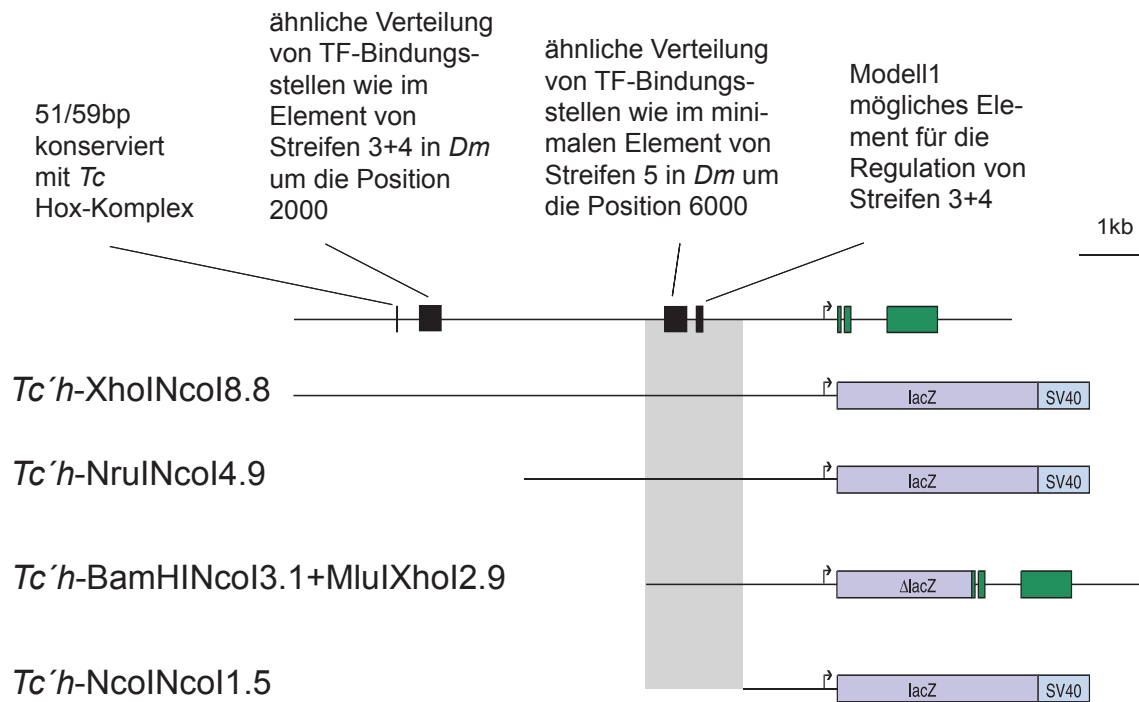


Abb. 2-12 Lage der Bereiche, die durch die *in silico* Analyse als regulatorisch wichtige Regionen identifiziert wurden. Zur besseren Orientierung wurden auch verschiedene Konstrukte, mit denen Käfer und Fliegen transformiert wurden, eingezeichnet. Der grau Bereich kennzeichnet die Region, die für die Regulation der Streifen 3, 4 und 5 verantwortlich ist.

TF- Bindungsstellen, Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren;
Dm, *D. melanogaster*; *Tc*, *T. castaneum*.

Die meisten erzielten Treffer verwiesen auf Bereiche mit polyA und polyT Abschnitten, welche in der 5'-flankierenden Sequenz von *Tc'h* um die Position 2000 zu finden sind. Diese Abschnitte vermitteln in der Regel keine spezifischen Informationen für die Expression von Genen.

Das einzige verwertbare und signifikante Ergebnis, das sich auf einen Sequenzabschnitt außerhalb der codierenden Region von *Tc'h* bezog, zeigte Ähnlichkeit mit einer nicht codierenden Sequenz im Homeobox-Komplex von *T. castaneum* zwischen den Genen *sex comb reduced* und *deformed* (Zugangsnummer AF321227). In diesem Bereich sind 51 von 59 Nukleotiden konserviert (E-Wert 0,67) (siehe Abb. 2-11). Die korrespondierenden Nukleotide liegen zwischen 1560- 1618 bp vom 5' Ende des genomischen Klons und damit 7,2 kb vom Startcodon entfernt (Abb. 2-12).

In den Genomen von *Drosophila melanogaster* und *Anopheles gambiae*, sowie in anderen Datenbanken konnten keine anderen, signifikanten homologen Bereiche zu der nicht- codierenden Region von *Tc'h* identifiziert werden, die auf Abschnitte, die einem erhöhten Selektionsdruck ausgesetzt waren, schließen lassen.

Vergleichende Sequenzanalyse

Es wurden die regulatorischen Sequenzen von *Tc'h*, *Dm'h* und *Dv'h* von der Firma Genomatix miteinander verglichen. Die regulatorische Sequenz von *Dv'h* wurde mir, bevor alle Bereiche öffentlich zugänglich waren, von Casey Bergman übermittelt. Sie wurde, nach Bergman und Kreitman (2001) aus drei verschiedenen Sequenzen zusammengestellt (Zugangsnummer: AF329639, AF329640 und (Langeland und Carroll, 1993)). Ein 14 kb großes XbaI-XhoI Fragment der genomischen Region von *Dm'h* aus *Drosophila melanogaster* wurde aus der Datenbank ermittelt (Zugangsnummer: AE003554). Dieses Fragment enthält alle Sequenzinformationen, die für die Expression von *Dm'h* in sieben Streifen erforderlich sind (Lardelli und Ish-Horowicz, 1993; Riddihough und Ish-Horowicz, 1991).

Der Vergleich der Sequenzen der beiden *Drosophila* Spezies ergab mehrere kurze konservierte Bereiche, die zwischen 20 und 70 Basenpaare lang sind. Diese kurzen Abschnitte wurden in den Regionen gefunden, die durch Transformations- und

niedrigstringente Hybridisierungsexperimente als homologe streifenspezifische Elemente identifiziert wurden (Langeland und Carroll, 1993).

Zwischen den Sequenzen aus *Tribolium* und den beiden *Drosophila*-Spezies konnten keine Sequenzähnlichkeiten gefunden werden, die auf konservierte und damit funktionelle Bereiche schließen lassen.

Verteilung von Konsensus-Bindungsstellen verschiedener Transkriptionsfaktoren

Die regulatorische Region von *Tc'h* wurde zudem auf potentielle Bindungsstellen von Transkriptionsfaktoren und deren Verteilung untersucht. Der Unterschied zur vergleichenden Sequenzanalyse (siehe oben), bei der zusammenhängende Abschnitte miteinander abgeglichen werden, besteht einerseits in der konkreten Suche nach Sequenzmotiven, den Bindungsstellen, andererseits werden die drei Sequenzen, *Tc'h*, *Dm'h* und *Dv'h*, für jeden einzelnen Transkriptionsfaktor unabhängig voneinander betrachtet. Erst in einem zweiten Schritt werden die Verteilungsprofile der Bindungsstellen der drei verschiedenen Sequenzen miteinander verglichen.

Bermann et al., (2002) liefern ein Beispiel für die Anwendung einer ähnlichen Methode: 1 Mb um den *eve*-Locus von *D. melanogaster* wurde nach möglichen Bindungsstellen für Bcd, Cad, Hb, Kr und Kni durchsucht. Treten Bindungsstellen dieser Transkriptionsfaktoren in einer bestimmten Region gehäuft auf, handelt es sich wahrscheinlich um eine funktionale Regulationseinheit. Mit dieser Methode konnten, bei Optimierung der Parameter, drei Bereiche identifiziert werden, die mit den spezifischen Elementen für die *eve*-Streifen zwei, Streifen drei und sieben und die Streifen vier und sechs überlappen. Hierbei wurden jedoch die verschiedenen Bindungsstellen, anders als bei der hier beschriebenen Analyse, nicht einzeln gewichtet.

Ausgangspunkt für die Analyse waren die aus der Literatur bekannten Daten über die Regulation von *Dm'h*.

Für fünf verschiedene Transkriptionsfaktoren, Kni, Kr, Hb, Cad und Tll, die direkt an der Regulation von einem oder mehreren Streifen beteiligt sind, wurden Bindungsprofile ermittelt. Dazu wurden die durch Footprint-Experimente ermittelten Sequenzen aus der Literatur gesammelt (Hader et al., 1998; Hartmann et al., 1994; La

Rosee et al., 1997; La Rosee-Borggreve et al., 1999; Langeland et al., 1994). Für die Bindungsstellen der einzelnen Transkriptionsfaktoren wurden Bindungs-Matrizes erstellt. Mit Hilfe dieser Matrizes wurden die Verteilung der potentiellen Bindungsstellen über die regulatorische Region bestimmt. Anschließend wurde die Verteilung der Bindungsstellen in den einzelnen streifenspezifischen Elementen von *D. melanogaster* ausgewertet und dann nach einer entsprechenden Verteilung der Bindungsstellen in den *cis*- regulatorischen Sequenzen von *Dv'h* und *Tc'h* gesucht. Sowohl die Bindungsmatrizes, als auch die Verteilung der Bindungsstellen wurden von Genomatix ermittelt und analysiert.

In *D. virilis* konnte in bestimmten Regionen eine ähnliche Verteilung der Bindungsstellen wie in den streifenspezifischen Elementen von *D. melanogaster* beobachtet werden. Dies waren die gleichen Regionen, die auch schon bei der vergleichenden Sequenzanalyse und den Experimenten mit regulatorischen Regionen aus *D. virilis* in *D. melanogaster* (Langeland und Carroll, 1993) als homologe Bereiche identifiziert wurden. Dies zeigt, dass diese Methode prinzipiell funktioniert. Die Auswertung der 5'- flankierenden Region von *Tc'h* war weniger eindeutig. Es konnten mit dieser Methode zwei Bereiche gefunden werden, die im Vergleich zu *D. melanogaster* und *D. virilis* eine ähnliche Verteilung aufweisen. So zeigt die regulatorische Region von *Tc'h* um die Position 2000 Übereinstimmung mit dem Verteilungsprofil der Bindungsstellen für die *Drosophila*- Elemente der Streifen drei und vier. Aufgrund der in den Transformationsversuchen gewonnen Daten, konnte die Lage dieses Elementes jedoch an einer anderen Stelle lokalisiert werden. Die Region, die für die Regulation der Streifen drei, vier und fünf verantwortlich ist, liegt zwischen den Basen 5693- 6806. Die experimentell ermittelten Daten stehen damit im Widerspruch zu der theoretischen Vorhersage (siehe auch Abb. 2-12).

Es wurde eine weitere Übereinstimmung im Verteilungsprofil der Bindungsstellen zwischen den 5'- flankierenden Sequenzen von *Dm'h*, *Dv'h* und *Tc'h* gefunden. Der ermittelte Bereich ist in *Dm'h* für die Regulation des Streifens fünf verantwortlich. Die korrespondierende Region in *Tc'h* liegt in der Sequenz um die Position 6000 (Abb. 2-12). Diese Region liegt in dem Bereich, der durch Transformation von Käfern mit Reporterkonstrukten als regulatorische Region der Streifen drei, vier und fünf identifiziert wurde. Somit wird diese Vorhersage durch die experimentellen Ergebnisse bestätigt.

Modell 1

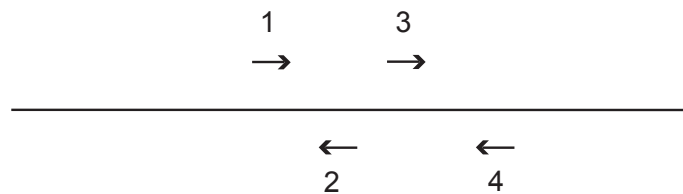


Abb. 2-13 Schematische Darstellung von Modell1. Dabei bezeichnen 1 und 3 potentielle Bindungsstellen von *kni*, 2 und 4 potentielle Bindungsstellen von *hb*. Der Abstand zwischen 1 und 2 darf 5-23 bp, zwischen 2 und 3 1-25 bp und zwischen 3 und 4 3-25 bp groß sein. Dieses Muster konnte in den Sequenzbereichen, welche die Expression der Streifen 3 und 4 in *Dm'h* und *Dv'h* regulieren, gefunden werden. In *Tc'h* kann das Modell mit der Sequenz zwischen den Basen 6490-6539 in Übereinstimmung gebracht werden. Die *cis*- regulatorische Region von *Tc'h*, die für die Expression der Streifen 3,4 und 5 verantwortlich ist, umfasst diesen Bereich.

In silico Identifikation und Test einer Regulationseinheit

Zumeist reicht ein einzelner Transkriptionsfaktor nicht aus, um Gene zu bestimmten Zeiten an bestimmten Stellen anzuschalten. Vielmehr sind meist mehrere Faktoren an der Expression beteiligt. Dabei liegen die Bindungsstellen von Transkriptionsfaktoren oft unmittelbar nebeneinander oder überlappen sogar, wie unter anderem für *Dm'h* (Langeland et al., 1994) und *eve* (Stanojevic et al., 1991) gezeigt wurde.

Es wurde von Genomatix die 5'-flankierenden Sequenzen von *Dm'h*, *Dv'h* und *Tc'h* nach folgenden Kriterien durchsucht: Innerhalb von 75 Basenpaaren müssen Bindungsstellen für zwei verschiedene Transkriptionsfaktoren je zweimal vorhanden sein. Mit Hilfe der beiden *Drosophila*-Sequenzen wurde ein Sequenzabschnitt gefunden, in dem je zwei Bindungsstellen für Kni und Hb vorhanden sind (Dieses Motiv wird im folgenden Modell 1 genannt; Abb. 2-13). Dieser Sequenzabschnitt liegt bei *Dm'h* innerhalb des Elements, das für die Regulation der Streifen drei und vier verantwortlich ist. Der Sequenzbereich zwischen den Basen 6490-6539 in *Tc'h* erfüllt ebenfalls die Kriterien (Abb. 2-12). Dieser Abschnitt liegt innerhalb der Region, die durch Experimente als regulatorischen Region der Streifen drei, vier und fünf von *Tc'h* ermittelt wurde. Allerdings zeigte dieses Modell keine allzu starke Signifikanz, da es bei der Suche in der Datenbank durchschnittlich alle 100.000 Basenpaare auftrat.

Modell 1 wurde experimentell überprüft. So wurde ein insgesamt 158 bp langes Fragment von *Tc'h*, das zusätzlich zu den oben erwähnten 49 bp in beiden Richtungen jeweils 50 bp enthält, untersucht. Dazu wurde dieses Fragment vor einen basalen Promotor von *hs43* aus *D. melanogaster* und *lacZ* kloniert. Mit diesem Konstrukt, mit dem sowohl *D. melanogaster* als auch *T. castaneum* transformiert wurden, konnte keine Expression von mRNA während des Segmentierungsprozesses in einer der beiden Spezies beobachtet werden.

5. Diskussion

Organisation der *cis*- regulatorischen Region von *Tc'h*

Mit Hilfe des auf dem *piggyBac*- Transposon basierendem Transformationssystem (Berghammer et al., 1999b) ist es gelungen, Reporterkonstrukte in die Keimbahn von *Tribolium castaneum* einzuschleusen. Es konnte gezeigt werden, dass 8,8 kb der 5'-flankierende Region von *Tc'h* ausreichen, um ein Reporterogen in einem doppelsegmentalen Muster zu exprimieren. Jedoch werden durch die gesamte untersuchte Region von mehr als 11 kb nicht alle Aspekte des Expressionsmusters von *Tc'h* abgedeckt. So wird das Reporterogen nicht entlang der Mittellinie exprimiert. Folglich müssen sich noch zusätzliche *cis*- regulatorische Bereiche außerhalb der untersuchten Region befinden.

Eine der auffälligsten Eigenschaften des Promotors von *Dm'h* ist die Unterteilung in streifenspezifische Elemente (Hooper et al., 1989). Durch Transformation von Käfern mit Konstrukten, die verschieden große flankierende Regionen von *Tc'h* enthalten, konnten zwei Bereiche identifiziert werden, die für die Regulation unterschiedlicher Streifen zuständig sind: Ein 3,9 kb großer Abschnitt, der mehr als 4,9 kb 5'-distal der codierenden Sequenz liegt, reguliert die Expression der Streifen eins, zwei, sechs, sieben und acht. Aufgrund der unterschiedlichen Bedingungen, welche für die Streifen eins und zwei einerseits, die Streifen sechs, sieben und acht andererseits zum Zeitpunkt ihrer Expression herrschen, ist anzunehmen, dass auch für diese beiden Bereiche unterschiedliche Enhancer- Elemente zuständig sind. Die für die Streifen drei, vier und fünf von *Tc'h* verantwortliche Region konnte auf maximal 1,6 kb eingengt werden, da das 1,5 kb große Fragment *Tc'h*-NcoINcoI1.5 keine Expression zeigt. Wenn man die Experimente mit *Tc'h*-BamHISacI1.8 und *Tc'h*-BamHIEcoRV1.1 betrachtet, kann diese für die Streifen drei, vier und fünf von *Tc'h* verantwortliche Region auf 1,1 kb begrenzt werden. Die durch die 1,8 kb bzw. 1,1 kb *cis*- regulatorische Region kontrollierte Expression des Reportergens in *T. castaneum* ist schwach. Eine möglicher Grund für diese schwache Expression besteht in dem Fehlen von einer oder mehreren Bindungsstellen für einen allgemeinen Aktivator wie z.B. *cad*, die sich in dem deletierten Bereich befinden könnten. Die beiden Konstrukte

Tc'h-BamHISacI1.8 und *Tc'h*-BamHIEcoRV1.1 sind in *Drosophila* jedoch genauso stark exprimiert, wie die größeren Konstrukte. So dürfte die eigentliche Ursache für die schwache Expression in *T. castaneum* bei dem verwendeten *hs43*- Promotor aus *Drosophila* zu suchen sein, welcher in Fliegen problemlos arbeitet. Diese Folgerung erlaubt es, die regulatorische Region für die *Tc'h*- Streifen drei, vier und fünf auf maximal 1,1 kb einzugrenzen. Das Reporterkonstrukt *Tc'h*-BamHIBglIII0.8 wird in *T. castaneum* identisch wie *Tc'h*-BamHISacI1.8 und *Tc'h*-BamHIEcoRV1.1 exprimiert (Abb. 2-5). Das Expressionsmuster von *Tc'h*-BamHIBglIII0.8 in *D. melanogaster* verhält sich jedoch nicht so wie das Muster der anderen Konstrukte (Abb. 2-8). Die regulatorische Region der Streifen drei, vier und fünf von *Tc'h* kann folglich nicht auf 0,8 kb eingegrenzt werden.

Ob die *cis*- regulatorische Region von *Tc'h* in Bereiche unterteilt werden kann, welche die Expression einzelner Streifen regulieren, konnte nicht geklärt werden. In *D. melanogaster* existiert beides: Für die Streifen drei und vier von *Dm'h* gibt es ein gemeinsames Element, das nicht weiter aufgetrennt werden kann (Hartmann et al., 1994), während für alle anderen Streifen sehr wohl diskrete Elemente existieren (Howard et al., 1988; Pankratz und Jäckle, 1993; Langeland et al., 1994; Lardelli und Ish-Horowicz, 1993; Pankratz et al., 1990; Hader et al., 1998; La Rosee et al., 1997). Mit diesen Versuchen ist es gelungen, den Promotor von *Tc'h* in verschiedene Regionen einzuteilen (siehe Abb. 3-1).

Die streifenspezifischen Elemente in den *cis*- regulatorischen Regionen von *Dm'h* und *Dv'h* zeigen dieselbe Reihenfolge (Langeland und Carroll, 1993). Dies wurde ebenfalls durch die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Sequenzanalyse bestätigt. Dagegen zeigen die Elemente des Promotors von *Tc'h* eine unterschiedliche Anordnung. So liegen die Streifenelemente drei, vier und fünf in der 5'- flankierenden Region von *Tc'h* dicht beisammen, während in der Promotorregion von *Dm'h* das Element für die Streifen drei und vier von dem für den fünften Streifen verantwortlichen Bereich durch die Elemente für die Streifen zwei, sechs und sieben getrennt ist (Howard und Struhl, 1990; Pankratz et al., 1990; Riddihough und Ish-Horowicz, 1991; Rushlow et al., 1989).

Aufbau des Promotors von *Tc'h*

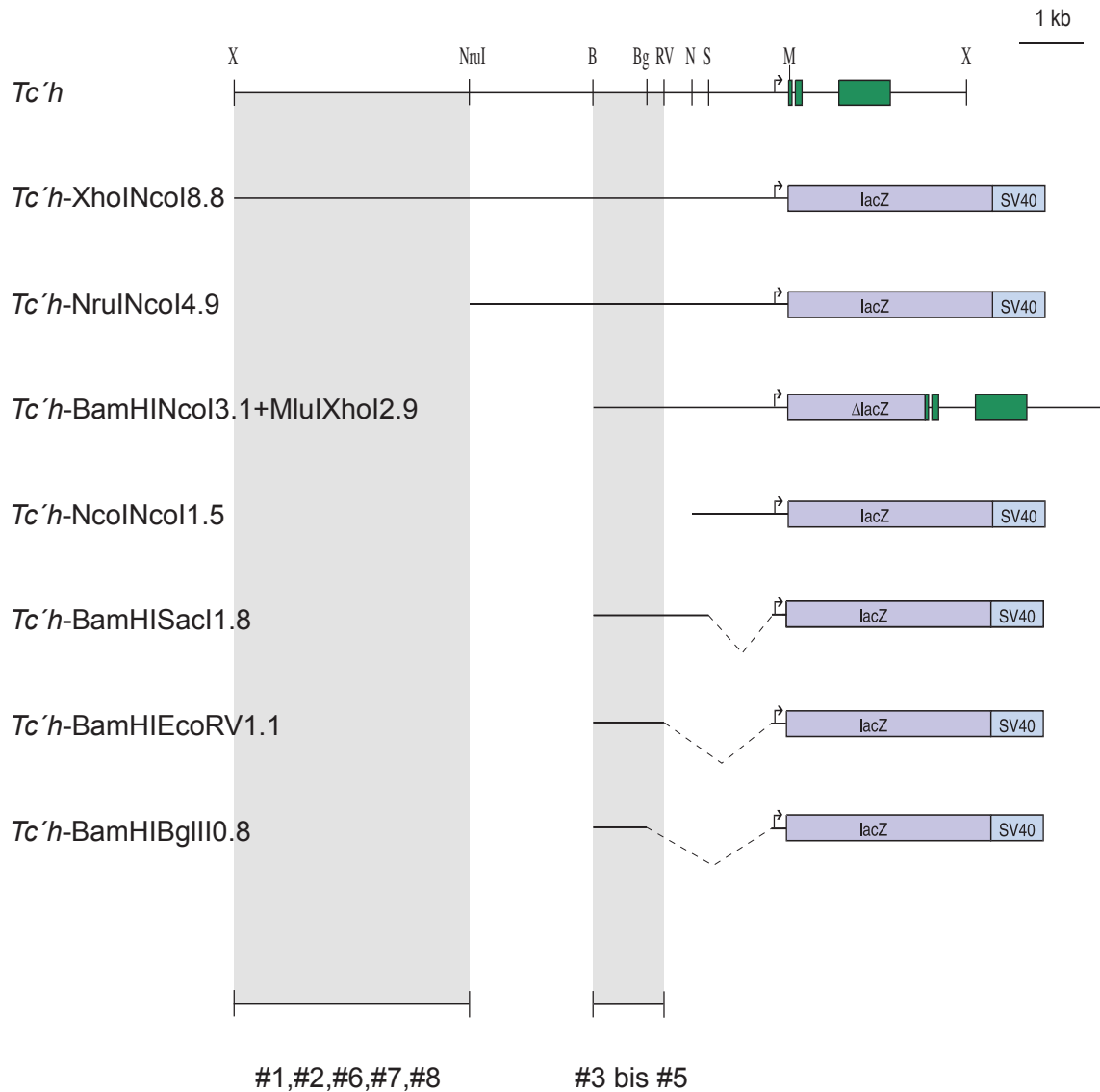


Abb. 3-1 Schematische Darstellung des Locus von *Tc'h* und der untersuchten Konstrukte. Diejenigen Regionen wurden gekennzeichnet, die für die Regulation der Streifen 1, 2, 6, 7 und 8 einerseits und 3, 4 und 5 andererseits verantwortlich sind. Für die Abkürzungen der Schnittstellen verschiedener Restriktionsenzyme und Erklärung der Konstrukte, siehe Abb. 2-1.

Konservierte und nicht-konservierte Aspekte der Regulation von *Tc'h*

lacZ wird durch die regulatorische Region von *Tc'h* in *D. melanogaster* in drei Streifen exprimiert. Die drei erzeugten Streifen stimmen nicht exakt mit der Position der Streifen drei, vier und fünf von *Dm'h* überein. Auch für *Drosophila* gibt es einige Beispiele, bei denen die Expressionsdomänen der Reporterkonstrukte und die Expressionsdomänen der endogenen Gene leicht differieren – etwa bei *Dm'h*: So ist z.B. die durch ein 932 bp großes Element von *Dm'h* exprimierte Domäne des Reportergens im Vergleich mit dem endogenen Streifen sieben um eine Zellreihe nach posterior verschoben (La Rosee et al., 1997; Riddihough und Ish-Horowicz, 1991) (siehe auch Einleitung, Abb. 1-2, c). Ebenfalls um eine Zellreihe weiter posterior als der endogene Streifen sechs ist ein Reporter gen unter der Kontrolle des minimale Streifenelement von Streifen sechs exprimiert (Hader et al., 1998; Howard und Struhl, 1990). In der *cis*-regulatorischen Region von *Dv'h* wurde eine 569 bp große Region identifiziert, die große Ähnlichkeit zur Kontrollregion des fünften Streifen von *Dm'h* aufweist. Mit dieser Region von *Dv'h*, die vor *lacZ* gebracht wurde, wurde *D. melanogaster* transformiert. Das Reporter gen wird an fast der gleichen Stelle wie der Streifen fünf von *Dm'h* exprimiert, die Domäne ist aber nach posterior erweitert (Langeland und Carroll, 1993). Folglich sind kleine Unterschiede zwischen der Expression der Reportergene und den Expressionsdomänen von *Dm'h* nicht außergewöhnlich. Die vorhandene Übereinstimmung deutet vielmehr darauf hin, dass die Regulation der Streifen drei, vier und fünf von *Tc'h* und von *Dm'h* konserviert ist.

Es stellt sich die Frage, warum das Konstrukt *Tc'h-XhoI*NcoI8.8, welches in Käfern ein Muster aus acht Streifen bildet, in Fliegen nur drei Streifen generiert. Die gleichen drei Streifen werden in *D. melanogaster* durch Konstrukte gebildet, die kürzere Abschnitte der 5'-flankierenden Region von *Tc'h* enthalten und die in *T. castaneum* nur die Streifen drei, vier und fünf exprimieren. Am ehesten hätte man erwartet, dass die Streifen eins, zwei und drei konserviert sind: In *Tribolium* werden nur die ersten drei Streifen zu einem Zeitpunkt exprimiert, an dem man noch nicht von einer kompletten Zellularisierung des Embryos ausgehen kann (Handel et al., 2000). Transkriptionsfaktoren hier können diffundieren und Gradienten ausbilden. Da die Segmentierung in *Drosophila* in einem syncytialen Blastoderm stattfindet und die

Diffusion von Transkriptionsfaktoren ein wichtiger Bestandteil der Segmentierung ist, scheint es am plausibelsten, dass die Regulation der ersten drei Streifen zwischen *Drosophila* und *Tribolium* konserviert ist

Betrachtet man jedoch die Regulation der Streifen eins und zwei von *Dm'h*, fällt eine starke Abhängigkeit von *bcd* auf. So enthält das Element für den ersten Streifen putative *bcd*- Bindungsstellen (Rushlow et al., 1989) und in *bcd*⁻- Embryonen werden nur fünf Streifen exprimiert, wovon der am meisten anterior liegende wahrscheinlich eine Duplikation des siebten Streifens ist (Hartmann et al., 1994; Hooper et al., 1989). In *bcd*⁻-*nos*⁻- Doppelmutanten wird dieser vorderste Streifen nicht exprimiert (Riddihough und Ish-Horowicz, 1991). Mit dem Element für den zweiten Streifen wurden nur wenige Experimente durchgeführt. So wurde das Element nicht in *bcd*⁻- Embryonen eingekreuzt. Sieht man sich jedoch die Phänotypen von *bcd*⁻- Fliegen an (St Johnston und Nüsslein-Volhard, 1992) und zieht in Betracht, dass in *bcd*⁻- Embryonen nur fünf *Dm'h* Streifen gebildet werden (Hartmann et al., 1994), wird deutlich, dass auch der zweite Streifen, zumindest indirekt, von *bcd* abhängig sein sollte.

Allerdings konnten bis jetzt Orthologe von *bcd* trotz großer Anstrengungen nur innerhalb der Dipteren kloniert werden. Es ist natürlich immer noch möglich ein Ortholog von *bcd* außerhalb der Dipteren zu finden. Einige Befunde deuten jedoch in eine andere Richtung: Sei es, dass sich Hinweise auf eine kürzlich erfolgte Duplikation von *zerknüllt* verdichten, dessen eine Kopie schließlich zu *bcd* evolviert ist (Stauber et al., 2002); sei es, dass an derjenigen Stelle im homeotischen Komplex von *T. castaneum*, die dem Locus von *bcd* in *D. melanogaster* entspricht, kein homologes Gen von *Tribolium* gefunden werden konnte (Brown et al., 2001). Die anteriore Gap- Domäne von *Tc'hb*, die in *Drosophila* von *bcd* aktiviert wird, wird in *Tribolium* vermutlich von *Tc'cad* aktiviert (Wolff et al., 1998). In *C. elegans* wird ein *cad*- Homolog nicht durch ein *bcd*- Homolog, sondern durch MEX-3 reguliert, ein Protein mit einer KH- Domäne, welches keinerlei Sequenzähnlichkeit zu *bcd* aufweist (Draper et al., 1996). Überexpression von zygotischem *hb* kann in *bcd*⁻- Mutanten Teile des Thorax retten (Wimmer et al., 2000). Zusätzlich wurde gezeigt, dass verschiedene Funktionen von *bcd* im anterioren Musterbildungsprozess in *Tribolium* von den Genen *Tc'otd1* und *Tc'hb* übernommen wurden (Schröder, 2003). Diese Befunde weisen darauf hin, dass *bcd* außerhalb der Dipteren nicht existiert und dass

die Aufgaben von *bcd* von anderen Genen bewältigt werden können. Die Streifen eins und zwei in *D. melanogaster* und *T. castaneum* können folglich nicht auf die gleiche Weise reguliert werden.

Auch bei den posterioren Streifen gibt es Hinweise auf eine unterschiedliche Regulation der Streifen sechs und sieben von *Dm'h* und *Tc'h*. So wird in *tll*⁻ Embryonen der siebte Streifen von *Dm'h* nicht exprimiert (La Rosee et al., 1997). *Tll* ist auch an der Regulation des Streifen sechs beteiligt (Hader et al., 1998; Langeland et al., 1994; Pankratz et al., 1990). In *D. melanogaster* wird *tll* vom terminalen System, der Torso- Signaltransduktionskaskade, aktiviert bzw. die durch Groucho vermittelte Repression von *tll* wird durch die Torso- Signaltransduktionskaskade aufgehoben (Paroush et al., 1997). In *T. castaneum* ist *Tc'tll* bereits im Blastodermstadium am posterioren Pol exprimiert und sowohl die mRNA als auch das Protein sind mit Beginn der Gastrulation verschwunden (Schröder et al., 2000). In diesem Stadium ist auch die MAP Kinase, ein Teil der Torso-Signaltransduktionskaskade, am posterioren Pol aktiv (Schröder et al., 2000). Zu dem Zeitpunkt, an dem die posterioren Streifen in *Tribolium* gebildet werden, wird weder *Tc'tll* exprimiert, noch ist die Torso- Signaltransduktionskaskade aktiv und das terminale System kann folglich nicht an der Regulation der Streifen sechs, sieben und acht beteiligt sein. Zusätzlich wurde für den siebten Streifen von *Dm'h* gezeigt, dass *bcd* an dessen Aktivierung beteiligt ist (La Rosee et al., 1997).

Diese Befunde weisen darauf hin, dass die Regulation von *Dm'h* und *Tc'h* in der anterioren und in der posterioren Region unterschiedlich ist. Dagegen kann die Regulation der mittleren Streifen zwischen den beiden Genen konserviert sein. Da *kni* an der Expression der Streifen drei und vier von *Dm'h* beteiligt ist, würde die Klonierung des *kni*- Homologs aus *T. castaneum*, inklusive der Analyse des Expressionsmusters und zusätzlicher funktionaler Experimente wie RNAi, weiteren Aufschluss darüber geben, ob die Regulation der Streifen konserviert ist.

Um folgende Hypothese zu testen, wurde eine Linie mit *Tc'h-XhoINcoI8.8* in verschiedenen Paarregelmutanten in *D. melanogaster* eingekreuzt: Zuerst findet eine allgemeine Aktivierung der Domäne im zentralen Bereich des Embryo statt. Anschließend wird entweder direkt oder indirekt durch ein Paarregulgen die Expression an ein oder zwei Stellen unterdrückt und ein Muster mit zwei bzw. drei Streifen generiert. Diese Annahme konnte verworfen werden, weil *Tc'h-XhoINcoI8.8*

in den Paarregelmultanten *eve*^{1.27} und *run*^{LB5} in *Drosophila* in drei Streifen exprimiert wird. Da die Expression von *Tc'eve* und *Tc'run* in *Tribolium* zumindest teilweise mit der Expression von *Tc'h* überlappen (Brown und Denell, 1996; Brown et al., 1997), erscheint es wenig plausibel, dass durch eines der beiden Gene eine Repression von *Tc'h* vermittelt wird. Sowohl *eve* als auch *run* gehören zu den primären Paarregelgenen und beeinflussen die Expression der sekundären Paarregelgene. Folglich deutet die Expression in drei Streifen in beiden mutanten Hintergründen darauf hin, dass das Muster *Tc'h* nicht nur von Paarregelgenen kontrolliert wird, obwohl durchaus Interaktionen stattfinden können.

An der Expression der drei Streifen sollten auch maternale Gene und/ oder Gappene beteiligt sein. Die Expression von *lacZ* unter der Kontrolle der regulatorischen Region von *Tc'h* ist in den Mutanten *hb*⁻, *Kr*⁻, *kni*⁻ und *gt*⁻ von *D. melanogaster* verändert - teils entspricht sie der endogenen Expression von *Dm'h*, teils erfolgt sie an Stellen, an denen *Dm'h* nicht exprimiert wird (siehe auch Abb. 3-2).

So wird z.B. in *kni*⁻-Embryonen der dritte Streifen von *Dm'h* und ein Streifen von *lacZ* unter der Kontrolle von *Tc'h*-BamHINcoI3.1 fast genauso wie in Wildtyp-Embryonen exprimiert. Dagegen wird der weiter posterior liegende Streifen von *Tc'h*-BamHINcoI3.1 an einer Stelle exprimiert, an der keine *Dm'h*-Färbung beobachtbar ist. Die Expressionsdomäne eines Reportergens unter der Kontrolle des Elementes für die Streifen drei und vier von *Dm'h* liegt ebenfalls in einer Region, in der das endogene *Dm'h* nicht exprimiert wird (Hartmann et al., 1994).

In *hb*⁻-Embryonen stimmt eine Domäne des Reportergens unter der Kontrolle der 5'-flankierenden Region von *Tc'h* mit der Expression des fünften Streifens von *Dm'h* überein, während die andere Domäne des Reportergens mit der Expression des Elementes für die Streifen drei und vier in *hb*⁻-Embryonen vergleichbar ist.

Dieser Effekt, dass sich einzelne Elemente in verschiedenen genetischen Hintergründen manchmal anders als das endogene Gen verhalten, konnte auch für das Element des Streifens fünf von *Dm'h* beobachtet werden (Langeland et al., 1994, dort nicht explizit erörtert).

Eine Abweichung in den Expressionsdomänen zwischen Reportergen und endogenen Gen wurde nicht nur für Elemente von *Dm'h*, sondern auch für einzelne Elemente von *eve* festgestellt. Obwohl die Expression eines Reportergens unter der Kontrolle des spezifischen Elementes für den zweiten Streifen von *eve* in Wildtyp-Embryonen mit

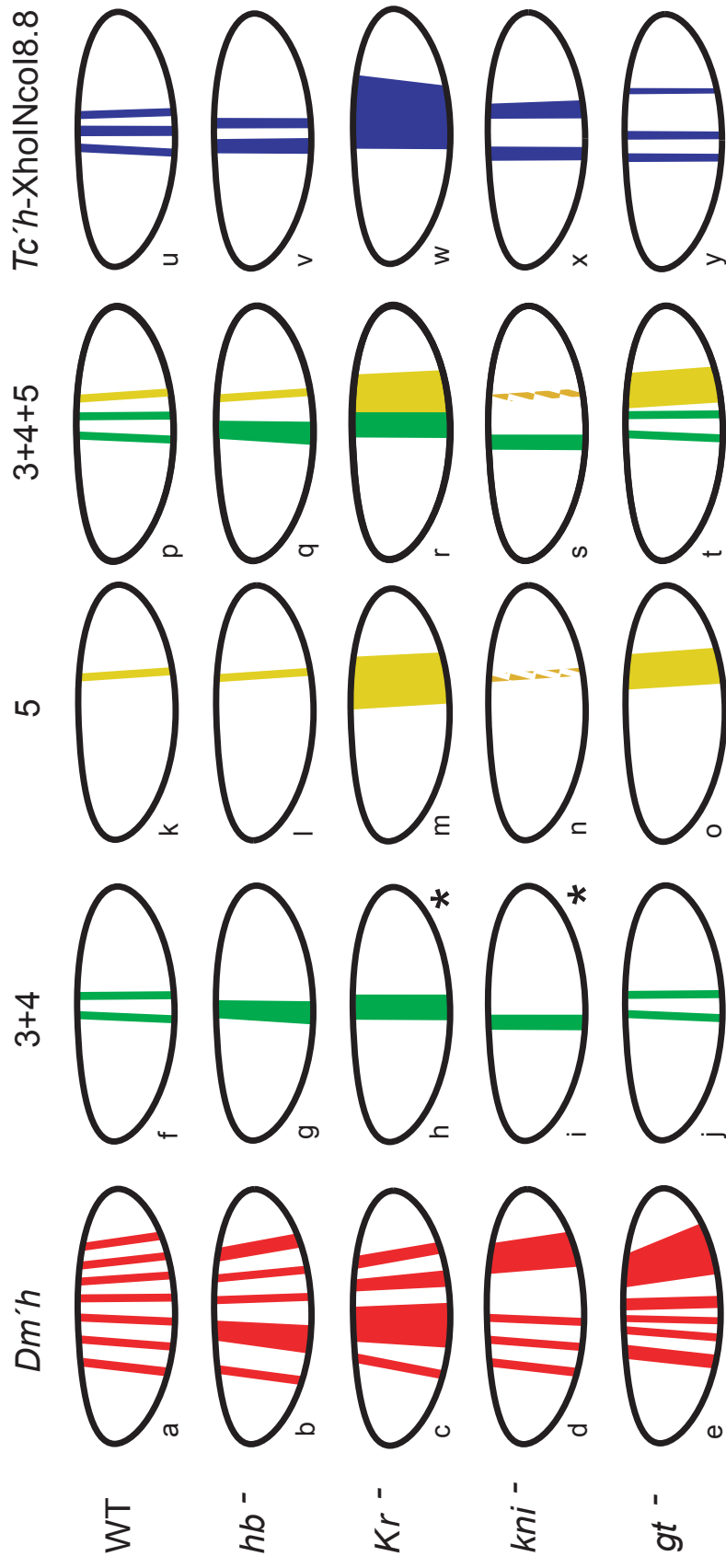


Abb. 3-2 Schematische Darstellung der Expressionsmuster in *Drosophila* Gapmutanten. **a, f, k, p** und **u** Wildtyp- Embryonen, **b, g, i, q** und **v** *hb*⁻ Embryonen, **c, h, m, r** und **w** *Kr*⁻ Embryonen, **d, l, n, s** und **x** *kni*⁻ Embryonen, **e, j, o, t** und **y** *gt*⁻ Embryonen. **a-e** *Dm'h* mRNA (Carroll et al., 1988; Carroll und Vavra, 1989; Klingler und Gergen, 1993) und eigene Beobachtungen, **f-j** *lacZ* mRNA unter der Kontrolle des spezifischen Elements für die Streifen 3 und 4 (Hartmann et al., 1994). Die beiden mit einem Sternchen markierten Abbildungen zeigen die Expression eines streifen-spezifischen Elements, bei dem Streifen 3 und 4 getrennt vorliegen. Die Expressionsdomänen von *lacZ* unter der Kontrolle eines Elements bei dem die Streifen nicht getrennt werden, wird in *kni*⁻ und *Kr*⁻ Embryonen anders exprimiert (Hartmann et al., 1994). **k-o** *lacZ* mRNA unter der Kontrolle des spezifischen Elements für Streifen 5 (Langeland et al., 1994). **p-t** Expression der Streifen-elemente 3, 4 und 5 in den jeweiligen mutanten Hintergründen graphisch übereinander gelegt. **u, v, w, y** *lacZ* mRNA Expression von *Tc'h-XhoI*Ncol8.8, **x** *lacZ* mRNA Expression von *Tc'h-BamHI*Ncol3.1. Gestrichelte Streifen deuten auf eine schwache Expression hin.

der Expression des endogenen Streifens zwei übereinstimmt, verhält sich die Expressionsdomäne des Reporterkonstrukts in einigen genetischen Hintergründen anders als der endogene Streifen zwei (Andrioli et al., 2002). Dafür könnten einerseits Bereiche außerhalb der in den Reporterkonstrukten getesteten *cis*- regulatorischen Regionen verantwortlich sein, andererseits könnte die Position der Insertion des Transposons im Genom, z.B. die Nähe zu Insulatoren eine Rolle spielen.

Die Expression von *lacZ* unter der Kontrolle von *cis*- regulatorischen Regionen von *Tc^h* in *hb⁻*, *Kr⁻*, *kni⁻* und *gt⁻* Embryonen stimmt mit der Expression der Reporterkonstrukte der streifenspezifischen Elemente drei, vier und fünf von *Dm^h* in den jeweiligen Mutanten weitgehend überein. Eine vollkommen gleiche Expression der verschiedenen Konstrukte war auch nicht erwartet worden, da, wie auch die Färbungen in Wildtypembryonen zeigen, leichte Unterschiede in der Regulation der drei Streifen bestehen. Dennoch deuten die Übereinstimmungen darauf hin, dass die in die Regulation der Streifen drei, vier und fünf von *Dm^h* involvierten Faktoren auch an der Regulation der drei Streifen von *Tc^h* auf ähnliche Art und Weise beteiligt sind. Die Ergebnisse dieser Experimente, vor allem auch die Expression in den Paarregelmutanten, sprechen für eine konservierte Regulation der Streifen drei, vier und fünf.

Diskutiert man den Mechanismus der Segmentierung in *T. castaneum*, taucht immer wieder ein zentrales Problem auf: Der größte Teil der Segmentierung in *Tribolium* findet zu einem Zeitpunkt statt, an dem der Embryo, anders als in *Drosophila* zellularisiert ist. Obwohl der genaue Zeitpunkt der Zellularisierung in *Tribolium* nicht bekannt ist -die sich bildenden Zellen sind eine Zeit lang durch einen Stiel mit dem Dottersack verbunden- scheint die Zellularisierung zu Beginn der Gastrulation abgeschlossen (Handel et al., 2000). Wie können also Transkriptionsfaktoren über Zellwände hinweg, in benachbarten Zellen die Transkriptionsaktivität beeinflussen? Werden morphogenetische Gradienten, wie z.B. *otd1* im frühen Blastodermstadium (Schröder, 2003), auch im Keimstreif ausgebildet? Sommer und Tautz (1995) diskutieren verschiedene Mechanismen, wie Gradienten in Keimstreifen ausgebildet werden: Durch mehrere Zellteilungen könnte eine Verdünnung eines Transkriptionsfaktors erreicht werden und damit ein Konzentrationsgefälle entstehen. Eine andere Möglichkeit besteht in der Diffusion von Proteinen durch Zell-Zell-

Verbindungen wie Gapjunctions. Bis jetzt konnte keine zufriedenstellende Lösung dieses Problems gefunden werden.

Neben der Segmentierungskaskade gibt es eine weitere Signaltransduktionskaskade, die in *Drosophila* an der Segmentierung beteiligt ist: Dabei handelt es sich um das Jak/STAT System. Dieses System ist in Fliegen zu verschiedenen Zeitpunkten an Augenentwicklung, Zellwachstum, Geschlechtsdifferenzierung, Blutbildung, in der Spermato- und Oogenese, an der Tracheenbildung und vor allem an der Segmentierung beteiligt (zusammengefasst in Hombria und Brown, 2002; Zeidler et al., 2000). So sind in Embryonen ohne maternales *stat92E* die Segmente A4 teilweise und A5 komplett deletiert, A6 und A7 gelegentlich fusioniert und A8 ebenfalls teilweise deletiert. Die Steifen drei und fünf von *eve* sind in Mutanten, die das Jak/STAT System betreffen, signifikant reduziert (Zeidler et al., 2000). Neben der Segmentierungskaskade ist also auch noch ein anderes Signaltransduktionssystem in die Segmentierung in *Drosophila* involviert. Interessant ist dabei die Unabhängigkeit des Systems von einer Umgebung, in der freie Diffusion möglich ist. Dieses System ist bis jetzt in *Tribolium* noch nicht untersucht worden, könnte aber bei der Determinierung der abdominalen Segmente durchaus eine Rolle spielen.

Auch der Notch- Signaltransduktionsweg leitet Signale über Zellgrenzen weiter. Der Notch-Rezeptor und dessen Ligand Delta sind maßgeblich an der Somitogenese in Wirbeltieren beteiligt (Jiang et al., 2000; Pourquie, 2000). Zusätzlich sind Homologe von *Dm'h* in diesen Musterbildungsmechanismus involviert und werden dabei von Notch und Delta reguliert, wie unter anderem für *Danio rerio* gezeigt wurde (Holley et al., 2000; Takke und Campos-Ortega, 1999). Es besteht auch die Möglichkeit, dass der Notch/Delta- Signaltransduktionsweg an der Segmentierung bei Insekten beteiligt ist. In *Drosophila* spielt dieses System während der Segmentierung entlang der antero-posterioren Achse keine Rolle (Davis und Patel, 1999). Leider konnte bei dem Versuch ein Reporter gen unter der Kontrolle der *cis*- regulatorischen Region von *her1* in *Tribolium* zu exprimieren, kein verwertbares Ergebnis erzielt werden. Dennoch könnte es sich lohnen, diesen Signalweg in *Tribolium* weiter zu untersuchen.

Analyse der *in silico* Ergebnisse

Die Datenbanksuche mit dem Programm BLAST ergab, dass sich knapp 60 bp der nicht- codierenden Sequenz von *Tc'h* und ein nicht- codierender Abschnitt im Homeobox- Komplex von *T. castaneum* stark ähneln. Das kann als Hinweis auf ein konserviertes regulatorisches Element gedeutet werden. Diese Annahme sollte natürlich durch Experimente verifiziert werden. Eine andere Möglichkeit wäre, dass es sich bei der Sequenz um ein Retrovirus oder ein Transposon handelt. Leider sind die veröffentlichten Sequenzen aus der Familie der Tenebrionidae nicht sehr umfangreich und ein Durchsuchen der bekannten Abschnitte gibt keinerlei Aufschluß über sich wiederholende Motive oder Sequenzen, die auf ein Transposon schließen lassen. Es konnten auch keine Ähnlichkeiten zu bekannten Sequenzen von annotierten Transposons aus *D. melanogaster* gefunden werden. Auf jeden Fall sollte untersucht werden, ob der konservierte Sequenzabschnitt für die Regulation von Bedeutung ist. Zusätzlich bietet sich dieser Bereich, neben der codierenden Sequenz als zweiter Ausgangspunkt für eine Amplifikation der regulatorischen Region mittels PCR aus verschiedenen Spezies an. So könnten die 5'- flankierenden Regionen von *Tc'h* mit z.B. *hairy* aus *Tribolium confusum*, *Tribolium freemanii* und weiter entfernten Arten miteinander verglichen werden, wie dies zwischen *Dm'h* und *Dv'h* durchgeführt wurde (Langeland und Carroll, 1993). Dies würde erlauben, Bereiche, die Selektionsdruck ausgesetzt sind, von nicht- konservierten Bereichen zu unterscheiden und damit funktional wichtige Regionen zu identifizieren, welche wiederum Aufschluss über die Regulation geben können.

Der Sequenzvergleich der regulatorischen Regionen zwischen den Spezies *D. melanogaster*, *D. virilis* und *T. castaneum* ergab keine Hinweise auf konservierte Elemente. Es stellt sich zwangsläufig die Frage, wenn man davon ausgeht, dass die Regulation von Paarregelgenen nicht mehrmals unabhängig voneinander entstanden ist, warum die Analyse der *cis*- regulatorischen Sequenz, trotz gleicher an der Regulation beteiligter Transkriptionsfaktoren, keine signifikant homologen Bereiche ergab. Die Hypothese der stabilisierenden Selektion bietet, wie in Versuchen mit dem spezifischen Element für den *eve* Streifen zwei gezeigt wurde, einen hervorragenden Erklärungsansatz für diesen Befund: Die regulatorische Region des *eve* Streifens zwei

konnte aufgrund konservierter Sequenzabschnitte im 5' und im 3' Bereich aus mehreren Spezies von *Drosophila* durch PCR amplifiziert und kloniert werden. Diese Regionen, aus vier verschiedenen Spezies, *D. melanogaster*, *D. yakuba*, *D. erecta* und *D. pseudoobscura*, exprimierten in jungen, transformierten Embryonen von *D. melanogaster* ein Reporter-gen zeitlich und räumlich übereinstimmend mit dem endogenen *eve*- Streifen zwei (Ludwig et al., 1998). Das war umso erstaunlicher, da einzelne Elemente, wie z.B. eine bestimmte *bcd* Bindungsstelle, deren Verlust in einer wesentlich schwächeren Expression des *eve*- Streifen zwei in *D. melanogaster* resultiert (Small et al., 1992), nicht in der *cis*- regulatorischen Region von *D. yakuba*, *D. erecta* und *D. pseudoobscura* vorhanden war (Ludwig et al., 1998). In weiteren Experimenten wurden "chimärische" regulatorische Regionen getestet. Dazu wurden die Enhancer für den *eve* Streifen zwei aus den Spezies *D. melanogaster* und *D. pseudoobscura* in einem konservierten Block, der sich in etwa in der Mitte der regulatorischen Region befindet, in zwei Teile getrennt und die beiden komplementären Abschnitte miteinander kombiniert. Die durch die "chimärischen" Streifenelemente erzeugten Expressionsdomänen unterschieden sich von dem endogenen Streifen durch ihre Position und sind auch teilweise expandiert (Ludwig et al., 2000). Dieses auf den ersten Blick verwunderliche Ergebnis kann durch stabilisierende Selektion erklärt werden. Das bedeutet, dass eine fast neutrale Mutation in der regulatorischen Region durch eine weitere Mutation an einer anderen Stelle kompensiert werden kann. Über die Zeit sammeln sich viele solcher Mutationen an und führen zu immer stärkeren Unterschieden auf der Sequenzebene, während sich die Expression der Domäne nicht verändert. Dies erklärt das konservierte Expressionsmuster des *eve* Streifen zwei, trotz vieler Sequenzunterschiede und den Mutation wichtiger Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren, und Veränderung des Musters durch zusammengesetzte Enhancer (Ludwig et al., 2000; Ludwig et al., 1998).

Bei einer größeren phylogenetischen Distanz zwischen den untersuchten Spezies, wie sie zwischen Fliegen und Käfern zweifelsfrei vorliegt, sind natürlich stärkere Sequenzunterschiede zu erwarten. Trotzdem können die gleichen Gene an der Regulation beteiligt sein.

Die starken Sequenzunterschiede zwischen *Dm* *h* und *Dv* *h* im Vergleich mit *Tc* *h* sind sicher auch der Hauptgrund für den vergeblichen Versuch ein Modell am

Computer zu entwerfen, bei welchem innerhalb eines kurzen Abschnitts zwei Transkriptionsfaktoren mehrfach an die regulatorische Region von *Tc'h*, *Dv'h* und *Dm'h* binden. Das entworfene Modell 1 zeigt eine relativ geringe Spezifität und bei einem durchschnittlichen Auftreten des Motivs alle 100 000 Basen war ein definiertes Expressionsmuster zwar möglich, aber nicht zwingend erwartet worden. Dennoch liegt der Bereich, in dem die Transkriptionsfaktoren laut Vorhersage an die *cis*-regulatorische Region von *Tc'h* binden können, in selben Sequenzabschnitt, der experimentell als verantwortliche Region für die Expression der Streifen drei, vier und fünf von *Tc'h* ermittelt wurde.

Abschließend lässt sich sagen, dass die mit Hilfe des Computers getroffenen Vorhersagen neue Ansatzpunkte für Experimente bieten. Es wäre auf jeden Fall interessant, die *cis*-regulatorische Region der Streifen drei, vier und fünf von *Tc'h* weiter zu untersuchen.

In dieser Arbeit konnte ich zeigen, dass die *cis*-regulatorische Region von *Tc'h* in zwei Bereiche unterteilt werden kann und dass die Regulation der Streifen drei, vier und fünf zwischen *Dm'h* und *Tc'h* konserviert ist. Ferner konnten durch Analyse der 5'-flankierenden Sequenz von *Tc'h* mit dem Computer wahrscheinlich funktionale Regionen identifiziert werden.

6. Material und Methoden

6.1 Molekularbiologische Methoden

Im Wesentlichen wurde nach Standardmethoden verfahren. Die Protokolle und benutzten Puffer sind in (Sambrook et al., 1989) beschrieben. Die benutzten Kits wurden gemäß den Angaben der Hersteller verwendet.

Sequenzierung und Sequenzvergleich

Sequenziert wurde mit einem ABI 377 (Applied Biosystems) Sequenzer. Die Elektropherogramme wurden mit dem Programm Sequence Navigator Version 1.0.1 (Perkin Elmer) analysiert. Die Sequenzvergleiche wurden mit den Programmen Sequence Navigator Version 1.0.1 (Perkin Elmer) und GeneJockey II (Taylor, 1998) durchgeführt.

PCR

Bei der Amplifikation von DNA- Fragmenten aus Plasmiden wurden hauptsächlich folgende Konzentrationen verwendet: ca. 1 ng Template DNA, 0,2 mM dNTP Mix, je 1 mM Primer, 0,5 U Taq Polymerase in 1x PCR-Puffer (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, pH8.3, 1,5 mM MgCl₂). Bei regulatorischen Fragmenten wurde, um die Fehlerquote zu verringern, mit dem ExpandTM High Fidelity PCR System von Roche gearbeitet. Die Reaktionen wurden nach folgendem Programm durchgeführt: Nach einem ersten Denaturierungsschritt von 2 min bei 94°C, 25-30 Zyklen mit 1-2 min 94°C, 30-60s Annealing der Primer (Temperatur war abhängig von Länge, Basenzusammensetzung und Fehlpaarungen) und 1-5 min Elongation in Abhängigkeit von der Länge des Fragments bei 72°C (ExpandTM Polymerase: 68°C bei mehr als 3 kb). Abschließend wurde die Enden für 7 min bei 72°C aufgefüllt. Die zu klonierenden Fragmente wurden durch Agarose- Gelelektrophorese gereinigt.

Herstellung der Konstrukte

Transformationsvektoren

Als Transformationsvektoren wurden die Vektoren pB3xP3-EGFPaf und pB3xP3-EGFPafm verwendet. Beide basieren auf dem *piggyBac*- Transposon und enthalten einen universellen Augenmarker (Berghammer et al., 1999b). Der Transformationsvektor pB3xP3-EGFPafm unterscheidet sich von pB3xP3-EGFPaf in einer 0,6 kb großen Deletion, welche im für die Transposase kodierenden Bereich vorgenommen wurde (Horn und Wimmer, 2000).

Die verschiedenen Reporterkonstrukte wurden in anderen Vektoren zusammengesetzt, dann mit geeigneten Restriktionsenzymen verdaut und als Kasette in einen der beiden Transformationsvektoren in eine singuläre Restriktionsschnittstelle inseriert.

plcZSV40

Dieser Vektor wurde als Klonierungsvektor bzw. Shuttlevektor für einen Teil der Konstrukte verwendet.

Aus dem Vektor pEGFP-hsp70 (pEGFP (Clontech) mit hsp70 Terminator) wurde eGFP mit den Restriktionsenzymen NcoI und NotI ausgeschnitten und durch *lacZ* und SV40 3'UTR ersetzt. Dafür wurde mittels PCR *lacZ* und SV40 3'UTR aus pCasper-AUG-βGal (Thummel et al., 1988) amplifiziert und eine NcoI- Schnittstelle am Startcodon, eine NsiI- und eine NotI- Schnittstelle 3' des SV40 3'UTR eingeführt.

plcZSV40- *Tc'h*-NcoINcoI1.5

Aus der genomischen Region von *Tc'h* wurde mittels PCR ein 1,5 kb Fragment amplifiziert, das ausgehend vom ATG 1,5 kb 5'-flankierende Bereiche enthielt, welches den Basen 7257-8769 der übermittelten Sequenz von *Tc'h* (Zugangsnummer: AJ457831) entspricht. Hierbei wurde am Startcodon eine NcoI- Schnittstelle (AGATGG -> CCATGG) eingeführt. Dieses NcoINcoI- Fragment wurde in die NcoI- Schnittstelle des Vektors plcZSV40 gesetzt. Die richtige Orientierung wurde durch Ansequenzieren überprüft. Das Plasmid wurde mit SfbI und NsiI verdaut und das

Reporterkonstrukt in eine singuläre PstI- Schnittstelle in den Transformationsvektor pB3xP3-EGFPafm inseriert.

plcZSV40- *Tc* *h*-XhoINcoI8.8

Eine singuläre BspEI Schnittstelle in dem NcoINcoI- Fragment und eine KpnI- Schnittstelle in der Multiple Cloning Site wurden verwendet, um die 1,5 kb genomische Region auf 8,8 kb (1-8769) zu verlängern. Dazu wurde pBst-hTc-X11.0 Nr. 17 (11 kb XhoI- Fragment eines genomischen *Tc* *h* Klons in pBst (Stratagene) subkloniert (Wolff, 1997)) mit BspEI und KpnI verdaut. Das etwas mehr als 8 kb große Fragment wurde in den mit BspEI und KpnI geschnittenen Vektor plcZSV40- *Tc* *h*-NcoINcoI1.5 inseriert.

Das Plasmid wurde mit SfbI und NsiI verdaut und das Reporterkonstrukt in eine singuläre PstI- Schnittstelle in den Vektor pB3xP3-EGFPaf inseriert.

plcZSV40- *Tc* *h*-NruINcoI4.9

Das Plasmid plcZSV40- *Tc* *h*-XhoINcoI8.8 wurde mit SmaI und NruI verdaut, um 3,9 kb der am weitesten 3' gelegenen Region auszuschneiden und religiert um das Plasmid plcZSV40- *Tc* *h*-NruINcoI4.9 (3872-8769) zu erhalten.

Das Plasmid wurde mit SfbI und NsiI verdaut und das Reporterkonstrukt in eine singuläre PstI- Schnittstelle in den Vektor pB3xP3-EGFPafm inseriert.

plcZSV40- *Tc* *h*-BamHINcoI3.1

Aus plcZSV40- *Tc* *h*-XhoINcoI8.8 wurde durch einen Restriktionsverdau mit BamHI ein 5,7 kb großes Fragment deletiert und das Plasmid religiert. Die 5'- flankierende Region enthält die Basen 5694-8769 der übermittelten Region.

Das Plasmid wurde mit SfbI und NsiI verdaut und das Reporterkonstrukt in eine singuläre PstI- Schnittstelle in den Transformationsvektor pB3xP3-EGFPaf inseriert.

pIcZSV40- *Tc^r*-BamHINcoI3.1-MluIXhoI2.9

Aus dem Plasmid pIcZSV40- *Tc^r*-BamHINcoI3.1 wurde mit den Restriktionsenzymen MluI und SpeI das 3' Ende von *lacZ* und der SV40 3'UTR ausgeschnitten und durch ein ebenfalls mit MluI und SpeI geschnittenes 2,8 kb Fragment (8855-11649) aus pBst-hTc-X11.0 Nr. 1 (umgekehrte Orientierung in pBst zu pBst-hTc-X11.0 Nr. 17; siehe oben und (Wolff, 1997)) ersetzt. Die Region enthält Exon1 teilweise, Exon 2 und 3, beide Introns, 3'UTR und 3'gelegene Bereiche.

Das Plasmid wurde mit SfbI und NsiI verdaut und das Reporterkonstrukt in eine singuläre PstI- Schnittstelle in den Vektor pB3xP3-EGFPaf inseriert.

pSLfaHABfa- *Tc^r*-BamHISacI1.8

Mit den Restriktionsenzymen BamHI und SacI wurde aus dem Plasmid pIcZSV40- *Tc^r*-BamHINcoI3.1 ein 1,8 kb großes Fragment (5694-7537) ausgeschnitten und der Überhang der SacI Schnittstelle aufgefüllt. Dieses Fragment wurde in den Polylinker pSLfaHABfa (von Frank Pogoda und Ernst Wimmer freundlicherweise zur Verfügung gestellt; 4,4 kb HindIII und XhoI Fragment aus pCaSpeR-hs43-*lacZ* mit hs43 5'UTR, AUG- β gal-SV40 (Zugangsnummer: X81643) in HindIII/XhoI von pSLfa1180fa (Horn und Wimmer, 2000)) zwischen BamHI und XhoI (aufgefüllt) eingesetzt. Die Region wurde mit dem Restriktionsenzym AscI ausgeschnitten und in die AscI- Schnittstelle des Transformationsvektor pB3xP3-EGFPafm gesetzt.

pSLfaHABfa- *Tc^r*-BamHIEcoRV1.1

Ein 1,1 kb großes Fragment wurde mit BamHI und EcoRV (5694- 6806) aus pIcZSV40- *Tc^r*-BamHINcoI3.1 ausgeschnitten und in den Polylinker von pSLfaHABfa zwischen BamHI und XhoI (aufgefüllt) kloniert. Von dort wurde das Fragment mit AscI ausgeschnitten und in pB3xP3-EGFPafm inseriert.

pSLfaHABfa- *Tc* *h*-BamHIBglII0.8

Aus dem Plasmid plcZSV40- *Tc* *h*-BamHINcoI3.1 wurde mit BamHI und BglII ein 0,8 kb große Region (5694-6468) ausgeschnitten und die BglII- Schnittstelle aufgefüllt. Das Fragment wurde in den Polylinker von pSLfaHABfa zwischen BamHI und XhoI (aufgefüllt) eingesetzt. Das Reporterkonstrukt wurde mit dem Restriktionsenzym AscI ausgeschnitten und in pB3xP3-EGFPafm gesetzt.

pSLfaHABfa- *Tc* *h*-Modell 1

Aus pBst-hTc-X11.0 Nr. 1 wurde mit den Primern TTGTTTTTCAGTTTTTCAGA und TTTGTGAATTTGCACTCA 158 bp (6448- 6605) amplifiziert, eventuell überhängende Enden mit Klenow- Enzym aufgefüllt und in pSLfaHABfa in eine XhoI Schnittstelle (aufgefüllt) kloniert. Das Fragment wurde mit AscI ausgeschnitten und in pB3xP3-EGFPafm inseriert.

Dm hairy XhoI-XbaI 14 kb

Der Vektor pSLfa1180fa-eGFP-SV40 wurde generiert, indem zuerst die Klonierungsregion von pSLfa1180fa KpnI und MluI geschnitten wurde. Dort wurde ein aus pB3xP3-EGFPafm mit KpnI und MluI ausgeschnittenes Fragment, das eGFP mit SV40 3'UTR enthält, eingesetzt. In diesen Vektor pSLfa1180fa-eGFP-SV40 wurde eine 14 kb große Region (ein Plasmid mit dieser Region wurde mir freundlicherweise von M. Pankratz zur Verfügung gestellt), die alle für die Expression der sieben Paarregelstreifen notwendigen Enhancerelemente enthält (Riddihough und Ish-Horowicz, 1991), kloniert. Diese Region wurde mit den Restriktionsenzymen XhoI und XbaI ausgeschnitten und in pSLfa1180fa-eGFP-SV40, der mit NheI und SalI geschnitten war (die Überhänge von XbaI und NheI, XhoI und SalI sind miteinander kompatibel), kloniert. Das Plasmid wurde mit AscI verdaut und das Reporterkonstrukt in den Vektor pB3xP3-EGFPafm in die singuläre AscI-Schnittstelle gesetzt.

Dm hairy #6

Das 528bp lange Element, das in *Drosophila melanogaster* für die Expression des Streifen sechs verantwortlich ist (Hader et al., 1998; Howard und Struhl, 1990; Langeland et al., 1994), wurde mit *lacZ* und SV40 3'UTR aus pCaSpeR-*hs43* von Ernst Wimmer ausgeschnitten, in pSLfa1180fa zwischenkloniert und als AscI-Fragment in den Transformationsvektor pB3xP3-EGFPaf eingefügt (persönliche Mitteilung von Ernst Wimmer).

Dm hairy #7

Ein knapp 1 kb großes Fragment, das ausreicht, um die Expression von Streifen sieben fast exakt zu regulieren –die Expressionsdomäne ist um eine Zellreihe in Richtung posteriorer Pol verschoben (La Rosee et al., 1997)– und in pCaSpeR-*hs43* kloniert war (La Rosee et al., 1997), wurde von Ernst Wimmer mit *lacZ* und SV40 3'UTR in pSLfa1180fa kloniert. Von dort wurde das Fragment mit dem Restriktionsenzym AscI ausgeschnitten und in die singuläre AscI- Schnittstelle in pB3xP3-EGFPaf eingesetzt (persönliche Mitteilung von Ernst Wimmer).

Dm hairy #6+7

Die beiden oben genannten streifenspezifischen Elemente, die durch eine kurze Vektorsequenz getrennt sind und in der gleichen Orientierung zueinanderliegen, die sie auch in *hairy* besitzen, wurden zusammen mit *lacZ* und SV40 3'UTR von Ernst Wimmer aus einem pCaSpeR-*hs43*- Derivat ausgeschnitten und in pSLfa1180fa eingesetzt. Von dort wurde es in pB3xP3-EGFPaf umkloniert (persönliche Mitteilung von Ernst Wimmer).

pSL1180fa-her1-eGFP-hsp70

Aus phsREM1-her1/eGFP-KN15 (von Christian Wolff: in pEGFP (Clontech) wurde ein 11kb großes NcoI-NcoI- Fragment in die NcoI- Schnittstelle am Translationsstart

des eGFP (in der richtigen Orientierung) eingesetzt. Aus diesem Plasmid wurden mit PstI und EcoRI 9,6 kb genomische Region, fusioniert mit eGFP, in phsREM1 (Knipple und Marsella-Herrick, 1988) eingesetzt. Mit einem 5 kb großen genomischen KpnI-PstI- Fragment wurde die gesamte genomische Region auf ca. 15 kb erweitert) wurde ein 12,5 kb langes Fragment mit den Restriktionsenzymen AgeI und SacI ausgeschnitten. Das Fragment besteht aus 11379 bp genomischer Region von *her1* (bis zum ATG; Zugangsnummer AF292032 (korrespondiert zu den Basen 2833-14219), keine für *her1* oder *her7* codierende Sequenzen), welche mit eGFP über eine NcoI- Schnittstelle fusioniert wurde, und einem hsp70 Terminator. Dieses Fragment wurde in einen mit AgeI und SacI verdauten pSLfa1180fa (Horn und Wimmer, 2000) eingesetzt. Von dort wurde das Reporterkonstrukt mit AscI ausgeschnitten und in den Transformationsvektor pB3xP3-EGFPafm inseriert.

6.2 Genetische und embryologische Methoden

Bei den Experimenten mit Fliegen wurden hauptsächlich die bei (Ashburner, 1989) beschriebenen Standardtechniken verwendet.

Die Haltung und Zucht der Käfer wurde in (Berghammer et al., 1999a) beschrieben.

Eiablagen und Fixierung

Fliegen wurden bei Raumtemperatur in Käfigen auf mit Hefe bestrichenen Apfelsaftagarplatten gehalten. Die Apfelsaftagarplatten wurden nach 3-6 Stunden ausgetauscht. Von den Platten wurden die Embryonen in ein Sieb transferiert, mit Wasser gewaschen und mit Klorix (Hypochlorid) dechorioniert.

Käfer wurden auf feines weißes Mehl (supplementiert mit Hefe und Fumidil) gesetzt und nach 6-36h bei 25°C abgeseiht. Die Eier wurden in ein Sieb überführt, mit Wasser und zweimal für 2min mit Klorix gewaschen bzw. dechorioniert.

Die Eier wurden wiederum mit Wasser gewaschen und für 20min (Fliegen) bzw. 40min (Käfer) in 5ml Heptan, 3ml PEMS (0,1 M Pipes, 2mM MgSO₄, 1mM EDTA, pH 6,9) und 375 ml Formaldehyd (37%) geschüttelt.

Um die Eier durch osmotischen Schock zu devitellinisieren, wurde die wässrige Phase abgenommen, 8ml Methanol zugegeben und sofort kräftig geschüttelt. Die abgesunkenen Embryonen wurden in Eppendorf- Gefäße überführt. Die nicht abgesunkenen Käfer- Embryonen (mehrheitlich Keimstreifen) wurden durch eine Kanüle gezogen und dann überführt. Dieser Schritt wurde bei Bedarf auch mehrmals wiederholt.

Die Embryonen wurden drei- bis viermal mit Methanol gewaschen und bei -20°C aufbewahrt.

Kutikulapräparationen

Um *Drosophila*- Stämme auf die gewünschten Mutationen zu überprüfen, wurden die Kutikulae, modifiziert nach (van der Meer, 1977) und (Ashburner, 1989) präpariert. 36-50h alte Gelege mit Wasser gewaschen, mit Hypochlorid dechorioniert, in Hoyers/Milchsäure (1:1) eingebettet und ün bei 65°C geklärt. Die Kutikulae wurden im Phasenkontrast auf die Phänotypen untersucht.

Verwendete Mutanten

Folgende Stämme mit Segmentierungsdefekten wurden verwendet:

Krüppel	Dp(1;2)B98/CyO	(Klingler und Gergen, 1993)
Giant	gt^{ya}/ FM7, B	(Petschek et al., 1987)
Knirps	kni[FC13] e / TM3, Ser e	(Nauber et al., 1988)
Hunchback	Df(3R) pxt[104] ru st e ca / TM3	(Lindsley und Zimm, 1992)
Even-skipped	Df(2R)eve[1.27]/CyO	(Carroll und Scott, 1986)
Runt	yw^{67c23f} runt^{LB5}/FM7h	(Gergen und Wieschaus, 1986)

Balancer- Chromosomen und Markermutationen sind in (Lindsley und Zimm, 1992) beschrieben.

in situ Hybridisierung

Die *in situ* Hybridisierung an ganzen Embryonen mit markierten RNA-Sonden wurde nach den Protokollen von (Tautz und Pfeifle, 1989) und (Klingler und Gergen, 1993) mit leichten Modifikationen durchgeführt. Die Sonden wurden in einer *in vitro* Transkription mit Labeling-Kits von Roche hergestellt. Die Sonden wurden mit DNase I (0,5 Units, 15min 37°C) verdaut und anschließend wurde die DNase mit 1/10 vol 0,5M EGTA für 15min bei 65°C inaktiviert. Die Sonde wurde entweder in Gegenwart von 1 µg Hefe tRNA, 0,5 Volumen 7,8 M Ammoniumacetat und 3 Volumen Ethanol gefällt oder über Ultrafree-MC Säulen (100 000 NMWL, Millipore) aufgereinigt.

Bei Doppel-*in-situ* Hybridisierungen wurden mit zwei verschiedenen Nukleotiden (DIG bzw. Fluorescein) markierte Sonden gleichzeitig eingesetzt. Dabei wurde das Protokoll von (Hauptmann und Gerster, 1994) modifiziert. Zusätzlich wurde das Signal einer der beiden Sonden durch einen weiteren Amplifizierungsschritt mit Biotinyl- Tyramid (NEN Life Science Products) verstärkt (Prpic et al., 2001; Wolff et al., 1998). Bei Doppelfärbungen mit schwachen Signalen, wurde, um Färbeartefakte zu vermeiden, zuerst die AP-Färbung durchgeführt, bevor die Biotinyl- Tyramid-Reaktion in Gang gesetzt wurde.

Transformation von *yw*-Fliegen

Transgene Fliegen wurden durch Mikroinjektion generiert. Dabei wurde die Injektionslösung (20% Phenolrot, 500 ng/µl *piggyBac*-Vektor mit den verschiedenen Reporterkonstrukten und 375 ng/µl Helferplasmid pBachsp in H₂O) in den posterioren Pol der präblastodermalen Embryonen unter Voltalef-Öl injiziert. Die adulten Fliegen wurden mit *yw*-Fliegen rückgekreuzt. Die Nachkommen dieser Generation wurden auf den Transformationsmarker überprüft.

Das verwendete Injektionsprotokoll ist im wesentlichen in (Rubin und Spradling, 1982) beschrieben.

Transformation von *pearl* Käfern

In präblastodermale Embryonen wurde die gleichen Injektionslösung, wie in die Fliegen, injiziert.

0-4 Stunden alte Eier (bei 25°C) wurden abgeseibt und in einer in einer schwachen Hypochloridlösung gewaschen. Die Embryonen wurden mit dem posterioren Pol nach außen auf Deckgläsern aufgereiht und mit der oben beschriebenen Lösung mikroinjiziert. Die aufgereihten Embryonen wurden auf Apfelsaftagarplatten bei abnehmender Luftfeuchtigkeit bei 33°C bis zum Schlüpfen gehalten und dann auf Vollkornmehl gesetzt. Die Puppen wurden nach Geschlecht getrennt und die Imagines in Einzelkreuzungen mit *pearl* Käfern rückgekreuzt. Die Nachkommen wurden unter dem Fluoreszenzbinokular auf den Transformationsmarker untersucht (Lorenzen et al., 2003).

Bildverarbeitung

Photos wurden in Adobe Photoshop importiert. Dort wurden Helligkeit und Kontrast angepasst und die Größe der Embryonen justiert. Zusätzlich wurden störende Hintergrundsignale entfernt. Beschriftet wurden die Bilder mit dem Programm Adobe Illustrator mit dem auch die Graphiken erstellt wurden.

7. Literatur

- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. und Lipman, D. J.** (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* **25**, 3389-402.
- Andrioli, L. P., Vasisht, V., Theodosopoulou, E., Oberstein, A. und Small, S.** (2002). Anterior repression of a *Drosophila* stripe enhancer requires three position-specific mechanisms. *Development* **129**, 4931-40.
- Ashburner, M.** (1989). *Drosophila*. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Awgulewitsch, A. und Jacobs, D.** (1992). *Deformed* autoregulatory element from *Drosophila* functions in a conserved manner in transgenic mice. *Nature* **358**, 341-344.
- Bate, M. und Martinez Arias, A.** (1993). *The Development of Drosophila melanogaster*. Plainview, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Berghammer, A., Bucher, G., Maderspacher, F. und Klingler, M.** (1999a). A system to efficiently maintain embryonic lethal mutations in the flour beetle *Tribolium castaneum*. *Dev Genes Evol* **209**, 382-9.
- Berghammer, A. J., Klingler, M. und Wimmer, E. A.** (1999b). A universal marker for transgenic insects. *Nature* **402**, 370-1.
- Bergman, C. M. und Kreitman, M.** (2001). Analysis of conserved noncoding DNA in *Drosophila* reveals similar constraints in intergenic and intronic sequences. *Genome Res* **11**, 1335-45.
- Berman, B. P., Nibu, Y., Pfeiffer, B. D., Tomancak, P., Celniker, S. E., Levine, M., Rubin, G. M. und Eisen, M. B.** (2002). Exploiting transcription factor binding site clustering to identify cis-regulatory modules involved in pattern formation in the *Drosophila* genome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 757-62.
- Brown, S. und Denell, R.** (1996). Segmentation and dorsoventral patterning in *Tribolium*. *seminars in cell and developmental biology* **7**, 553-560.
- Brown, S., Fellers, J., Shippy, T., Denell, R., Stauber, M. und Schmidt-Ott, U.** (2001). A strategy for mapping bicoid on the phylogenetic tree. *Curr Biol* **11**, R43-4.
- Brown, S. J., Hilgenfeld, R. B. und Denell, R. E.** (1994a). The beetle *Tribolium castaneum* has a fushi tarazu homolog expressed in stripes during segmentation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 12922-6.
- Brown, S. J., Parrish, J. K., Beeman, R. W. und Denell, R. E.** (1997). Molecular characterization and embryonic expression of the even-skipped ortholog of *Tribolium castaneum*. *Mech Dev* **61**, 165-73.
- Brown, S. J., Patel, N. H. und Denell, R. E.** (1994b). Embryonic expression of the single *Tribolium* engrailed homolog. *Dev Genet* **15**, 7-18.
- Bucher, G.** (2002). *The Evolution of Gap Gene Orthologues*. In *Fakultät für Biologie*, (ed. München: Ludwig-Maximilians-Universität).
- Carroll, S. B., Laughon, A. und Thalley, B. S.** (1988). Expression, function, and regulation of the hairy segmentation protein in the *Drosophila* embryo. *Genes Dev* **2**, 883-90.
- Carroll, S. B. und Scott, M. P.** (1986). Zygotically active genes that affect the spatial expression of the fushi tarazu segmentation gene during early *Drosophila* embryogenesis. *Cell* **45**, 113-26.
- Carroll, S. B. und Vavra, S. H.** (1989). The zygotic control of *Drosophila* pair-rule gene expression. II. Spatial repression by gap and pair-rule gene products. *Development* **107**, 673-83.

- Cary, L. C., Goebel, M., Corsaro, B. G., Wang, H. G., Rosen, E. und Fraser, M. J.** (1989). Transposon mutagenesis of baculoviruses: analysis of *Trichoplusia ni* transposon IFP2 insertions within the FP-locus of nuclear polyhedrosis viruses. *Virology* **172**, 156-69.
- Casali, A. und Casanova, J.** (2001). The spatial control of Torso RTK activation: a C-terminal fragment of the Trunk protein acts as a signal for Torso receptor in the *Drosophila* embryo. *Development* **128**, 1709-15.
- Damen, W. G.** (2002a). *fushi tarazu*: a Hox gene changes its role. *BioEssays* **24**, 992-995.
- Damen, W. G.** (2002b). Parasegmental organization of the spider embryo implies that the parasegment is an evolutionary conserved entity in arthropod embryogenesis. *Development* **129**, 1239-50.
- Damen, W. G., Weller, M. und Tautz, D.** (2000). Expression patterns of hairy, even-skipped, and runt in the spider *Cupiennius salei* imply that these genes were segmentation genes in a basal arthropod. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 4515-9.
- Davis, G. K., Jaramillo, C. A. und Patel, N. H.** (2001). Pax group III genes and the evolution of insect pair-rule patterning. *Development* **128**, 3445-58.
- Davis, G. K. und Patel, N. H.** (1999). The origin and evolution of segmentation. *Trends Cell Biol* **9**, M68-72.
- Davis, G. K. und Patel, N. H.** (2002). Short, long, and beyond: molecular and embryological approaches to insect segmentation. *Annu Rev Entomol* **47**, 669-99.
- Dearden, P. K., Donly, C. und Grbic, M.** (2002). Expression of pair-rule gene homologues in a chelicerate: early patterning of the two-spotted spider mite *Tetranychus urticae*. *Development* **129**, 5461-72.
- DiNardo, S., Heemskerk, J., Dougan, S. und O'Farrell, P. H.** (1994). The making of a maggot: patterning the *Drosophila* embryonic epidermis. *Curr Opin Genet Dev* **4**, 529-34.
- Draper, B. W., Mello, C. C., Bowerman, B., Hardin, J. und Priess, J. R.** (1996). MEX-3 is a KH domain protein that regulates blastomere identity in early *C. elegans* embryos. *Cell* **87**, 205-16.
- Driever, W., Thoma, G. und Nüsslein-Volhard, C.** (1989). Determination of spatial domains of zygotic gene expression in the *Drosophila* embryo by the affinity of binding sites for the bicoid morphogen. *Nature* **340**, 363-7.
- Gao, Q. und Finkelstein, R.** (1998). Targeting gene expression to the head: the *Drosophila* orthodenticle gene is a direct target of the Bicoid morphogen. *Development* **125**, 4185-93.
- Gergen, J. P. und Wieschaus, E.** (1986). Dosage requirements for runt in the segmentation of *Drosophila* embryos. *Cell* **45**, 289-99.
- Greenwood, S. und Struhl, G.** (1997). Different levels of Ras activity can specify distinct transcriptional and morphological consequences in early *Drosophila* embryos. *Development* **124**, 4879-86.
- Hader, T., La Rosee, A., Zibold, U., Busch, M., Taubert, H., Jäckle, H. und Rivera-Pomar, R.** (1998). Activation of posterior pair-rule stripe expression in response to maternal caudal and zygotic knirps activities. *Mech Dev* **71**, 177-86.
- Handel, K., Grunfelder, C. G., Roth, S. und Sander, K.** (2000). *Tribolium* embryogenesis: a SEM study of cell shapes and movements from blastoderm to serosal closure. *Dev Genes Evol* **210**, 167-79.
- Hartmann, C., Taubert, H., Jäckle, H. und Pankratz, M. J.** (1994). A two-step mode of stripe formation in the *Drosophila* blastoderm requires interactions among primary pair rule genes. *Mech Dev* **45**, 3-13.

- Hauptmann, G. und Gerster, T.** (1994). Two-color whole-mount in situ hybridization to vertebrate and *Drosophila* embryos. *Trends Genet* **10**, 266.
- Henry, C. A., Urban, M. K., Dill, K. K., Merlie, J. P., Page, M. F., Kimmel, C. B. und Amacher, S. L.** (2002). Two linked hairy/Enhancer of split-related zebrafish genes, *her1* and *her7*, function together to refine alternating somite boundaries. *Development* **129**, 3693-704.
- Holley, S. A., Geisler, R. und Nüsslein-Volhard, C.** (2000). Control of *her1* expression during zebrafish somitogenesis by a delta-dependent oscillator and an independent wave-front activity. *Genes Dev* **14**, 1678-90.
- Hombria, J. C. und Brown, S.** (2002). The fertile field of *Drosophila* Jak/STAT signalling. *Curr Biol* **12**, R569-75.
- Hooper, K. L., Parkhurst, S. M. und Ish-Horowicz, D.** (1989). Spatial control of hairy protein expression during embryogenesis. *Development* **107**, 489-504.
- Horn, C. und Wimmer, E. A.** (2000). A versatile vector set for animal transgenesis. *Dev Genes Evol* **210**, 630-7.
- Howard, K., Ingham, P. und Rushlow, C.** (1988). Region-specific alleles of the *Drosophila* segmentation gene hairy. *Genes Dev* **2**, 1037-46.
- Howard, K. R. und Struhl, G.** (1990). Decoding positional information: regulation of the pair-rule gene hairy. *Development* **110**, 1223-31.
- Ingham, P. und Gergen, P.** (1988). Interactions between the pair-rule genes *runt*, *hairy*, *even-skipped* and *fushi tarazu* and the establishment of periodic pattern in the *Drosophila* embryo. *Development Supplement* **104**, 51-60.
- Jiang, Y. J., Aerne, B. L., Smithers, L., Haddon, C., Ish-Horowicz, D. und Lewis, J.** (2000). Notch signalling and the synchronization of the somite segmentation clock. *Nature* **408**, 475-9.
- Klingler, M. und Gergen, J. P.** (1993). Regulation of *runt* transcription by *Drosophila* segmentation genes. *Mech Dev* **43**, 3-19.
- Knipple, D. C. und Marsella-Herrick, P.** (1988). Versatile plasmid vectors for the construction, analysis and heat-inducible expression of hybrid genes in eukaryotic cells. *Nucleic Acids Res* **16**, 7748.
- La Rosee, A., Hader, T., Taubert, H., Rivera-Pomar, R. und Jäckle, H.** (1997). Mechanism and Bicoid-dependent control of hairy stripe 7 expression in the posterior region of the *Drosophila* embryo. *Embo J* **16**, 4403-11.
- La Rosee-Borggreve, A., Hader, T., Wainwright, D., Sauer, F. und Jäckle, H.** (1999). hairy stripe 7 element mediates activation and repression in response to different domains and levels of Kruppel in the *Drosophila* embryo. *Mech Dev* **89**, 133-40.
- Langeland, J. A., Attai, S. F., Vorwerk, K. und Carroll, S. B.** (1994). Positioning adjacent pair-rule stripes in the posterior *Drosophila* embryo. *Development* **120**, 2945-55.
- Langeland, J. A. und Carroll, S. B.** (1993). Conservation of regulatory elements controlling hairy pair-rule stripe formation. *Development* **117**, 585-96.
- Lardelli, M. und Ish-Horowicz, D.** (1993). *Drosophila* hairy pair-rule gene regulates embryonic patterning outside its apparent stripe domains. *Development* **118**, 255-66.
- Lewis, E. B.** (1978). A gene complex controlling segmentation in *Drosophila*. *Nature* **276**, 565-70.
- Li, X. und Noll, M.** (1994). Evolution of distinct developmental functions of three *Drosophila* genes by acquisition of different cis-regulatory regions. *Nature* **367**, 83-7.
- Lindsley, D. L. und Zimm, G. G.** (1992). The genome of *Drosophila melanogaster*. San Diego: Academic Press.

- Lohr, U., Yussa, M. und Pick, L.** (2001). *Drosophila fushi tarazu*. a gene on the border of homeotic function. *Curr Biol* **11**, 1403-12.
- Lorenzen, M. D., Berghammer, A. J., Brown, S. J., Denell, R. E., Klingler, M. und Beeman, R. W.** (2003). *piggyBac*-mediated germline transformation in the beetle *Tribolium castaneum*. *Insect Molecular Biology, eingesandt*.
- Ludwig, M. Z., Bergman, C., Patel, N. H. und Kreitman, M.** (2000). Evidence for stabilizing selection in a eukaryotic enhancer element. *Nature* **403**, 564-7.
- Ludwig, M. Z., Patel, N. H. und Kreitman, M.** (1998). Functional analysis of eve stripe 2 enhancer evolution in *Drosophila*: rules governing conservation and change. *Development* **125**, 949-58.
- Maderspacher, F., Bucher, G. und Klingler, M.** (1998). Pair-rule and gap gene mutants in the flour beetle *Tribolium castaneum*. *Dev Genes Evol* **208**, 558-68.
- Malicki, J., Cianetti, L. C., Peschle, C. und McGinnis, W.** (1992). A human HOX4B regulatory element provides head-specific expression in *Drosophila* embryos. *Nature* **358**, 345-7.
- Muller, M., v Weizsacker, E. und Campos-Ortega, J. A.** (1996). Expression domains of a zebrafish homologue of the *Drosophila* pair-rule gene hairy correspond to primordia of alternating somites. *Development* **122**, 2071-8.
- Nagy, L. M. und Carroll, S.** (1994). Conservation of wingless patterning functions in the short-germ embryos of *Tribolium castaneum*. *Nature* **367**, 460-3.
- Nauber, U., Pankratz, M. J., Kienlin, A., Seifert, E., Klemm, U. und Jäckle, H.** (1988). Abdominal segmentation of the *Drosophila* embryo requires a hormone receptor-like protein encoded by the gap gene knirps. *Nature* **336**, 489-92.
- Nüsslein-Volhard, C. und Wieschaus, E.** (1980). Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature* **287**, 795-801.
- Palmeirim, I., Henrique, D., Ish-Horowicz, D. und Pourquie, O.** (1997). Avian hairy gene expression identifies a molecular clock linked to vertebrate segmentation and somitogenesis. *Cell* **91**, 639-48.
- Pankratz, M. und Jäckle, H.** (1993). In *The Development of Drosophila melanogaster*, vol. 1 (ed. M. Bate und A. Martinez Arias), pp. 467-516. N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Pankratz, M. J., Seifert, E., Gerwin, N., Billi, B., Nauber, U. und Jäckle, H.** (1990). Gradients of Kruppel and knirps gene products direct pair-rule gene stripe patterning in the posterior region of the *Drosophila* embryo. *Cell* **61**, 309-17.
- Paroush, Z., Wainwright, S. M. und Ish-Horowicz, D.** (1997). Torso signalling regulates terminal patterning in *Drosophila* by antagonising Groucho-mediated repression. *Development* **124**, 3827-34.
- Patel, N. H.** (1994). The evolution of arthropod segmentation: insights from comparisons of gene expression patterns. *Development Supplement*, 201-207.
- Patel, N. H., Ball, E. E. und Goodman, C. S.** (1992). Changing role of even-skipped during the evolution of insect pattern formation. *Nature* **357**, 339-42.
- Patel, N. H., Condrón, B. G. und Zinn, K.** (1994). Pair-rule expression patterns of even-skipped are found in both short- and long-germ beetles. *Nature* **367**, 429-34.
- Perrimon, N.** (1994). The genetic basis of patterned baldness in *Drosophila*. *Cell* **76**, 781-4.
- Petschek, J. P., Perrimon, N. und Mahowald, A. P.** (1987). Region-specific defects in l(1)giant embryos of *Drosophila melanogaster*. *Dev Biol* **119**, 175-89.
- Pourquie, O.** (2000). Vertebrate segmentation: is cycling the rule? *Curr Opin Cell Biol* **12**, 747-51.

- Prpic, N. M., Wigand, B., Damen, W. G. und Klingler, M.** (2001). Expression of dachshund in wild-type and Distal-less mutant *Tribolium* corroborates serial homologies in insect appendages. *Dev Genes Evol* **211**, 467-77.
- Pultz, M. A., Zimmerman, K. K., Alto, N. M., Kaeberlein, M., Lange, S. K., Pitt, J. N., Reeves, N. L. und Zehrung, D. L.** (2000). A genetic screen for zygotic embryonic lethal mutations affecting cuticular morphology in the wasp *Nasonia vitripennis*. *Genetics* **154**, 1213-29.
- Riddihough, G. und Ish-Horowicz, D.** (1991). Individual stripe regulatory elements in the *Drosophila* hairy promoter respond to maternal, gap, and pair-rule genes. *Genes Dev* **5**, 840-54.
- Rivera-Pomar, R. und Jäckle, H.** (1996). From gradients to stripes in *Drosophila* embryogenesis: filling in the gaps. *Trends Genet* **12**, 478-83.
- Rivera-Pomar, R., Lu, X., Perrimon, N., Taubert, H. und Jäckle, H.** (1995). Activation of posterior gap gene expression in the *Drosophila* blastoderm. *Nature* **376**, 253-6.
- Rubin, G. M. und Spradling, A. C.** (1982). Genetic transformation of *Drosophila* with transposable element vectors. *Science* **218**, 348-53.
- Rushlow, C. A., Hogan, A., Pinchin, S. M., Howe, K. M., Lardelli, M. und Ish-Horowicz, D.** (1989). The *Drosophila* hairy protein acts in both segmentation and bristle patterning and shows homology to N-myc. *Embo J* **8**, 3095-103.
- Sambrook, J., Maniatis, T. und Fritsch, E. F.** (1989). Molecular cloning : a laboratory manual. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Schröder, R.** (2003). The genes orthodenticle and hunchback substitute for bicoid in the beetle *Tribolium*. *Nature* **422**, 621-5.
- Schröder, R., Eckert, C., Wolff, C. und Tautz, D.** (2000). Conserved and divergent aspects of terminal patterning in the beetle *Tribolium castaneum*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 6591-6.
- Schröder, R., Jay, D. G. und Tautz, D.** (1999). Elimination of EVE protein by CALI in the short germ band insect *Tribolium* suggests a conserved pair-rule function for even skipped. *Mech Dev* **80**, 191-5.
- Schulz, C., Schröder, R., Hausdorf, B., Wolff, C. und Tautz, D.** (1998). A caudal homologue in the short germ band beetle *Tribolium* shows similarities to both, the *Drosophila* and the vertebrate caudal expression patterns. *Dev Genes Evol* **208**, 283-9.
- Small, S., Blair, A. und Levine, M.** (1992). Regulation of even-skipped stripe 2 in the *Drosophila* embryo. *Embo J* **11**, 4047-57.
- Sommer, R.** (1992). Vergleichende Analyse von Segmentierungsgenen bei Insekten. In *Fakultät für Biologie*, (ed. München: Ludwig-Maximilians-Universität.
- Sommer, R. J. und Tautz, D.** (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**, 448-50.
- St Johnston, D. und Nüsslein-Volhard, C.** (1992). The origin of pattern and polarity in the *Drosophila* embryo. *Cell* **68**, 201-19.
- Stanojevic, D., Small, S. und Levine, M.** (1991). Regulation of a segmentation stripe by overlapping activators and repressors in the *Drosophila* embryo. *Science* **254**, 1385-7.
- Stauber, M., Prell, A. und Schmidt-Ott, U.** (2002). A single Hox3 gene with composite bicoid and zerknüllt expression characteristics in non-Cyclorrhaphan flies. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 274-9.
- Stuart, J. J., Brown, S. J., Beeman, R. W. und Denell, R. E.** (1991). A deficiency of the homeotic complex of the beetle *Tribolium*. *Nature* **350**, 72-4.

- Sulston, I. A. und Anderson, K. V.** (1996). Embryonic patterning mutants of *Tribolium castaneum*. *Development* **122**, 805-14.
- Sulston, I. A. und Anderson, K. V.** (1998). Altered patterns of gene expression in *Tribolium* segmentation mutants. *Dev Genet* **23**, 56-64.
- Takke, C. und Campos-Ortega, J. A.** (1999). *her1*, a zebrafish pair-rule like gene, acts downstream of notch signalling to control somite development. *Development* **126**, 3005-14.
- Tautz, D., Friedrich, M. und Schröder, R.** (1994). Insect embryogenesis- what is ancestral and what is derived? *Development Supplement*, 193-199.
- Tautz, D. und Pfeifle, C.** (1989). A non-radioactive in situ hybridization method for the localization of specific RNAs in *Drosophila* embryos reveals translational control of the segmentation gene hunchback. *Chromosoma* **98**, 81-5.
- Tautz, D. und Sommer, R. J.** (1995). Evolution of segmentation genes in insects. *Trends Genet* **11**, 23-7.
- Telford, M. J. und Thomas, R. H.** (1998). Expression of homeobox genes shows chelicerate arthropods retain their deutocerebral segment. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 10671-5.
- Thummel, C. S., Boulet, A. M. und Lipshitz, H. D.** (1988). Vectors for *Drosophila* P-element-mediated transformation and tissue culture transfection. *Gene* **74**, 445-56.
- van der Meer, J. M.** (1977). Optical clean and permanent whole mount preparation for phase-contrast microscopy of cuticular structures of insect larvae. *Drosophila Information Service* **52**, 160.
- Wimmer, E. A., Carleton, A., Harjes, P., Turner, T. und Desplan, C.** (2000). Bicoid-independent formation of thoracic segments in *Drosophila*. *Science* **287**, 2476-9.
- Wolff, C.** (1997). Evolution *cis*-regulatorischer Elemente der Segmentierungsgene *hunchback*, *hairy* und *runt*, (ed. München: Ludwig-Maximilians-Universität.
- Wolff, C., Schröder, R., Schulz, C., Tautz, D. und Klingler, M.** (1998). Regulation of the *Tribolium* homologues of caudal and hunchback in *Drosophila*: evidence for maternal gradient systems in a short germ embryo. *Development* **125**, 3645-54.
- Wolff, C., Sommer, R., Schröder, R., Glaser, G. und Tautz, D.** (1995). Conserved and divergent expression aspects of the *Drosophila* segmentation gene hunchback in the short germ band embryo of the flour beetle *Tribolium*. *Development* **121**, 4227-36.
- Xue, L. und Noll, M.** (1996). The functional conservation of proteins in evolutionary alleles and the dominant role of enhancers in evolution. *Embo J* **15**, 3722-31.
- Zeidler, M. P., Bach, E. A. und Perrimon, N.** (2000). The roles of the *Drosophila* JAK/STAT pathway. *Oncogene* **19**, 2598-606.

Ich versichere, daß ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig 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 noch 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 Prof. Dr. Diethard Tautz betreut worden.

Teile der vorliegenden Arbeit sollen veröffentlicht werden:

Eckert, C., Aranda, M., Wolff, C., Wimmer, E. und Tautz, D. (2003). Functional analysis of the regulatory region of *hairy* in *Tribolium* reveals conserved and diverged aspects of pair-rule gene patterning in insects. In Vorbereitung

8. Lebenslauf

09.07.1971	in München geboren, Staatsangehörigkeit: deutsch
09/1978 – 07/1982	Grundschule, München
09/1982 – 07/1991	Oskar-von-Miller Gymnasium, München Abschluss: Allgemeine Hochschulreife
10/1992 – 07/1998	Studium der Biologie an der Ludwig-Maximilians-Universität, München Studienschwerpunkte: Zoologie, Genetik, Biochemie, Neurobiologie <i>Diplomarbeit: Die Regulation des Gap-Gens Tc-tailless in Drosophila</i> Abschluss: Diplom-Biologe (Univ.) ,
10/1998	Beginn der Doktorarbeit