

Funktionelle Studien zur dorsoventralen Musterbildung in
Tribolium castaneum

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität zu Köln

vorgelegt von

Abidin Basal
aus Yozgat/Türkei

Köln 2003

Berichterstatter: Herr Professor Dr. Siegfried Roth
Herr Professor Dr. Diethardt Tautz

Tag der Disputation: 11. Februar 2004

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. Siegfried Roth am Institut für Entwicklungsbiologie der Universität zu Köln angefertigt.

Bei Prof. Dr. Siegfried Roth möchte ich mich bedanken, dass er es mir ermöglicht hat, an so einem interessanten Projekt zu Arbeiten.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Diethard Tautz für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Meinem Labormitgliedern gilt mein Dank: Besonders Patrick Kalscheuer für die Korrekturlesung aber auch für seine humorvollen Bemerkungen. Martin Technau ebenfalls für seine Korrekturlesung. Sajith Dass für seine Diskussionsbereitschaft. Bei Hellen und Maria möchte ich mich für ihre Hilfsbereitschaft bedanken. Maurijn van der Zee und Conny Mikulski danke ich für die nette Laboratmosphäre, die sie verbreitet haben.

Ein Dankeschön auch an die hilfsbereiten Mitglieder des Instituts für Entwicklungsbiologie. Sie waren auch immer für spontane Späßchen zu haben, wobei ich von allen Iris Weigel, Peter Bommert und Martin Hobe hervorheben möchte.

Meinen Eltern Celal und Necla Basal danke ich für die moralische Unterstützung und für all die vergangenen Jahre in der Türkei, als sie dafür gesorgt haben, dass ich mein Studium durchziehen konnte.

Und natürlich meiner Ehefrau Nuran. Es ist fast unmöglich die Worte zu finden, die meine Dankbarkeit ausdrücken können. Wir haben zusammen die allerschwersten Situationen gemeistert. Sie war während der gesamten Zeit sehr zurückhaltend, verständnisvoll, sehr oft sogar aufopfernd. Nuran, diese Arbeit ist auch gleichermaßen dein Verdienst...

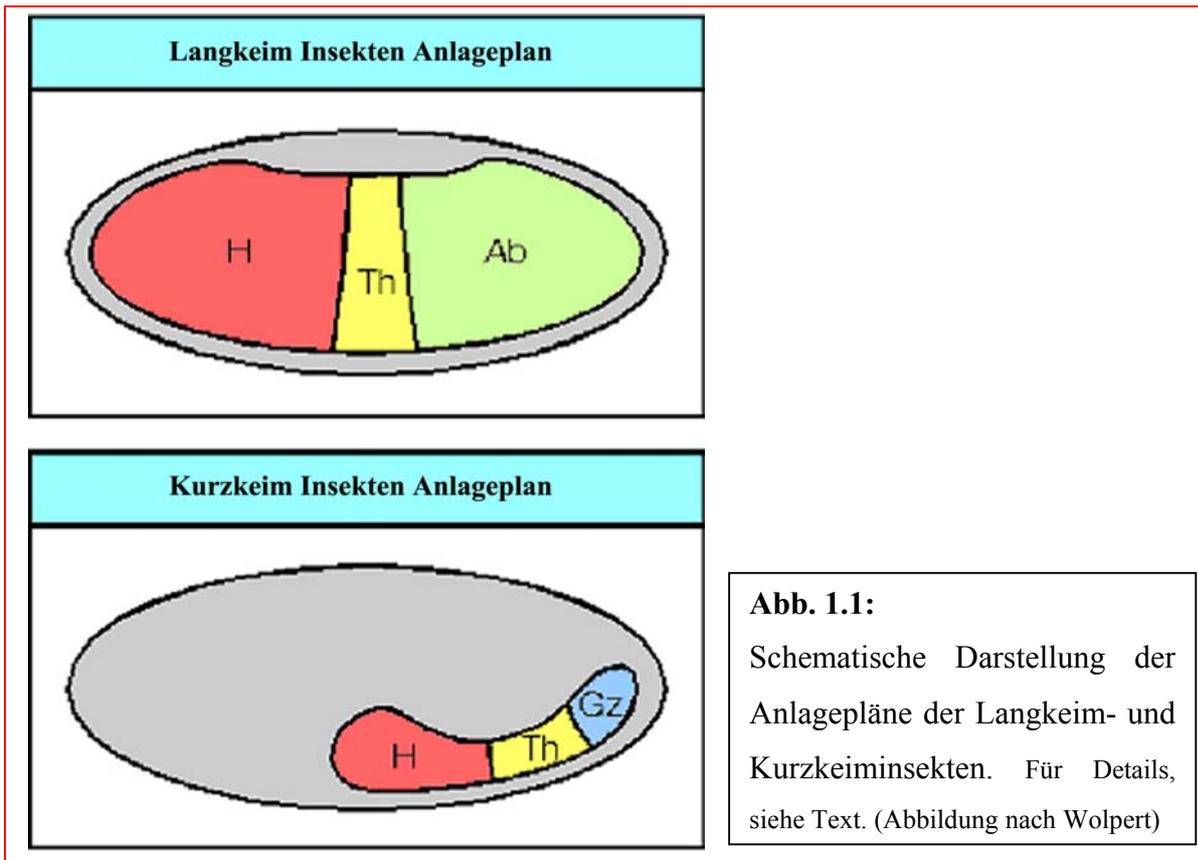
1. EINLEITUNG:	1
1.1 ETABLIERUNG DER KÖRPERACHSEN IN DROSOPHILA	3
1.2 DIE DORSOVENTRALE ACHSEN-BILDUNG IN DROSOPHILA	3
1.2.1 Dorsoventrale Polarisierung während der Oogenese	3
1.2.2 Etablierung der dorsoventralen Polarität im Embryo	7
1.2.3 Zygotische Zielgene von Dorsal	8
1.2.3.1 Gastrulation in <i>Drosophila</i>	9
1.3 WEITERE FUNKTIONEN VON TOLL	12
1.3.1 Funktionen von Toll in der Embryonalentwicklung	12
1.3.2 Funktionen von Toll im Immunsystem	13
1.4 TOLL HOMOLOGE IN DROSOPHILA	15
1.5 VERWANDTE TOLL/DORSAL SIGNALKETTEN IN SÄUGERN	15
1.5.1 Ähnlichkeiten der Signalwege der Toll-Ähnlichen Rezeptoren der Säuger mit der Toll Kaskade:	17
1.6 ALLGEMEINE UNTERSUCHUNGEN ZU TOLL	17
1.7 ZIEL DER ARBEIT:	19
2. MATERIAL UND METHODEN	20
2.1 LÖSUNGEN UND CHEMIKALIEN	20
2.1.1 Häufig verwendete Lösungen und Chemikalien	20
2.1.2 Konzentrationsangaben in Reaktionsansätzen	21
2.2 BIOLOGISCHES MATERIAL	21
2.2.1 Tierhaltung	21
2.2.2 Bakterienstämme	21
2.2.3 Vektoren	22
2.2.4 Molekulargewichtsstandards	22
2.2.5 Oligonukleotide	22
2.2.6 Antikörper	23
2.3 MOLEKULARBIOLOGISCHE TECHNIKEN	24
2.3.1 Präparation von Nukleinsäuren	24
2.3.1.1 Phenol/Chloroform-Extraktion	24
2.3.1.2 Embryonale RNA Isolierung mit Trizol:	24
2.3.1.3 Fällung von Nukleinsäuren mit Alkohol	25
2.3.1.4 Präparation von Plasmid-DNA	25
2.3.1.5 Präparative Isolierung von Plasmid-DNA	26
2.3.1.6 PCR Techniken	26
2.3.1.6.1 RACE-PCR Amplifikation:	26
2.3.1.6.2 Standard PCR Amplifikation	27
2.3.1.7 Doppelstrang RNA Synthese	27
2.3.1.8 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	29
2.3.2 Restriktionsanalysen	30
2.3.3 Elektrophorese von DNA-Fragmenten	30
2.3.3.1 Standard-Gelelektrophorese	30
2.3.4 Klonierungstechniken	31
2.3.4.1 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	31
2.3.4.2 5'-Dephosphorylierung von Vektor-DNA	31
2.3.4.3 Ligation von DNA-Fragmenten	32
2.3.4.4 Herstellung kompetenter <i>Escherichia coli</i> -Zellen	33
2.3.4.5 Transformation von <i>E. coli</i> -Zellen	34
2.2.4.6 α -Komplementations-Tests von Bakterien	34

2.3.5 DNA-Sequenzierung.....	35
2.3.6 Markierung von Nukleinsäuren.....	35
2.3.6.1 Herstellung digoxigenierter <i>in vitro</i> -Transkripte	35
2.3.6.2 <i>Plaque lift</i> -Transfer	36
2.3.7 Konstruktion der <i>Tribolium</i> Genomischen Bank.....	36
2.3.8 RACE: <i>Rapid Amplifikation of cDNA Ends</i>	36
2.4 EMBRYOLOGIE	37
2.4.1 Fixierung von Embryonen.....	37
2.4.2 Behandlung der dsRNA Injizierten Puppen:	38
2.4.4 F-Actin (Phalloidin) Färbung mit <i>Tribolium</i> Embryonen.....	40
2.4.5 <i>In situ</i> Hybridisierung von <i>Tribolium</i> Embryonen mit RNA Probe.....	41
2.4.6 Färbung der Embryonen mit Hoechst Farbstoff 33258 (DAPI)	43
2.5 PUPPALE DSRNA INJEKTIONEN.....	43
3. ERGEBNISSE:	44
3.1 KOMPLETTIERUNG DER CDNA VON TOLL AUS <i>TRIBOLIUM CASTANEUM</i>	44
3.2 DIE <i>TRIBOLIUM</i> TOLL EXPRESSION:	44
3.2.1 <i>Tribolium</i> Toll Expression in unbefruchteten Eiern:	44
3.2.2 RT-PCR an unbefruchteten Eiern	45
3.2.3 Toll Expression während der Embryogenese.....	47
3.3 TOLL DOPPELSTRANG RNA INJEKTIONEN:	52
3.3.1 <i>zen</i> und <i>dpp</i> Expression in Toll RNAi Embryonen	53
3.3.2 Toll RNAi Embryonen nach Ausbildung der Primitivgrube.....	55
3.3.3 Der Toll RNAi Effekt in Keimstreifenausstreckungsstadien	56
3.3.4 Schwache Toll RNAi Phänotypen.....	59
3.3.5: STATISIK DER TOLL RNAI AUSFALLPHÄNOTYPEN.....	62
3.4 VERMEINTLICHE ZIELGENE DER TOLL KASKADE	63
2.4.1.1 Das Twist Expressionsmuster	64
3.4.1.2 Die <i>snail</i> mRNA Expression	65
3.4.2 Puppale Doppelstrang-RNA Injektionen mit <i>twist</i>	69
3.4.3 RNAi Injektionen mit <i>snail</i> dsRNA und Doppelinjektionen mit <i>snail</i> und <i>twist</i> dsRNA.....	74
4. DISKUSSION	75
4.1 DIE <i>TRIBOLIUM</i> TOLL CDNA	75
4.2 TcTOLL UND SEINE URSPRÜNGLICHE ROLLE IN DER EMBRYONALENTWICKLUNG.....	76
4.3 DIE TOLL RNAI PHÄNOTYPEN:	78
4.3.1 Die <i>twist</i> Expression am posterioren Ende des <i>Tribolium</i> Embryos.....	79
4.3.2 Welchen Ursprung haben die Zellen der Schlauchförmigen Toll RNAi Embryonen?	80
4.3.3 Der zeitliche Rückgang des Toll RNAi Effektes	81
4.4 DER TWIST PHÄNOTYP	82
4.4.1 Die Regulation der <i>snail</i> Expression.....	83
4.5 DAS <i>SNAIL</i> EXPRESSIONSMUSTER UND DER MUTANTE PHÄNOTYP:.....	84
5. LITERATURVERZEICHNIS	86
6. ANHANG	98
Zusammenfassung:	100
Summary:	101
Erklärung	102
Lebenslauf.....	103

1. Einleitung:

Die höhere Diptere *Drosophila melanogaster* ist eine der am detailliertest studierten Organismen überhaupt. Aus den gewonnenen Erkenntnissen wurden viele evolutionäre Vergleiche abgeleitet. Homologe vieler Kaskaden, die für die *Drosophila* Entwicklung benötigt werden, lassen sich in diversen Organismen wiederfinden. Deshalb scheint es, abgesehen von Spezialanpassungen für bestimmte Lebensräume, eher die Kontrolle der Gen-Aktivität dieser Kaskaden zu sein, die die Vielfalt der Organismen ermöglicht. Allerdings stellt sich auch die Frage, wie relativ feine Unterschiede in der Genregulierung zu der Vielfalt führen kann. Vor allem, wie funktionierten die ursprünglichen Mechanismen, die für die Entwicklung zuständig waren? Um dieser Fragestellung nachzugehen, sollte die Entwicklung von Insekten mit ursprünglicherem Entwicklungsmodus studiert werden.

Der Mehlkäfer *Tribolium castaneum* bietet sich für evolutionäre Studien besonders an, denn im Gegensatz zu *Drosophila* weist *Tribolium* eine dem archetypischen Modus ähnlichere Art der Embryonalentwicklung auf. Obwohl *Tribolium* als Käfer zu den holometabolen Insekten gehört, entwickeln sich seine Embryonen nach dem Kurzkeimmodus (Patel *et al.*, 1994). Diese Form der Embryonalentwicklung, bei der nur Kopf- und evtl. Thoraxsegmente im Blastoderm angelegt werden, während der Rest der Segmente aus einer Wachstumszone hervorgeht, findet sich auch bei primitiven, hemimetabolen Insekten wieder. Nur ein kleiner Teil des Blastoderm-Embryos dieser Insekten bildet das Keimrudiment aus, während der Rest die extraembryonalen Hüllen, nämlich das Amnion und die Serosa ausbildet (siehe Abb. 1.1). *Tribolium* ist also wahrscheinlich dem Grundtypus der Insekten-Entwicklung näher als *Drosophila* (Sander, 1976). Die Embryogenese von *Drosophila* dagegen ist ein Musterbeispiel für die Langkeim-Entwicklung (Abb. 1.1) Alle Segmente des Embryos werden im Blastoderm angelegt. Die extraembryonale Hülle, die Amnioserosa, entsteht nur aus einer kleinen Fraktion des Blastoderms (Abb. 1.1).



Eine leichte Laborhaltung, sowie die Vielfalt etablierter molekularer und genetischer Techniken ermöglichen umfangreiche Studien an der Embryonalentwicklung von *Tribolium* (Sommer und Tautz, 1994; Falciani *et al.*, 1996; Sanchez-Salazar *et al.*, 1996; Berghammer *et al.*, 1999). So konnten Einsichten in den Musterbildungsprozess der anteriorposterioren Achse gewonnen werden (Wolff *et al.*, 1998). Was die dorsoventrale Achse betrifft, konnte gezeigt werden, dass auf der ventralen Seite von *Tribolium* Embryonen ein maternal kontrollierter Kernkonzentrationsgradient von Dorsal entsteht, der der Kernlokalisierung von Dorsal in *Drosophila* ähnelt (Chen *et al.*, 2000). Zudem deutet eine starke Expression von *dorsal* Transkripten in der Serosa darauf hin, dass *dorsal* in der Immunabwehr eine Rolle spielt. Dies ist auch in *Drosophila* der Fall. Somit liegt die Vermutung nahe, dass grundlegende Aspekte der dorsoventralen Musterbildungsprozesse und der Immunabwehr zwischen *Drosophila* und *Tribolium* konserviert sind.

1.1 Etablierung der Körperachsen in *Drosophila*

Genetische und molekulare Untersuchungen führten zu der Erkenntnis, dass in *Drosophila* zwei Mechanismen operieren, die schon während der Oogenese die Polarität und Orientierung der Körpergrundachsen festlegen. Eines der Mechanismen basiert auf der Lokalisation von mRNA an beiden Polen der wachsenden Oozyte. Die als RNA abgelegte Information dient dann während der Embryogenese als Quelle für die Produktion von Protein-Morphogen Gradienten, die im wesentlichen die Ausbildung der anteriorposterioren Achse steuern (Driever, 1992; St. Johnston, 1993). Die Bildung der Termini in anteriorposteriorer Orientierung (Sprenger und Nüsslein-Volhard, 1993), sowie die Festlegung der dorsoventralen Achse unterliegen einem völlig anderen Mechanismus. Dieser Mechanismus macht Gebrauch von räumlichen Informationen, die im Follikel Epithel abgelegt werden, welches die Oozyte umgibt. Nach Fertigstellung der Oozyte sind diese Informationen im Extrazellulärraum lokalisiert. Während der Embryogenese werden dann durch Transmembranrezeptoren, die in den frühen Stadien angelegten Informationen in den Embryo weitergeleitet. Die Systeme können sehr komplex sein. So werden für die Ausbildung der dorsoventralen Polarität die Produkte von mindestens dreizehn maternal exprimierten Genen benötigt (Chasan und Anderson, 1993; Charatsi *et al.*, 2003). Eine Schlüsselrolle in der dorsoventralen Achsenbildung spielt der Transmembranrezeptor *Toll* (Übersichtsartikel: Roth, 1998).

1.2 Die dorsoventrale Achsenbildung in *Drosophila*

1.2.1 Dorsoventrale Polarisierung während der Oogenese

In *Drosophila melanogaster* entsteht die dorsoventrale Polarität während mittlerer Oogenese Stadien, wenn der Oozytenkern von einer posterior zentralen zu einer anterior asymmetrischen Position wandert (zur Übersicht siehe Roth, 2003). Der Symmetrie brechende Schritt, das heißt die neue Positionierung des Kerns ist von immens wichtiger Bedeutung, weil in räumlicher Nähe des Kerns hohe Konzentrationen von *gurken* (*grk*) Transkripten lokalisiert werden (Neuman-Silberberg und Schüpbach, 1993). Gurken ist ein Molekül der ``Transforming Growth Factor- α `` (TGF- α) Familie, und bindet in den benachbarten Follikelzellen an den ``Epidermal Growth Factor`` Rezeptor (Egfr), (Neuman-

Silberberg und Schüpbach, 1993; Ghiglione *et al.*, 2002). Der Egfr ist in allen Follikelzellen uniform exprimiert, allerdings nur die Zellen, in denen der Egfr aktiviert wird, nehmen dorsale Identität an. Gurken initiiert in den Follikelzellen auch die Produktion von weiteren Faktoren, die zur dorsoventralen Asymmetrie beitragen. So ist es an der Transkription von *rhomboïd* (*rho*) beteiligt, welches wiederum Spitz (*Spi*), einen weiteren TGF- α ähnlichen Liganden aktiviert. Zusammen mit Grk aktiviert *Spi* in einem positiven Rückkopplungsmechanismus den Egfr in einer breiten anterior-dorsalen Domäne (Wasserman und Freeman, 1998). Die Grk abhängige Aktivierung von bestimmten Genen führt in den dorsalen Follikelzellen auch zur Reprimierung von *pipe*, das für eine potentielle Sulfotransferase kodiert. Somit wird *pipe* nur in den ventralen 40% der Follikelzellen exprimiert.

Letztendlich ist Pipe an der Aktivierung einer Reihe von Proteasen beteiligt. Am Anfang dieser Protease-Kaskade steht Nudel. Das Nudel Protein wird von allen Follikelzellen, die die Oozyte umgeben sezerniert und bildet eine Schicht zwischen der in den späten Oogenesestadien entstehenden Vitellinhülle und der Oberfläche der Oozyte (LeMosy *et al.*, 1998). Später ist es an der ganzen Oberfläche des frühen Embryos in prozessierter Form zu finden (LeMosy *et al.*, 1998). Interessanterweise scheint Nudel eine Autoprozessierung zu durchlaufen, um in die aktive Form überzugehen, (so ist Nudel wahrscheinlich nicht ein Faktor, der direkt von Pipe aktiviert wird). Die Prozessierung von Nudel führt dazu, dass ein kleines Fragment, welches eine aktive Proteasedomäne beinhaltet, produziert wird. Jedoch deuten elegante Experimente daraufhin, dass die Aktivität von Nudel nicht ventral lokalisiert ist, d.h. dass Nudel nicht der entscheidende Faktor zur Übermittlung der Polarität darstellt (Hong und Hashimoto, 1996; Nilson und Schüpbach, 1998).

Vermutlich besteht die Funktion von Pipe bezüglich der dorsoventralen Achsenbildung darin, dass es zusammen mit einem anderen Faktor, Windbeutel, an der Modifizierung von Kohlenhydratketten eines bis heute noch unbekanntem Proteoglykans (Faktor X), welches von den ventralen Follikelzellen sezerniert wird, mitwirkt. Eine Hypothese besagt, dass erst die Modifikation von Faktor X durch Pipe und Windbeutel Gastrulation defective erlauben würde, an diesen noch unbekanntem Faktor zu binden. Gastrulation defective (Gd), ist die erste Protease, die durch Nudel prozessiert und aktiviert werden würde. Also wäre die Bindung von Gd an diesem unbekanntem Faktor der ventralisierende Schritt, der der ventralen Pipe Lokalisierung folgt (Übersichtsartikel: Roth, 1998).

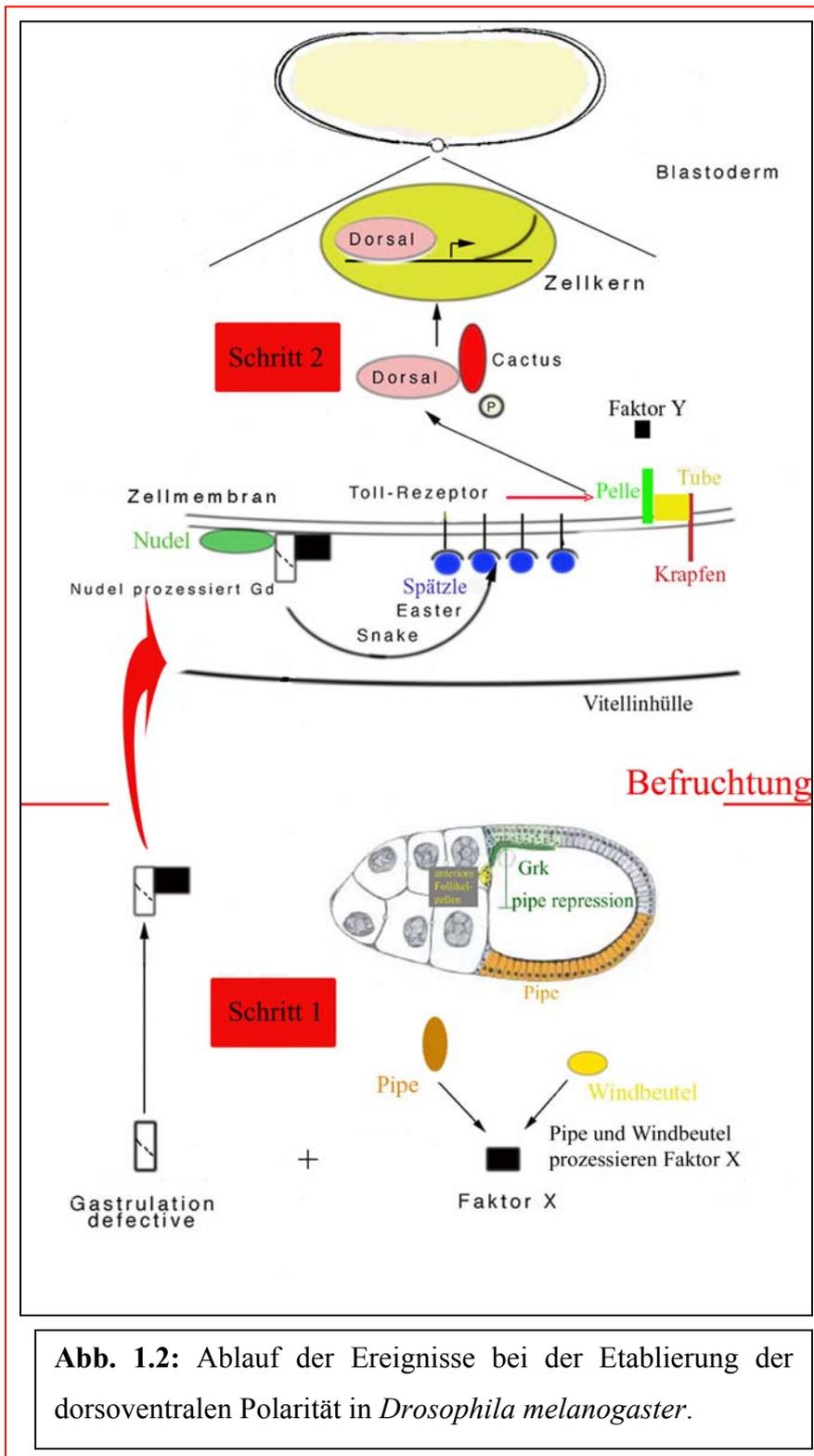


Abb. 1.2: Ablauf der Ereignisse bei der Etablierung der dorsoventralen Polarität in *Drosophila melanogaster*.

Die Ereignisse nach der Aktivierung von Gd sind weniger spekulativ. Das aktivierte *Gastrulation defective* aktiviert die nächste Protease in der Kette, und zwar *Snake*, welche

wiederum Easter aktiviert (De Lotto und Spierer, 1986; Chasan und Anderson, 1989; Chang und Morisato, 2002). Die bisher genannten Proteasen gehören alle zur Trypsin-Familie extrazellulärer Serin-Proteasen. Die extrazellulären Proteasen zeigen große Ähnlichkeiten zu Serin-Proteasen in Vertebraten, die in der Blutgerinnung und beim Komplementsystem eine wichtige Rolle spielen (Hecht und Anderson, 1992). Die Ähnlichkeit besteht darin, dass, wie bei den Vertebraten, die Serin-Proteasen als inaktive Zymogene synthetisiert werden. Die Aktivierung erfolgt zu einer bestimmten Zeit und einem bestimmtem Ort durch die vorgeschaltete Protease. Spezifische Protease-Inhibitoren verhindern dann die zeitliche und räumliche Ausdehnung der Protease-Aktivität. Auch in *Drosophila* werden die extrazellulären Proteasen Nudel, Gastrulation defective, Snake und Easter -die letzte der Proteasen in der Kette-, sequenziell aktiviert. Interessanter Weise ist die proteolytische Aktivität von Easter strengstens reguliert, so dass es zur Feinjustierung der Expression der dorsoventral Gene im Embryo beiträgt (Chang und Morisato, 2002). Easter ist die Protease, welche das pro-Spätzle Protein spaltet (De Lotto, 1998; Chang und Morisato, 2002 Übersichtsartikel: Roth, 1998). Das pro-Spätzle Protein wird als inaktives Zymogen in den Perivitellinspalt sezerniert. Es ist ein Protein, das am C-Terminus ein ``Cysteine-Knot``-Motiv beinhaltet (Morisato und Anderson, 1994). Das Cysteine-Knot-Motiv ist zum Beispiel in dem Vertebraten Nervenwachstums Faktor NGF enthalten (Mizuguchi *et al.*, 1998). Neueste Untersuchungen zeigen, dass die aktive Form von Spätzle auf direktem Weg d.h., ohne zusätzliche Faktoren, an den Transmembranrezeptor Toll bindet und ihn aktiviert (Weber *et al.*, 2003). Die Stöchiometrie ist so ausgelegt, dass ein Spätzle Dimer an zwei Toll Rezeptoren bindet, so dass die Toll Aktivierung vermutlich mit einer Dimerisierung des Rezeptors einhergeht. (Weber *et al.*, 2003); (für Details, siehe Abb. 1.2).

Die bis hierhin erwähnten Faktoren gehören zu den mittlerweile zwölf maternalen Genen der Dorsalgruppe (Anderson und Nüsslein-Volhard, 1984; Kambris *et al.*, 2002). Sie haben alle einen identischen Ausfallphänotyp: die gesamten Zellen des Blastoderms nehmen dorsale Identität an, und die Embryonen enden in langen Schläuchen, die ausschließlich dorsale Kutikula erzeugen (Stein *et al.*, 1991; Charatsi *et al.*, 2003).

1.2.2 Etablierung der dorsoventralen Polarität im Embryo

Die Schlüsselkomponente der dorsoventralen Kaskade ist der Transmembranrezeptor *Toll*. Seine Bedeutung für die Kaskade besteht darin, dass er die von außerhalb des Embryos ankommenden Signale in das Innere weiterleitet. Obwohl *Toll* gleichmäßig in jeder Zelle des Blastoderms exprimiert ist, wird es durch die auf die ventrale Seite beschränkte Prozessierung und der daraus resultierenden Aktivierung seines Liganden Spätzle, nur in ventralen Zellen stimuliert. *Toll* besteht aus einer extrazellulären Domäne, einer Transmembrandomäne, und einer zytoplasmatischen Domäne. Die extrazelluläre Domäne ist weiter in Signalsequenz und zwei Blöcken von Leucin-reichen-Wiederholungen die von Cystein-reichen-Regionen flankiert werden, unterteilt (Hashimoto *et al.*, 1988). Diese Leucin- und Cystein-Wiederholungen lassen sich in vielen Rezeptortypen wiederfinden. Sie fungieren vor allem bei Protein-Protein Interaktionen (Kobe und Deisenhofer, 1994). Die Verankerung in die Zellmembran erfolgt über ihre Transmembrandomäne. Interessanterweise zeigt *Toll* in der zytoplasmatischen Domäne Ähnlichkeiten zum Interleukin-1-Rezeptor der Säuger auf (Schneider *et al.*, 1991).

Die zytoplasmatischen Ereignisse, die durch die Aktivierung von Toll ausgelöst werden, sind nicht vollständig aufgeklärt. Jedoch weiß man, dass aktiviertem Toll drei Moleküle aus der Dorsal Gruppe nachgeschaltet werden. Diese sind Tube (Letsou *et al.*, 1991), Krapfen (Charatsi *et al.*, 2003), und Pelle (Shelton und Wasserman, 1993). Krapfen (Kra) ist das *Drosophila* Homolog von Myd88, ein zytoplasmatisches Adapter Protein, das in der Interleukin-1 Kaskade der Säuger operiert (Wesche *et al.*, 1997). Tube ist auch ein zytoplasmatischer Faktor, der als Adapterprotein funktioniert (Großhans *et al.*, 1994; Galindo *et al.*, 1995). Hingegen ist Pelle eine Serin/Threonin Kinase, die sich selbst, aber auch Tube phosphorylieren kann (Großhans *et al.*, 1994; Shen und Manley, 1998; Towb *et al.*, 2001). Immunoprecipitationsexperimente bewiesen eine Interaktion zwischen Toll und Krapfen (Horn and Medzhitov, 2001; Tauszig-Delamasure *et al.*, 2001). Zur Zeit wird angenommen, dass eine Konformationsänderung von Toll, hervorgerufen durch das Binden des Liganden Spätzle, die Bildung eines heterotrimerischen Komplexes mit Tube, Pelle und Krapfen auslöst. Erst durch diesen Komplex wäre es für Toll möglich, Pelle zu aktivieren, denn weder für Tube, noch für Pelle konnte gezeigt werden, dass sie mit Toll auf direktem Wege interagieren (Galindo *et al.*, 1995; Shen and Manley, 1998).

Die Aktivierung von Pelle führt über nicht vollständig geklärte Zwischenschritte zur Dissoziation des Dorsal/Cactus-Proteinkomplexes. Dorsal ist ein Transkriptionsfaktor der

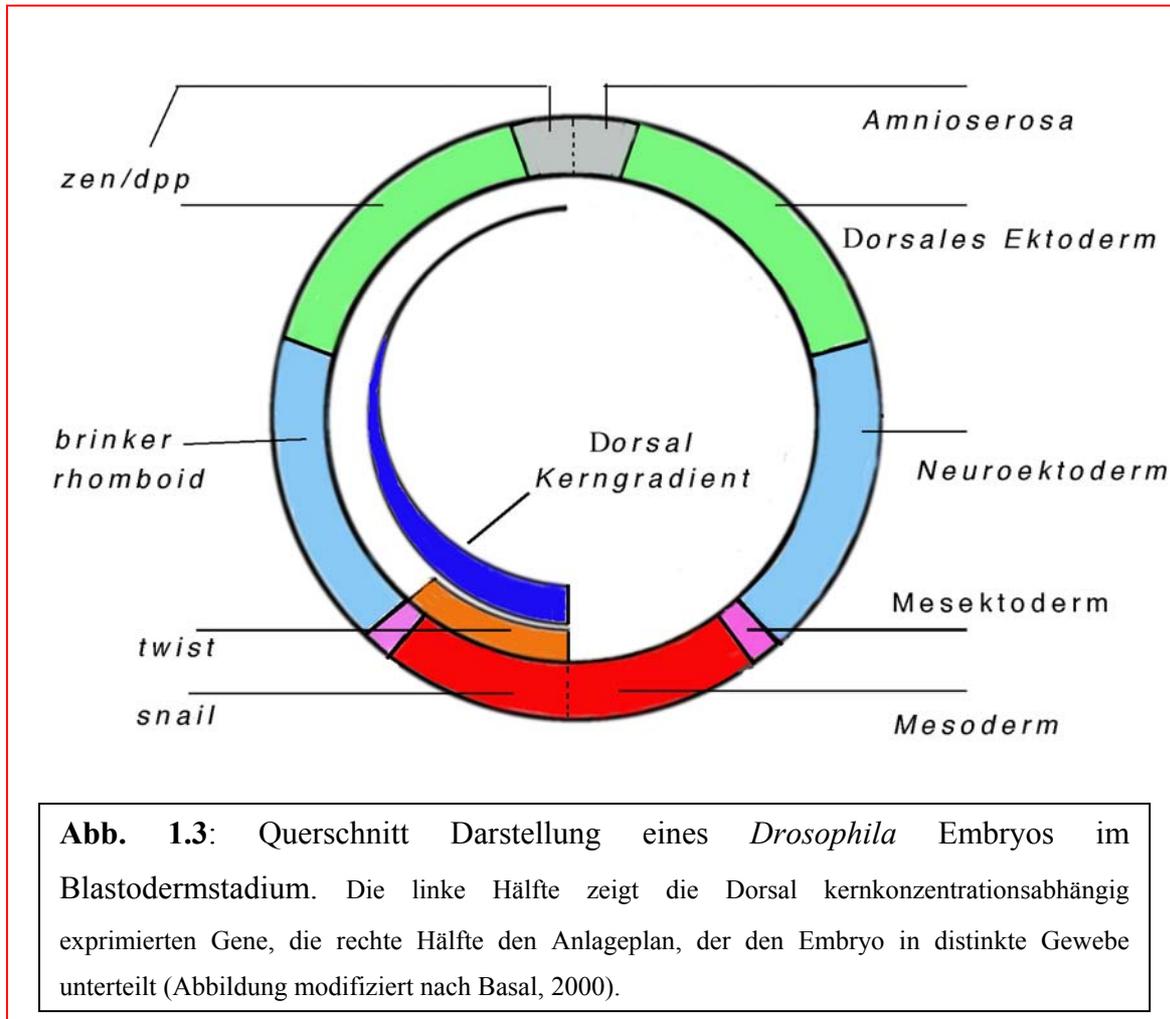
Rel-Familie (Steward, 1987), Cactus ein Faktor mit Ankyrin-Motiven (Geisler *et al.*, 1992; Kidd, 1992). Vor der Aktivierung der Kaskade ist Cactus im Zytoplasma an das Dorsal Protein gebunden (Tatei und Levine, 1995), und verhindert seine Translokation in den Zellkern. In dieser Phase ist Dorsal gleichmäßig im Zytoplasma des Embryos verteilt. Nach der Phosphorylierung an zwei bekannten Serin-Resten (Reach *et al.*, 1996) wird Cactus ubiquitinyliert und abgebaut (Belvin *et al.*, 1995). Nun wird das Dorsal-Protein nicht mehr 'maskiert' und kann ungehindert in die Kerne gelangen (Bergman *et al.*, 1996; Reach *et al.*, 1996; Roth *et al.*, 1989), (zur Übersicht, siehe Abb. 1.2).

Der Grad der Aktivierung der Toll Rezeptoren definiert die Effizienz, mit der Dorsal in die Kerne aufgenommen wird, das heißt, je weiter ventral eine Zelle liegt, desto stärker die Dorsal Translokation in den Zellkern. Somit erzeugt die Spätzle-Toll-Pelle Kasette einen Dorsal-Kerngradienten, der die höchsten Konzentrationen entlang der ventralen Mittellinie aufweist (Roth *et al.*, 1989).

1.2.3 Zygotische Zielgene von Dorsal

Am Ende der maternal kontrollierten Dorsoventral-Kaskade steht *Dorsal*. In Abhängigkeit von seiner Kernkonzentration funktioniert es als ein Transkriptionsfaktor und löst die Aktivierung verschiedener zygotischer Gene aus, die das Schicksal der Zellen, in denen sie exprimiert werden, festlegen (Rush und Levine, 1996; Roth *et al.*, 1989). Ventral, wo die Kernkonzentration am höchsten ist, schaltet es mesodermale Gene wie *twist* (Thisse *et al.*, 1991; Leptin, 1991) und *snail* ein (Ip *et al.*, 1992b). Ebenfalls in Abhängigkeit von seiner Kernkonzentration agiert es zusammen mit einem DNA bindenden Protein, Dead Ringer, und mit Kofaktoren wie Groucho und Cut in weiter dorsalen Regionen des Embryos als ein spezifischer Repressor der Gentranskription. Gene wie *decapentaplegic* (*dpp*, Ferguson, 1992), und *zerknüllt* (*zen*, Rushlow *et al.*, 1987), werden auf der Ventralseite Dorsal-abhängig reprimiert. Aus diesem Grund ist die Expression der beiden Gene, die eine wichtige Rolle in der Entwicklung des dorsalen Ektoderms und der Aminoserosa spielen (Ferguson und Anderson, 1992), nur auf die dorsale Seite, wo die Kernkonzentration von Dorsal am niedrigsten ist, eingeschränkt (Arora und Nüsslein-Volhard, 1992). Für Dorsal Mutanten, in denen Dorsal im gesamten Embryo im Zytoplasma verbleibt, wird *dpp* entlang der gesamten Dorsoventralachse exprimiert, während *snail* und *twist* nicht exprimiert werden (Ray *et al.*, 1991). Im lateralen Zwischenbereich, wo die Kernkonzentration von Dorsal zwar hoch genug

für die Unterdrückung von *dpp* und *zen*, aber zu niedrig für die Unterdrückung ektodermaler Gene ist, werden die Gene *rhomboïd* (*rho*), (Ip *et al.*, 1992b), *short gastrulation* (*sog*, Sasai *et al.*, 1994; Biehs *et al.*, 1996) und *brinker* (*brk*), (Jazwinska *et al.*, 1999) exprimiert. Dadurch wird in einem lateralen Streifen das neurogene Ektoderm spezifiziert (für Details, siehe Abb. 1.3).



1.2.3.1 Gastrulation in *Drosophila*

Die erste morphogenetische Auswirkung der dorsoventralen Kaskade in *Drosophila* ist die Gastrulation. Sie ist der Prozess, in dem Zellen ins Innere des Embryos gelangen, die im Verlauf der Embryogenese das Mesoderm und das Endoderm bilden werden. Die Invagination der mesodermalen Vorläuferzellen wird mittels einer Furchenbildung entlang der ventralen Mittellinie erreicht, der sogenannten Ventralfurche. Nicht invaginierende Zellen bilden hauptsächlich ektodermale Derivate und die Amnioserosa (Arora und Nüsslein-

Volhard, 1992). Die Gastrulation beginnt kurz nach der Zellularisierung des Blastoderms, etwa zweieinhalb Stunden nach der Eiablage (Campos-Ortega und Hartenstein, 1997). Zu diesem Zeitpunkt werden auch *twist* und *snail* auf der ventralen Seite des Embryos exprimiert (Leptin und Grünewald, 1990). Beide kodieren für Transkriptionsfaktoren. Twist ist ein Molekül mit einer basischen ``Helix-Loop-Helix`` Domäne, während *snail* für ein Protein der Zinkfingerklasse kodiert (Ip *et al.*, 1992a; Nieto, 2002). Somit interagieren beide Proteine mit spezifischen DNA Motiven. Es liegt nahe, dass sie die Aktivität weiterer Gene regulieren, die für die Mesoderm Entwicklung erforderlich sind. Zum Beispiel aktiviert *twist* unter anderem *tinman*, ein Gen das für die Morphogenese und Differenzierung des Mesoderms notwendig ist (Azpiazu und Frasch, 1993). *snail* hingegen agiert, wie fast alle Transkriptionsfaktoren der Zinkfingerklasse, als Repressor. Seine Zielgene sind vor allem Gene, die im Ektoderm exprimiert werden. Somit verhindert Snail im Blastoderm die Expression ektodermaler Gene im präsumptiven Mesoderm (Leptin, 1991b).

Lateral zeigt *snail* eine scharfe Begrenzung zum benachbarten Mesektoderm, während die *twist* Expression über das Mesektoderm hinaus graduell abnimmt (Leptin und Grünewald, 1990). Auch die posterioren Expressionsdomänen unterscheiden sich voneinander: Während *twist* bis zum posterioren Pol exprimiert wird, wird *snail* durch das Gap Gen *huckebein* am posterioren Ende reprimiert (Reuter und Leptin, 1994). Anterior überlappen zwar die Expressionsdomänen, jedoch reicht die Ventralfurche nicht bis zum anterioren Pol. Deshalb wird vermutet, dass *huckebein* *snail* oder *twist* nicht direkt, sondern deren Zielgene reprimiert, und auf diese Weise die Ventralfurche nach anterior begrenzt.

snail legt die dorsale Begrenzung der Ventralfurche fest. Direkt an der Grenze zur *snail* Domäne wird der mesektodermale Marker *single-minded* exprimiert. Nach der Invagination der mesodermalen Vorläuferzellen, d.h., wenn sich die Ventralfurche schließt, treffen diese *single-minded* exprimierenden Zellen aufeinander. Wird die *snail* Domäne verkleinert, so verkleinert sich auch die Ventralfurche und somit die Anzahl invaginierender Zellen (Kosman *et al.*, 1991).

Die Aktivierung von *twist* und *snail* durch den maternalen Kernkonzentrationsgradienten von Dorsal geschieht in einem kleinen Zeitfenster. Danach spielt Dorsal keine Rolle mehr, stattdessen reguliert *twist* die Expression von *snail* und durch einen positiven Rückkopplungsmechanismus auch sich selbst (Leptin, 1991b).

Die morphogenetischen Abläufe während der Gastrulation sind genauestens beschrieben worden. Eine Übersicht der Abläufe ist in Abb. 1.4 dargestellt. Die Abbildung zeigt Querschnitte aus Wildtyp *Drosophila* Embryonen, die progressiv die Gastrulationsstadien

durchlaufen. Sie sind mit Antikörpern gegen Twist und Even-skipped gefärbt, um die Morphogenese auch zeitlich verfolgen zu können. Die Twist-Domäne markiert die gesamte Mesodermanlage (Leptin und Grünewald, 1990). Kurz nach der Zellularisierung des Embryos erfahren Zellen dieser Mesodermanlage erste Formveränderungen. Die Initiation der Gastrulation wird in der Twist exprimierenden Domäne durch eine Abflachung der zuvor gerundeten Zellen eingeleitet. Anschließend folgt eine Verengung (Konstriktion) der apikalen Oberfläche der Zellen. Zeitgleich ändern die Zellkerne ihre Position und wandern von der Mitte der Zellen in eine basale Position. In diesem Stadium der Gastrulation erkennt man deutlich eine Invagination an der ventralen Oberfläche des Embryos, die Ventralfurche wird sichtbar. Durch die Vertiefung der Ventralfurche invaginieren die Twist exprimierenden mesodermalen Vorläuferzellen in das Innere des Embryos. Während dieses Prozesses verkürzen sich die Zellen in apikal-basaler Richtung (Costa *et al.*, 1993). Im letzten Schritt schließt sich die Ventralfurche und das Mesoderm liegt nun entlang der anteriorposterioren Achse als eine lange epitheliale Röhre im Inneren des Embryos. Die Invagination des Mesoderms ist ein sehr schneller Prozess, sie dauert insgesamt nur 15 Minuten (Leptin und Grünewald, 1990). Kurz nachdem die Zellen in das Innere des Embryos gewandert sind, verlieren sie ihre epithelialen Eigenschaften. Sie zerfallen in Einzelzellen und nehmen mesenchymalen Charakter an. Gleichzeitig breiten sie sich auf dem darunter liegenden Ektoderm aus und beginnen sich zu teilen (Leptin und Grünewald, 1990; Seher, 2002).

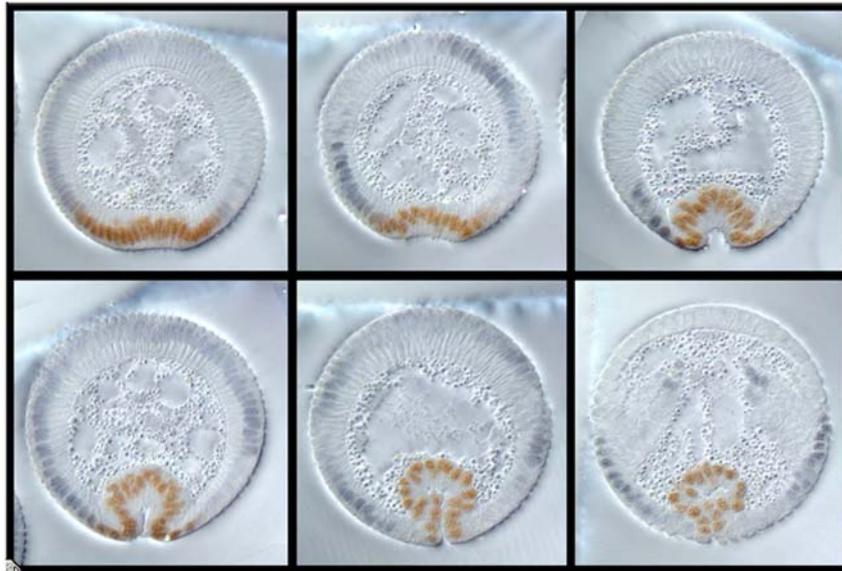


Abb. 1.4:

Ventralfurchenbildung in *Drosophila*. Abgebildet sind aufeinander folgende Ereignisse während der Gastrulation. Die Embryonen sind gegen die Proteine Twist und Even-skipped gefärbt. Für Details siehe Kapitel 1.2.3.1. (Abbildung nach Seher, 2002)

1.3 Weitere Funktionen von Toll

Die detailliertesten Kenntnisse von *Drosophila Toll* existieren in Bezug auf seine Funktion bei der Bildung der Dorsoventralachse. Allerdings sind sowohl in der späteren Embryonalentwicklung, als auch in larvalen und adulten Stadium weitere Funktionen von Toll bekannt.

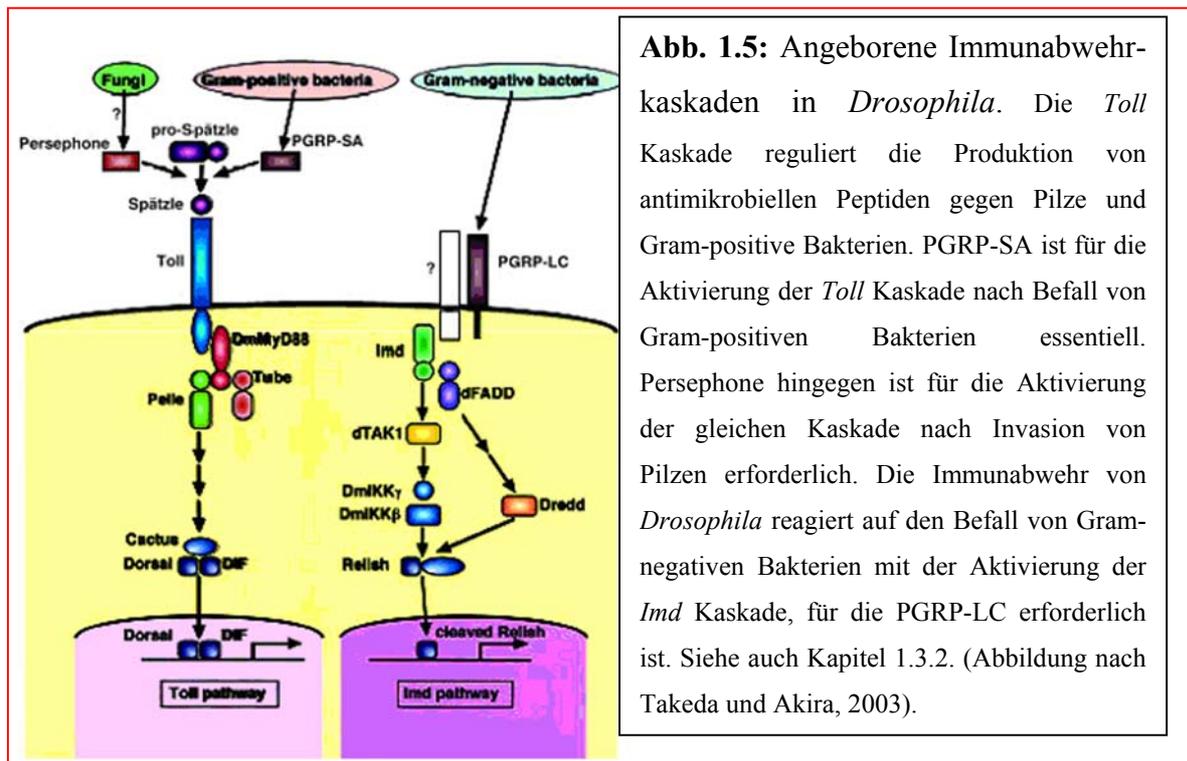
1.3.1 Funktionen von Toll in der Embryonalentwicklung

Zygotisch wird das Toll Protein während der Embryogenese in diversen Regionen und Geweben exprimiert (Hashimoto *et al.*, 1991): Ab dem Embryonal-Stadium 8 (Stadien nach Campos-Ortega und Hartenstein, 1985) unter anderem entlang der ventralen Mittellinie, im Stomodeum und Proktodeum und in den Tracheenplakoden (Hashimoto *et al.*, 1991). Zusätzlich wird Toll im späten Embryo im zentralen Nervensystem und in jedem Hemisegment in Gruppen von Muskelzellen exprimiert (Hashimoto *et al.*, 1995). Das RP3

Motorneuron und andere Motorneuronen innervieren Muskelzellen, nachdem diese Toll an ihrer Oberfläche exprimiert haben (Hashimoto *et al.*, 1995). Es ist auch bekannt, dass Toll in Muskelzell-Muskelzell Kontaktregionen exprimiert wird (Rose, 1997). Vermutlich agiert Toll regional als ein Inhibitor der Synaptogenese bestimmter Motorneuronen. Damit wird Toll vor allem in Geweben exprimiert, in denen massive morphogenetische Bewegungen stattfinden. In keinem dieser Gewebe konnte eine Bindung von Spätzle an den Rezeptor nachgewiesen werden. Da in nicht adhäsiven Zell Linien Toll-Expression die Eigenschaft besitzt, Zell Adhäsion zu vermitteln (Keith, 1990), liegt die Vermutung nahe, dass Toll in den Embryonalgeweben, in denen es exprimiert wird, an Zell-Zellinteraktionen beteiligt ist.

1.3.2 Funktionen von Toll im Immunsystem

Ursprünglich wurde angenommen, dass die *Toll* Kaskade ihre primäre Rolle während der frühen Embryogenese, und zwar bei der Ausbildung der dorsoventralen Achse hat. Später zeigte sich aber, dass die Kaskade auch in adulten Fliegen bei der Immunabwehr von immenser Bedeutung ist (Lemaitre *et al.*, 1996). Da *Drosophila* keine adaptive (nicht angeborene) Immunabwehr besitzt, ist die angeborene Immunität das einzige Mittel, mit dem sie sich gegen Pathogene wehren kann. Eine Invasion von Mikroorganismen führt zur Aktivierung von proteolytischen Kaskaden im Fettkörper (dem funktionellen Analog der Säuger-Leber, Hoffmann *et al.*, 1999), wodurch Fungizide bzw. Bakterizide produziert werden (Anderson, 2000; Tauszig *et al.*, 2000). Die Produktion von Peptiden zur Abwehr von Pilzen und Gram-positiven Bakterien wird durch die *Toll*-Signalkaskade aktiviert. Der erste Unterschied zur Dorsoventralkaskade zeigt sich stromabwärts von Toll durch die Aktivierung eines weiteren Transkriptionsfaktors mit einer Rel-Homologie Domäne, der alternativ oder auch zusätzlich zu Dorsal aktiviert wird. Dieses Protein ist Dif. Auch Dif wird im Zytoplasma durch Cactus maskiert. Nach der durch Phosphorylierung verursachten Degradation von Cactus können sowohl Dorsal als auch Dif ins Kerninnere gelangen und dadurch Zielgene aktivieren, die für die Produktion von Fungiziden und anti-bakteriellen Peptiden erforderlich sind (Hoffmann und Reichhart, 2002). Zum Beispiel ist die Aktivierung der Toll-Signalkette für die Induktion des *drosomycin* Gens verantwortlich, wobei hier *dif* anstelle von *dorsal*, eine wichtigere Rolle zu spielen scheint (siehe Abb. 1.5).



Auch Unterschiede, die in der Kaskade aufwärts von Toll liegen, sind bekannt. So wurde gezeigt, dass während einer Infektion mit Gram-positiven Bakterien ein Mitglied der Familie der Peptidoglycan-Erkennungsproteine, das PGRP-SA, für die Toll Aktivierung von essentieller Bedeutung ist (Michel *et al.*, 2001). Peptidoglycan ist einer der Hauptbestandteile der Zellwände Gram-positiver Bakterien.

Die Immunabwehr gegen Gram-negative Bakterien wird über die Imd Kaskade vermittelt, an deren Ende wieder ein Faktor mit einer Rel-Homologie Domäne steht, das Relish Protein (Abb. 1.5). Ein weiteres Mitglied der PGRP Familie, das PGRP-LC, ist für die Erkennung Gram-negativer Bakterien und somit in der Aktivierung der Imd Kaskade erforderlich (Coe *et al.*, 2002). Im Gegensatz zu PGRP-SA besitzt PGRP-LC eine Transmembrandomäne. Aus diesem Grund wird vermutet, dass PGRP-LC ein Rezeptor ist, der in die Erkennung Gram negativer Bakterien involviert ist, indem er durch deren Oberflächenmoleküle aktiviert wird. Relish, das neben einer N-terminalen Rel- Homologie Domäne, auch eine C-terminale inhibitorische Ankyrin Domäne besitzt, wird aktiviert, indem es gespalten wird. Die Signalwege zur Aktivierung der Immunabwehr sind komplex organisiert. Wie beschrieben, finden sich auf Rezeptorebene parallel arbeitende Faktoren. Jedoch scheinen sie durch sehr feine Modifikationen auf eine Vielzahl von Mikroorganismen reagieren zu können, indem sie in der Lage sind, eine sehr vielfältige Palette an Produkten hervorzubringen.

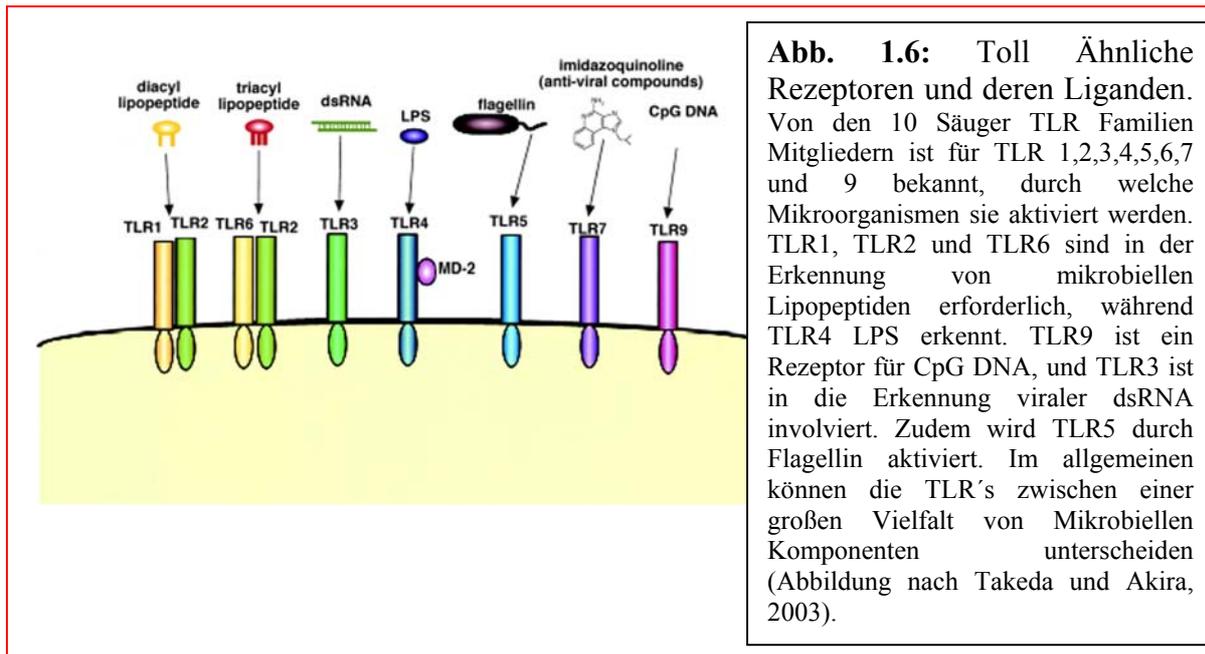
1.4 Toll Homologe in *Drosophila*

Neben *Toll* konnte bis zur Sequenzierung des *Drosophila* Genoms mit *18wheeler* (*18w*) nur ein weiteres Gen, das strukturelle Ähnlichkeiten zu *Toll* aufweist, kloniert und analysiert werden (Eldon *et al.*, 1994). Dabei zeigte sich, dass *18w* während der Embryogenese ein komplexes Expressionsmuster hat und sowohl in larvalen Stadien als auch in Adulten von essentieller Funktion ist. Mit der Verfügbarkeit des *Drosophila* Genoms wurde es möglich, sieben weitere *Toll* Homologe zu identifizieren, die als *Toll-3* – *Toll-9* bezeichnet werden. Von allen *Toll*-Homologen weist *Toll-5* die größte strukturelle Ähnlichkeit zu *Toll* auf (Kambris *et al.*, 2002). Allgemein betrachtet zeigen die Mitglieder der *Toll* Familie während verschiedener Entwicklungsstadien zeitlich und räumlich regulierte, allerdings voneinander unterschiedliche Expressionsmuster. Jedoch zeigen Northern Blot Analysen, dass *Toll* das einzige Mitglied der Familie ist, das maternal exprimiert wird (Kambris *et al.*, 2002).

Die Funktion der zygotisch exprimierten *Toll*-Homologen, *Toll-3* – *Toll-9* ist weitgehend unbekannt. Bisher gibt es keine klaren Hinweise, dass sie an der Immunabwehr beteiligt sind. Für *Toll-8* (*Tollo*) konnte gezeigt werden, dass es eine indirekte Rolle bei der Glykosylierung differenzierender Neuronen ausübt (Seppo *et al.*, 2003).

1.5 Verwandte Toll/Dorsal Signalketten in Säugern

Das Interesse an *Toll*-ähnlichen Rezeptoren in *Drosophila* sowie diversen anderen Organismen bis hin zu Pflanzen, wurde hauptsächlich geweckt, nach dem man verblüffende Ähnlichkeiten zu Kaskaden fand, die im angeborenen Immunsystem der Säuger inflammatorische Reaktionen auslösen. (Medzhitov *et al.*, 1997). Insgesamt sind 10 Säuger-TLR's identifiziert worden (TLR1-TLR10), (Rock *et al.*, 1998). Obwohl die zytoplasmatischen Domänen der *Toll*-ähnlichen Rezeptoren Homologien zu den zytoplasmatischen Domänen der Interleukin-1 Rezeptoren (IL-1) Familie aufweisen, sind die extrazellulären Domänen strukturell nicht verwandt. (Übersichtsartikel: Takeda und Akira, 2003). Während die IL-1 Familie eine Immunoglobulin ähnliche Domäne besitzt, hat die TLR Familie Leucin-reiche-Wiederholungen (LRR's). Jedes Mitglied der TLR Familie erkennt gezielt bestimmte Komponenten von Pathogenen (Siehe Abb. 1.6).

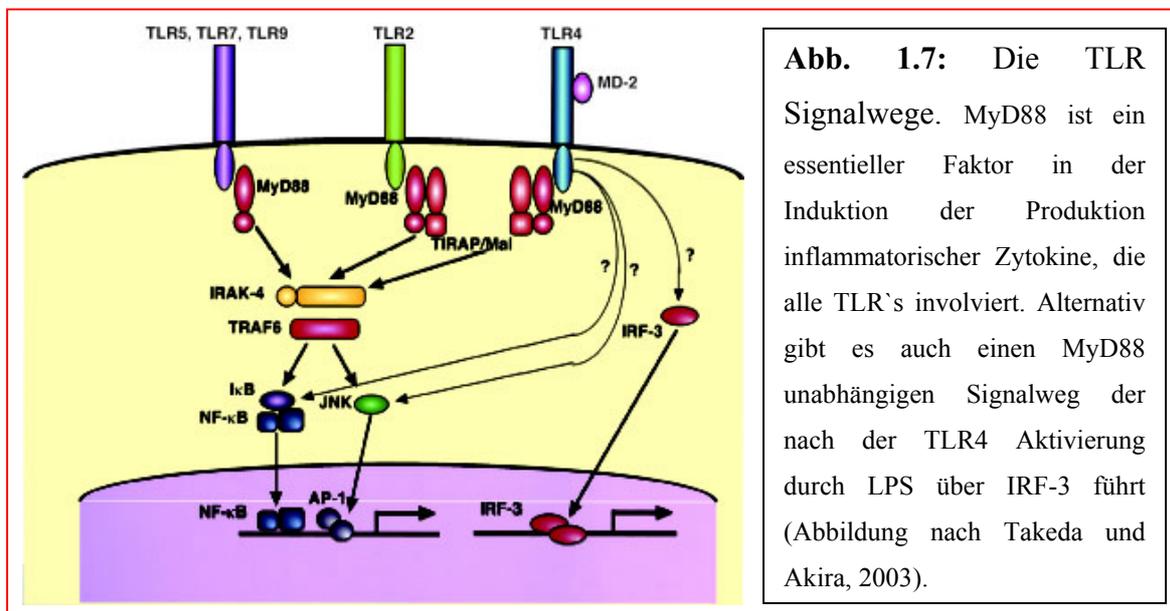


TLR1, TLR2 und TLR6 sind in der Erkennung von Lipoproteinen aus verschiedenen Pathogenen involviert (Takeuchi *et al.*, 2002, Alexopoulou *et al.*, 2002). Die Funktion von TLR3 ist in Reaktionen beschrieben worden, die die Produktion von Typ 1 Interferonen (IFN- α/β) auslösen (Alexopoulou *et al.*, 2002). Diese werden für die Abwehr gegen verschiedene Viren benötigt. Während ihrer Replikation produzieren die meisten Viren doppelsträngige RNA. Alexopoulou *et al.* konnten zeigen, dass TLR3 spezifisch doppelsträngige RNA erkennt. Die Erkennung von Lipopolysacchariden (LPS) durch TLR4 erfordert dagegen einige Zusatzmoleküle. So ist das Molekül MD-2 mit in die Erkennung von LPS eingebunden, das mit der extrazellulären Region des TLR4 assoziiert. Es amplifiziert die Reaktionsstärke gegen LPS (Shimazu *et al.*, 1999).

TLR5 erkennt auf direkte Weise Flagellin (Hayashi *et al.*, 2001), einen monomeren Bestandteil von bakteriellen Flagellen. TLR7 ist auf noch unbekannte Weise an der Immunabwehr gegen Viren beteiligt (Hemmi *et al.*, 2002) und TLR9, das nicht an der Zelloberfläche, sondern in endosomalen/vacuolären/vesiculären Kompartimenten exprimiert wird, erkennt CpG DNA (Ahmad-Nejad *et al.*, 2002)

1.5.1 Ähnlichkeiten der Signalwege der Toll-Ähnlichen Rezeptoren der Säuger mit der *Toll* Kaskade:

Signalwege, in denen die TLR's der Säuger involviert sind, besitzen ähnliche Eigenschaften wie die von *Drosophila* bekannte *Toll* Kaskade. In Abwehrmechanismen gegen Pilze und Gram-positive Bakterien werden die TIR Domänen der TLRs der Säuger sowie auch die TIR Domäne von Toll in *Drosophila* aktiviert. Die Säuger TLRs interagieren mit MyD88. MyD88 rekrutiert die IL-1 Rezeptor assoziierte Kinase IRAK4, die wiederum TRAF6 aktiviert. An diesem Punkt kann sich die Signalkette verzweigen. Entweder kommt es zur Aktivierung der JNK oder der NF- κ B Kaskade (siehe Abb. 1.7).



Alle TLR's vermitteln ihre Signale über MyD88. Allerdings können TLR4 und vielleicht auch in TLR3 Signale über eine alternativ-Kaskade weiterleiten, deren Komponenten bisher nicht alle identifiziert werden konnten, die aber von MyD88 unabhängig ist (Takeda und Akira, 2003). In dieser Kaskade kommt es zur Aktivierung von IRF-3, das ähnlich NF- κ B in die Zellkerne transportiert wird.

1.6 Allgemeine Untersuchungen zu Toll

Zwar hat *Toll* eine Schlüsselrolle in der Etablierung der dorsoventralen Asymmetrie in *Drosophila* und ist auch direkt an der Immunabwehr beteiligt, jedoch konnten bisher in der Tier- und Pflanzenwelt, abgesehen von den Dipteren, keine anderen Beispiele gefunden werden, in denen *Toll* so unterschiedliche duale Funktionen erfüllt. In Vertebraten konnten Toll-verwandte Rezeptoren in erster Linie in Bezug auf ihre Funktion in der Immunabwehr charakterisiert werden. Untersuchungen an einer Rolle der *Toll*-Kaskade in der dorsoventralen Achsenbildung in *Xenopus* führten nicht zu eindeutigen Resultaten. Es besteht allerdings die Möglichkeit, dass *Toll* eine untergeordnete oder permissive Rolle bei der Achsenbildung in *Xenopus* hat (Rupp *et al.*, 1994). Auch die Verfügbarkeit des *Caenorhabditis elegans* Genoms war nicht sehr aufschlussreich, denn bisher konnte die Existenz einer *Toll* ähnlichen Kaskade nicht zweifelsfrei bewiesen werden (Tan und Asubel, 2000). In Pflanzen sind bisher weit über 100 Moleküle, die eine TIR Domäne beinhalten, identifiziert worden, die meisten verfügten über Leucin-reiche-Wiederholungen. Allerdings ist die Anzahl der Proteine, die auch eine Transmembrandomäne besitzen, relativ gering. Das erste Beispiel eines *Toll* ähnlichen Moleküles, das eine parallele Funktion zu den Tier-Homologen erfüllt, kam aus der Tabak-Pflanze (Whitman *et al.*, 1994). In Tomaten wurde gezeigt, dass das Tabak *N-Gen* Produkt für die Resistenz gegen das Tabak Mosaik Virus von essentieller Bedeutung ist. Verschiedene Toll-ähnliche Moleküle wurden auch aus *Arabidopsis thaliana* isoliert, und deren Funktion in der Immunabwehr gezeigt: Die *RPP5* und *RPP1* Gene werden in der Immunabwehr gegen *Peronospora parasitica*, das *RPS4* Gen gegen bakterielle Infektion (Baker *et al.*, 1997), und das *FLS2* Gen durch Flagellin (Jebanathirajah *et al.*, 2002) aktiviert. Kurzgefasst agieren Toll ähnliche Moleküle auch in Pflanzen soweit bekannt nur in der Immunabwehr. Aus diesem Grund stellt sich die Frage zur ursprünglichen Funktion der Toll Kaskade: Wurde die Kaskade für die Immunabwehr entwickelt oder für die dorsoventrale Achsenbildung? Angesichts der oben erwähnten Immunfunktionen von Toll Molekülen aus verschiedensten Organismen, scheint es wahrscheinlicher, dass die Kaskade zunächst ihren Ursprung in der Immunabwehr hatte. Diese Aussage bedingt, dass die *Toll* Kaskade in der Evolution für die Achsenbildung neu kooptiert wurde (Maxton-Küchenmeister, 2000). Wann und wie dies zustande kam, kann mit den gegenwärtigen molekularen Kenntnissen nicht beantwortet werden. Deshalb sollten, ausgehend von *Drosophila*, zunächst durch Zurückverfolgung der dorsoventralen Achsenbildung sowie der Immunabwehrmechanismen in Insekten erste Aufschlüsse zum Ursprung und zur Evolution der Kaskade gesammelt werden. Neben den anderen *Drosophiliden* sind zum Beispiel auch in der niederen Diptere *Clogmia albipunctata*, in

Anopheles gambiae, und in der Orthoptere *Schistocerca americana* (Yamagata *et al.*, 1994) *Toll* Homologe entdeckt worden. Auch aus der Coleopteren *Tribolium castaneum* wurde ein *Toll* Homolog kloniert. Maxton-Küchenmeister konnte die zytoplasmatische cDNA Region eines *Toll* Homologs isolieren (Maxton-Küchenmeister *et al.*, 1999), das ich während meiner Diplomarbeit zur Klonierung der genomischen Region nutzte. Allerdings konnte ich nur durch die Analysen der Proteindomänen, und durch Sequenzvergleiche mit anderen *Toll* Homologen, die sich in einem phylogenetischen Stammbaum einordnen ließen (Basal, 2000), nicht eindeutig zeigen, dass es sich bei dem klonierten *Toll*, um das *Toll* Ortholog des *Drosophila Toll*s handelt, welches in der dorsoventralen Musterbildung fungiert. Allein das dorsoventral asymmetrische Expressionsmuster (Maxton-Küchenmeister *et al.*, 1999; Basal, 2000), und die räumliche Korrelation mit dem *Tribolium* Dorsal-Gradienten (Chen *et al.*, 2000) deuteten auf eine Orthologie zu *DmToll*.

1.7 Ziel der Arbeit:

Ziel dieser Arbeit waren molekulare und funktionelle Studien zur Rolle von *Toll* und einigen zygotischen Zielgenen der Kaskade im frühen *Tribolium* Embryo. Im Einzelnen sollte die cDNA von *TcToll* komplettiert und die Unterschiede in der Expression von *TcToll* und *DmToll* genauer untersucht werden. In diesem Zusammenhang war insbesondere die Frage der frühen zygotischen oder maternalen Expression von Interesse. Weiterhin sollte die puppale RNA-Interferenztechnik im Labor etabliert werden, die es erlaubt, auch maternale und frühe zygotische Gene auszuschalten. Mit Hilfe dieser Technik sollte eine funktionelle Analyse des *Toll* Gens und der ventral durch die Kaskade aktivierten Gene *twist* und *snail* vorgenommen werden.

2. Material und Methoden

2.1 Lösungen und Chemikalien

2.1.1 Häufig verwendete Lösungen und Chemikalien

CIA:	Chloroform/Isoamylalkohol im Verhältnis 49:1
deionisiertes Formamid:	1 l Formamid wird mit ca. 50 g Amberlite MB-3 Ionenaustauscherharz (Korngröße 20-30) 1-2 h lang, unter fortlaufender Messung der Leitfähigkeit, gerührt. Wenn die Leitfähigkeit unter 10 μ S gesunken ist, wird das Formamid filtriert und in Aliquots bei -20°C gelagert.
DEPC-H ₂ O:	0,1% (v/v) DEPC in H ₂ O 24 h bei RT inkubieren, anschließend autoklavieren
LB-Medium [-Platten]:	1% (w/v) Pepton 140 (Bacto Trypton) 0,5% (w/v) Hefe-Extrakt 0,5% (w/v) NaCl [1,5% (w/v) Agar]
NZY-Medium:	0,5% (w/v) NaCl 0,2% (w/v) MgSO ₄ · 7H ₂ O 0,5% (w/v) Hefe-Extrakt 1% (w/v) NZ Amine (<i>casein hydrolysate</i>)
PBS:	130 mM NaCl 7 mM Na ₂ HPO ₄ · 2 H ₂ O 3 mM NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O pH 7,4
PBST:	PBS mit 0,02% (v/v) Tween 20
PCIA:	50% (v/v) CIA 50% (v/v) Phenolreagenz unter 0,1 M Tris/HCl pH 8,0 bei 4°C lagern
Phenol-Reagenz:	Kristallines Phenol in 1 M Tris/HCl pH 8,0 lösen und mit diesem Puffer so oft extrahieren, bis der pH-Wert der wässrigen Phase über 7,0 bleibt. Die fertige Lösung wird unter 0,1 M Tris/HCl pH 8,0 bei 4°C, nach Zusatz von 0,1% 8-Hydroxychinolin, gelagert.
SSC:	150 mM NaCl 15 mM NaCitrat · 2H ₂ O, pH 7,0

STE:	300 mM NaCl 5 mM EDTA 20 mM Tris/HCl pH 8,0
TBE:	89 mM Tris Base 89 mM Borsäure 2 mM EDTA als 10x Stammlösung ansetzen, mit HCl auf pH 8,2 einstellen
TE:	10 mM Tris/HCl pH 8,0 0,1 mM EDTA

2.1.2 Konzentrationsangaben in Reaktionsansätzen

In Klammern, hinter einer Lösung oder Substanz, aufgeführte Konzentrationsangaben geben, sofern nicht gesondert vermerkt, immer die Konzentration der Stammlösung und nicht die Endkonzentration im fertigen Ansatz an.

2.2 Biologisches Material

2.2.1 Tierhaltung

Die in unserem Labor vorhandene *Tribolium castaneum* Herbst, Stamm Bernadino, (Coleoptera, Tenebrionidae) Kultur ist ein Ableger von M. Klinglers Zucht aus München (Wolff et al., 1998) und wurde bei 29 °C auf Weizen/Hefe-Futter gehalten (5% Bierhefe auf Demeter Weizen, grobschrötig, Typ 1700; M. Klingler, persönliche Mitteilung). Färbungen wurden mit Embryonen dieser Kultur durchgeführt.

2.2.2 Bakterienstämme

E. coli DH5 α : F⁻, Φ 80d, lacZ Δ M15, endA1, recA1, hsdR17 (r_k⁻, m_k⁺), supE44, thi-1, d⁻, gyrA96, Δ (lacZYA-argF), U169,

(Hanahan 1983).

E. coli XL1-Blue MRF⁺: $\Delta(mcrA)183$, $\Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)173$, endA1, supE44, thi-1, recA1, gyrA96, relA1, lac [F' proAB lacI^qZ Δ M15, Tn10 (tet^R)], (Bullock *et al.* 1987).

2.2.3 Vektoren

pBluescript[®] II KS [SK] amp^R, ColE1-ori, lacI, lacZ', T3-Promotor - *multi cloning site* (SacI...KpnI [KpnI...SacI]) - T7-Promotor
(Stratagene):

Topo 2.1 lacZ', fl ori, kan^R, amp^R, lacI, puc ori Plac, M13-forward Promotor - *multi cloning site* (Hind3-Apa1), T7-Promotor
(Invitrogen) M13-forward Promotor 2x

2.2.4 Molekulargewichtsstandards

1 kb DNA-Leiter Fragmentgrößen in bp:
(Gibco BRL): 75, 142, 154, 200, 220, 298, 344, 394, 506/516, 1018, 1635, 2036, 3054, 4072, 5090, 6118, 7126, 8144, 9162, 10180, 11198, 12216

2.2.5 Oligonukleotide

Die Synthese spezifischer *primer* wurde von den Firmen Eurogentech und Sigma durchgeführt. Die Nukleotidsequenz ist jeweils in 5' nach 3' Richtung angegeben.

Plasmid-primer:

T3-Promotor-*primer*: ATTAACCCTCACTAAAGGGA
 T7-Promotor-*primer*: TAATACGACTCACTATAGGG
 SP6-Promotor-*primer*: GATTTAGGTGACACTATAG
 KS-*primer*: CGAGGTCGACGGTATCG
 SK-*primer*: TCTAGAACTAGTGGATC

Toll-primer:

AB_intorf51 TCGCTATCGCTTTGTGCACTCGTCTT
 AB_intorf5` TTCAACCCCAAACATTTACCCAACAT
 A_BGF5 CTATCGCTTTGTGCACTCGTCTT
 A_BGF170 GACACTTACCTTTGCCCGTTTGATTA
 A_BCF58 TTTGACGCCTTTGTGAGTTATTCC
 A_BCF53 AAATTGTTTGACGCCTTTGTGAGT
 A_EGF5* GCTATCGCTTTGTGCACTCGTCTT
 A_ECF53 GAATTCAAATTGTTTGACGCCTTTGTGAGT
 A_ECF58 GAATTCTTTGACGCCTTTGTGAGTTATTC
 A_EGF170 ACACTTACCTTTGCCCGTTTGATTA
 AHCRXX TCGACCCTCACTCATTCCCTC
 AHGR273 GTTGGGTAAATGTTTGGGGTTGAA
 AHGR332 AAGCTTACCTTGAGGTGGTAAAGGACAAAA
 AB_DLF GACGCACCAACCCTTCCTACTCAAC
 AB_DLR GCGCCCCTCACTCACTCTCGTCCATAAG
 AB_RTLF GGAGTCGAAGACGTTTCAATGGTC
 AB_RTLR CTCCAATTTGACTGAAATTGGTCC

2.2.6 Antikörper

- Ziege- α -Kanninchen, biotyniliert (Vektor Laboratories)
- anti-DIG-Oxygenin konjugiertes AP, FAB Fragmente (Roche)
- Ziege- α -Kanninchen, Cy3
- Polyklonaler anti-Tctwist

2.3 Molekularbiologische Techniken

2.3.1 Präparation von Nukleinsäuren

2.3.1.1 Phenol/Chloroform-Extraktion

Durch Zugabe von Phenol zu einem Protein-DNA-Gemisch ist es möglich, die DNA vom Proteinanteil abzutrennen. Phenol denaturiert durch hydrophobe Wechselwirkungen die in der Lösung vorhandenen Proteine, was zu deren Ablösung von der DNA und Ansammlung in der phenolischen Phase führt, während die proteinfreie DNA in der wässrigen Phase akkumuliert. Um das überschüssige Phenol aus der wässrigen Phase zu entfernen, wird anschließend eine Chloroform-Extraktion durchgeführt.

Zur Minimierung der DNA-Verluste, die sich durch das Pipettieren ergeben, wird das Volumen der DNA-Lösung zu Beginn mit H₂O auf mindestens 100 µl eingestellt:

Zur DNA-Lösung wird ein Volumen Phenol zugegeben und bei leichtem vortexen gemischt. Anschließend wird das Gemisch zur Phasentrennung 5 min bei 14000 rpm zentrifugiert. Danach wird die obere wässrige Phase vorsichtig in ein neues Eppendorfgefäß überführt, 1 Vol Phenol/Chloroform (1:1) addiert und durch kräftigem schütteln gemischt. Zur Phasentrennung wird das Gemisch für 5 min bei 14000 rpm zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wird vorsichtig in ein neues Eppendorfgefäß überführt, 1 Vol Chloroform addiert, gevortext und 2 min bei 14000 rpm zur Phasentrennung zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wird vorsichtig in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Anschließend wird die DNA mit Alkohol gefällt.

2.3.1.2 Embryonale RNA Isolierung mit Trizol: (von GibcoBRL)

50 bis 100mg Embryonen werden in 1ml Trizol Reagenz in einem 2 ml Eppendorf Gefäß homogenisiert. Durch Zentrifugation bei 12,000 x g für 10 min bei 4°C wird das unlösliche Gewebematerial vom Überstand, das auch die RNA beinhaltet, getrennt. In einem neuen Eppendorf Gefäß wird der Überstand für 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wird zu jedem ml Trizol Reagenz das verwendet wurde 0,2 ml Chloroform addiert, 15 s kräftig geschüttelt, dann 3 min bei RT inkubiert, worauf eine 15 Minütige Zentrifugation bei 12,000 g bei 4°C

folgt. (Nach der Zentrifugation trennt sich das Gemisch in eine untere rote-, und eine obere transparente wässrige Phase, wobei die RNA nur in der oberen wässrigen Phase zu finden sein sollte.)

Anschließend wird die obere Phase in ein neues Eppendorf Gefäß überführt und die RNA mit 0,5 ml Isopropanol pro verwendetem ml Trizol Reagenz gefällt. Nach der Zugabe von Isopropanol wird das Gemisch 10 min bei RT inkubiert und anschließend 15 min bei 12,000 g bei 4°C zentrifugiert, wobei die RNA ein durchsichtiges Präzipitat bilden sollte. Der Überstand wird dann entfernt und das Pellet mit 75%igem Ethanol gewaschen. Nach 10 minütiger Lufttrocknung des Pellets wird die gesamte RNA in 50 µl RNase freiem Wasser gelöst. Zur Beschleunigung des Lösevorgangs kann die RNA für 10 min bei leichtem Schütteln auf 55- 60 °C erhitzt werden. Nach der Konzentrationsbestimmung sollte die RNA bei -80 °C gelagert werden.

2.3.1.3 Fällung von Nukleinsäuren mit Alkohol

Da für die Fällung von Nukleinsäuren mit Alkohol eine bestimmte Mindestkonzentration an monovalenten Kationen benötigt wird (0,2 M Na⁺,K⁺/ 0,5 M NH₄⁺), wird der Ansatz standardmäßig mit NaCl auf eine Endkonzentration von 0,3 M eingestellt, sofern dieser nicht schon eine geeignete Salzkonzentration aufweist. Anschließend werden 2,5 Vol Ethanol oder 1 Vol Isopropanol zugegeben und 20 min bei -20°C gekühlt. Danach werden die Nukleinsäuren durch Zentrifugation bei 14000 x g und 4°C für 15 min pelletiert. Nach Dekantieren des Überstands wird das Pellet mit 70% Ethanol gewaschen und erneut abzentrifugiert. Das Nukleinsäurepellet wird ca. 15 min luftgetrocknet, bevor es schließlich in entsprechendem Volumen dH₂O oder TE aufgenommen wird.

2.3.1.4 Präparation von Plasmid-DNA

Zur DNA-Präparation bakterieller Plasmide wurde das Macherey-Nagel NucleoSpin®-Kit verwendet. Dieses Kit ermöglicht eine schnelle und saubere Extraktion von Plasmid-DNA:

2 ml LB/Amp⁺-Medium werden mit einer *E. coli* Einzelkolonie inokuliert und üN bei 37°C auf dem Rollenschüttler inkubiert. Anschließend werden 1,5 ml der Bakterienkultur in ein Eppendorfgefäß überführt und 1 min bei 10000 rpm und RT zentrifugiert. Dann wird das Bakterienpellet in 200 µl Puffer A1 vorsichtig resuspendiert. Nach anschließender Addition

von 200 µl Puffer A2 wird die Suspension vorsichtig 4-6 mal invertiert. Nach 5 minütiger Inkubation wird 200 µl eiskalter Puffer A3 addiert, das Reaktionsgefäß 4-6 mal invertiert und erneut 5 min inkubiert. Im nächsten Schritt werden Zelltrümmer und Bakterielle DNA durch 10 minütiger Zentrifugation bei 14000 rpm und 4°C entfernt. Während der Zentrifugation wird das *Nucleo Vav manifold* nach Anleitung vorbereitet. Anschließend wird der Überstand auf die *NucleoSpin Plasmid Swellstrips*- Säulen geladen und Vakuum angelegt. Danach werden die *NucleoSpin Plasmid Swellstrips*- Säulen 1x mit 0,5 ml Puffer AE, und 2x mit 0,9 ml Puffer A4 gewaschen. Nach 5 min wird das Vakuum abgeschaltet und das *NucleoVav Manifold* belüftet. Danach werden die Säulchen mit einem Papiertuch gründlich abgetrocknet und das Auffangrack mit den Auffangssäulchen in das *NucleoVav manifold* eingesetzt. 100-150µl Elutionspuffer wird in die Mitte jeder Säule gegeben und 1-2 min bei RT inkubiert. Nach der Inkubation wird Vakuum angelegt und das Eluat in den Auffanggefäßen aufgenommen. Die Gefäße werden verschlossen, beschriftet und bei -20°C gelagert.

2.3.1.5 Präparative Isolierung von Plasmid-DNA

Für die Isolierung von Plasmid-DNA im präparativem Maßstab wird ein *Kit* der Firma *Qiagen* verwendet. Die Methode basiert ebenfalls auf einer alkalischen Lyse der Zellen. Im Anschluß daran erfolgt die Aufreinigung der DNA über eine Anionenaustauschersäule, bestehend aus modifiziertem Silicagel. Die DNA wird abschließend bei pH 8,2 und einer 1,25 M Salzkonzentration eluiert.

2.3.1.6 PCR Techniken

2.3.1.6.1 RACE-PCR Amplifikation:

Für die RACE PCR wird die zuvor synthetisierte RACE-Ready cDNA verwendet. Ein genspezifischer Primer ist auch von Nöten: Das PCR Gemisch besteht aus 5 µl 10X Advantage 2 PCR Buffer, 1 µl dNTP Mix (10 mM), 1 µl 50X Advantage 2 Polymerase Mix, 2,5 µl 5' RACE-Ready cDNA, 5µl UPM (Universal Primer Mix) und 1 µl genspezifischer Primer (10 µM). Das Gemisch wird durch Zugabe von 34,5 µl Wasser auf ein Endvolumen von 50 µl gebracht.

Für die PCR werden je nach der T_m der Primer 2 Programme vorgeschlagen:

A) Programm 1: Wenn der GSP (Gen spezifischer Primer) einen T_m Wert von über 70°C hat:

- 5 Zyklen:
94 °C 30 s
72 °C 3 min
- 5 Zyklen:
94 °C 30 s
70 °C 30 s
72 °C 3 min
- 25 Zyklen:
94 °C 30 s
68 °C 30 s
72 °C 3 min

B) Programm 2: Wenn der GSP einen T_m Wert zwischen 60 °C und 70°C hat:

- 25 Zyklen
94 °C 30 s
68 °C 30 s
72 °C 3 min

Da in der Regel nach dem ersten Lauf keine klaren PCR Produkte zu sehen sind, wird mit 2,5 µl des PCR Produkts eine zweite Runde PCR gefahren.

2.3.1.6.2 Standard PCR Amplifikation

Für Standard PCR Amplifikationen wurde das PCR Ready-Mix der Firma Sigma verwendet. PCR-Zyklen und Schmelztemperaturen wurden den verwendeten Primern angepasst. Bei den RT-PCR Amplifikationen wurde das PCR-Kit von Clontech verwendet.

2.3.1.7 Doppelstrang RNA Synthese

(Nach dem MEGAscript RNAi Kit Protokoll von Ambion):

Für die Synthese der doppelstrang RNA werden primere für das zu inhibierende Genprodukt produziert, an die T7 RNA Polymerase Bindungsstellen gekoppelt werden. Mit den primern wird ein PCR gefahren, durch die das Genfragment amplifiziert wird, wobei die 5' Enden die

Bindungsstellen enthalten. Anschließend wird das PCR Produkt in ein Klonierungsvektor ligiert. Zum herstellen von Terminationsstellen wird das Plasmid linearisiert. Der Linearisierungsverdau wird durch Zugabe von

1/20'tel Volumen 0,5 M EDTA
1/10'tel Volumen 3 M NaOAc
und 2 Volumen Ethanol gestoppt.

Das gemisch wird kräftig gerührt und anschließend bei -20°C für 15 min. gefällt. Das Pellet wird in $30\mu\text{l}$ DEPC H_2O gelöst.

Für die Zusammensetzung der Transkriptionsreaktion wird zu 1-2 μg lineariertem Template DNA,

2 μl 10x T7 Reaction Buffer,
2 μl ATP Solution,
2 μl CTP Solution,
2 μl GTP Solution,
2 μl UTP Solution,
2 μl T7 Enzym Mix

zugegeben, das Gemisch auf 20 μl mit DEPC H_2O aufgefüllt und das Mix leicht geschüttelt und dann zentrifugiert, um das Mix am Boden des Reaktionsgefäßes zu sammeln. Die Transkriptionsreaktion findet bei 37°C in einer Zeit von 2-4 h statt. Für die doppelstrang RNA Hybridisierung wird das Mix bei 75°C für 5 min. inkubiert und anschließend auf RT runtergekühlt. Für die Qualitäts- und die Konzentrationsbestimmung wird mit dem 1/400'tel des Reaktionsgemisches ein 1%iges Agarose Gel gefahren.

Für das Entfernen von Template DNA und ssRNA eine DNase und RNase Verdau durchgeführt. Dazu wird zu

20 μl dsRNA
21 μl DEPC H_2O
5 μl 10x Digestion Puffer
2 μl DNase 1

2 μl RNase zugegeben und für 1 h bei 37°C inkubiert.

Um die dsRNA Lösung von den Proteinen, freien Nukleotiden und Nukleinsäuren in den vorgangenen Reaktionen zu befreien wird die folgende Reaktion angesetzt: Zu

50 µl dsRNA wird

50 µl 10x Binding Buffer

150 µl DEPC H₂O und

250 µl 100% Ethanol zugegeben und das Gemisch leicht gerührt und zu einer vom Kit Hersteller zur Verfügung gestellten Filtersäule pipettiert. Danach wird das ganze für 2 min bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Anschließend wird zum Filter 500 µl Waschlösung addiert und wie oben beschrieben zentrifugiert. Die gesamten Waschschrte werden ein zweites mal wiederholt. Dann wird das Filter in ein frisches Sammelgefäß überführt und 50 µl Elutionslösung zugegeben. Nach 1 minütiger Inkubation wird zum eluieren der dsRNA 2 min bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Mit proportionalen Mengen wird ein Agarose Gel gefahren und die Konzentration und Qualität der dsRNA bestimmt.

2.3.1.8 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Photometrische Bestimmung

Die Konzentration von Nukleinsäure-Lösungen lässt sich durch Messung der Extinktion bei 260 nm bestimmen. Die Lösung wird mit dH₂O geeignet verdünnt und in einer Quarzküvette gegen H₂O gemessen.

Der Reinheitsgrad der Lösung wird durch den Quotienten OD_{260}/OD_{280} charakterisiert. Für eine reine Nukleinsäure-Lösung erwartet man einen Wert von ca. 1,8-2,0.

- $OD_{260} = 1$ entspricht
 - 50 µg/ml doppelsträngiger DNA
 - 40 µg/ml einzelsträngiger DNA oder RNA
 - 20 µg/ml Oligonukleotiden

Bestimmung auf einem Agarose- Gel

Die Menge an mit Ethidiumbromid gefärbter DNA läßt sich auf einem Agarose- Gel anhand eines zusätzlich aufgetragenen Mengenmarkers bekannter Größe und Konzentration bestimmen, indem die Bandenintensität von Marker und Probe verglichen wird.

2.3.2 Restriktionsanalysen

Restriktionsendonukleasen schneiden doppelsträngige DNA an den für jedes Enzym spezifischen Erkennungssequenzen. Je nach verwendetem Enzym können glatte Enden oder - durch ein versetztes Schneiden - überhängende Enden entstehen. Für ein Standard-Restriktionsansatz wird zu 0,2-5 µg der zu spaltenden DNA 1/10 Volumen des vom Herstellers empfohlenen 10x Puffers zugegeben. Anschließend wird der Reaktionsansatz mit dH₂O zu 10-200 µl aufaddiert. Zum Schluss wird 3-4 U Enzym pro µg DNA hinzugefügt und 1-2 h bei der für das Enzym angegebener Inkubationstemperatur (meist 37°C) inkubiert.

Ein Teil des Verdaus wird danach auf einem Gel aufgetragen und nach erfolgter Elektrophorese analysiert.

2.3.3 Elektrophorese von DNA-Fragmenten

2.3.3.1 Standard-Gelelektrophorese

Mit Hilfe der Gelelektrophorese ist es möglich DNA-Fragmente aufzutrennen. Diese Auftrennung ist abhängig von Größe und Form der DNA: Größere Fragmente laufen langsamer als kleinere und zirkuläre schneller als lineare gleicher Größe. Es gibt zwei unterschiedliche Substanzen, in denen DNA aufgetrennt wird: Agarose und Polyacrylamid. Letzteres wird zur Auftrennung hauptsächlich kleinerer Fragmente benutzt. Die Auflösung ist dabei abhängig von der Konzentration des Gels.

Die entsprechende Agarosemenge wird in 1x TBE-Puffer aufgeköcht, bis sie vollständig gelöst ist. Dann wird es bis ca. 60°C abgekühlt. Nach Zugabe von Ethidiumbromid (Endkonzentration von 0,5µg/ml) wird die Agaroselösung in die mit Taschenformer vorbereitete Gelgießapparatur gegossen und erstarrt. Danach werden die Proben mit 1/10 Vol Farbmaler versetzt und in die Taschen aufgetragen. Die Elektrophorese wird in 1x TBE-Puffer mit ca. 5 V/cm durchgeführt. Nach der Elektrophorese findet die Analyse der DNA-Auftrennung auf dem UV-Transilluminator statt.

2.3.4 Klonierungstechniken

2.3.4.1 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die zuvor mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen geschnittenen DNA-Fragmente werden über Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und die Banden von Interesse möglichst genau ausgeschnitten. Die Aufreinigung der DNA erfolgt mit Hilfe des Qiaquick Gel Extraction-Kits. Dazu wird ein ausgeschnittenes Gelstück gewogen und 3 Vol Puffer QG/ 100µg Gelstück zugegeben. Für höher oder niedriger konzentrierte Agarose Gelstücke gilt:

Für > 2% Gele	+6 Vol Puffer QG
Für < 0,7% Gele	+3 Vol Puffer QG + 2 Vol H ₂ O

Nach der Zugabe von Puffer QG wird das Gel-Puffer Gemisch 10 min bei 50°C bei gelegentlichem vortexen inkubiert, bis sich das Gelstück vollkommen aufgelöst hat. Danach wird ein Gelvolumen Isopropanol addiert, um die DNA Ausbeute zu erhöhen, (jedoch hat dieser Schritt bei Fragmentgrößen, die kleiner als 500bp, und größer als 4,0 kb sind keine Auswirkungen auf die Ausbeute). Im nächsten Schritt wird ein QIAquick Säulchen in einen vom Hersteller beigefügten Auffangröhrchen plaziert. Um die DNA an die QIAquick Säulchen zu binden, wird die DNA-Lösung (d.h. Puffer QG+ Gelstück) auf das QIAquick Säulchen gegeben und 1 bei 14000 rpm. zentrifugiert. Der Durchfluss im Auffangröhrchen wird dekantiert und das QIAquick Säulchen zurück in das Auffangröhrchen plaziert. Um auch sehr geringe Mengen von Agarose zu entfernen, wird 0,5 ml Puffer QG addiert und 1 min bei 14000 rpm. zentrifugiert. Danach wird die Säule durch Addition von 0,75 ml Puffer PE und anschließender Zentrifugation bei 14000 rpm. für 1 min. gewaschen. Der Durchfluss wird dekantiert und das Röhrchen noch einmal für 1min zentrifugiert, um auch Reste vom Puffer QG zu entfernen. Anschließend wird das QIAquick Säulchen in ein frisches Eppendorfgefäß überführt. Um die DNA zu eluieren, wird 50 µl Puffer EB oder dH₂O in die Mitte des QIAquick Membranes gegeben, 1 min inkubiert und anschließend 1 min bei 14000 rpm. zentrifugiert. Um höhere Konzentrationen zu erlangen, ist es auch möglich, die DNA in 30 µl Puffer EB oder H₂O zu lösen.

2.3.4.2 5'-Dephosphorylierung von Vektor-DNA

Wird bei einer Ligation Vektor-DNA eingesetzt, die mit nur einem Restriktionsenzym linearisiert wurde, so sollte diese zuvor an ihren 5'-Enden dephosphoryliert werden, um eine mögliche intramolekulare Rezirkularisierung des Vektormoleküls auszuschließen.

Die Abspaltung des Phosphatrestes erfolgt durch alkalische Phosphatase (*CIP*):

20 µl linearisierte Vektor-DNA (1 µg)
3 µl 10x *CIP*-Puffer
2 µl *CIP* (1 U/µl), (*Boehringer Mannheim*)
ad 30 µl mit dH₂O
Inkubation bei 37°C für 1 h

10x *CIP*-Puffer: 500 mM Tris/HCl pH 9,0
 10 mM MgCl₂
 1 mM ZnCl₂
 10 mM Spermidin

Anschließend wird die Reaktion folgendermaßen gestoppt:

5 µl 10% (w/v) SDS
5 µl 10x STE-Puffer
ad 50 µl mit dH₂O
Inkubation bei 68°C für 15 min

Nach einer PCIA- und CIA-Extraktion wird die DNA mit Ethanol gefällt und in 20 µl dH₂O resuspendiert.

2.3.4.3 Ligation von DNA-Fragmenten

Zur Vermehrung oder weiteren Charakterisierung werden die, durch Restriktionsanalyse etc. erhaltenen, DNA-Fragmente in geeignete Vektoren kloniert. Für die Ligation werden 25-50 ng linearisierter Vektor sowie ein 2-3 facher molarer Überschuß an Fragment eingesetzt. Die Ligation erfolgt bei Molekülen mit überstehenden Enden (*sticky ends*) über Nacht bei 16°C. Ein typischer Ansatz sieht folgendermaßen aus:

7 µl DNA-Fragment
1 µl Vektor-DNA (25 ng/µl)
1 µl 10x Ligationspuffer (enthält rATP)
1 µl T4-DNA-Ligase (5 U/µl), (*Promega*)

2.3.4.4 Herstellung kompetenter *Escherichia coli*-Zellen

Da *Escherichia* im Gegensatz zu anderen Bakteriengattungen wie *Bacillus* oder *Streptococcus* keine natürliche Aufnahmebereitschaft für DNA besitzt, muss diese sog. Kompetenz durch besondere Behandlung der Zellen induziert werden, bevor eine effektive Transformation mit Plasmid-DNA möglich ist.

Zu diesem Zweck werden 20 ml LB Medium mit 1 Kolonie des entsprechenden *E. c.*-Stammes angeimpft und über Nacht bei 37°C, bis zum Erreichen der stationären Phase, geschüttelt. 1 ml dieser Kultur wird danach mit LB⁺⁺ Medium 1:100 verdünnt und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4-0,6 bei 37°C auf dem Schüttler inkubiert. Anschließend wird die Bakterienkultur 10 min auf Eis gekühlt und dann bei 5000 x g und 4°C für 10 min geerntet. Das Pellet wird vorsichtig in 30 ml TFB I resuspendiert und weitere 10 min auf Eis gekühlt, bevor die Zellen erneut abzentrifugiert werden. Der Überstand wird vorsichtig dekantiert und die pelletierten Bakterien in 4 ml TFB II aufgenommen. Die nun kompetenten Zellen werden zu je 200 µl in Eppendorfgefäße aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Mit den so hergestellten, kompetenten Zellen können Transformationseffizienzen von ca. 10⁷ *colony forming units*/µg *supercoiled*-DNA erzielt werden.

LB⁺⁺-Medium: LB Medium mit 20 mM MgSO₄ und 10 mM KCl

TFB I: 100 mM RbCl
 50 mM MnCl₂
 10 mM CaCl₂
 30 mM K-Acetat pH 5,8
 15% (v/v) Glycerin

TFB II: 10 mM RbCl
 75 mM CaCl₂
 10 mM Na-MOPS pH 7,0
 15% (v/v) Glycerin

2.3.4.5 Transformation von *E.coli*-Zellen

Ein 200 µl Aliquot kompetenter Zellen wird ca. 10 min auf Eis aufgetaut, mit maximal 5-10 µl eines Ligationsansatzes gemischt und weitere 20 min, unter gelegentlichem Schütteln, auf Eis inkubiert. Anschließend werden die Zellen für 90 s einem Hitzeschock bei 42°C ausgesetzt. Nach Abkühlung auf Eis (ca. 5 min) werden 400-600 µl LB Medium zugesetzt und die Kultur 1 h lang bei 37°C, zur Ausbildung der mit dem Plasmid eingebrachten Antibiotikaresistenz, inkubiert.

Geeignete Verdünnungen werden zur Selektion auf LB-Antibiotika Platten ausplattiert und über Nacht bei 37°C angezogen.

2.2.4.6 α -Komplementations-Tests von Bakterien (Blau-Weiss Selektion)

Viele Vektoren (u.a. pBluescript® II KS [SK] und Topo 2.1) besitzen ein kurzes Segment von *E.coli* DNA, das die regulatorischen Sequenzen und die kodierenden Informationen für die ersten 146 Aminosäuren des β -Galaktosidase (*lacZ*) Gens beinhaltet. In diese kodierende Region ist eine 'polycloning site' eingebaut, die nicht den offenen Leseraster unterbricht, sondern nur einige Aminosäuren in das N-terminale Fragment des β -Galaktosidase Gens einfügt, das nicht von Bedeutung ist. Vektoren solcher Art werden in Zellen angewendet die, die C-terminale Portion von β -Galaktosidase selber produzieren. Wenn das vom Vektor kodierte N-terminale Fragment und das von der Zelle kodierte C-terminale Fragment assoziieren, bilden sie ein Enzymatisch aktives Protein. Diese Art von Komplementation heißt α -Komplementation (Ullmann et al., 1967). Die durch die α -Komplementation resultierenden Lac⁺ Bakterien können leicht festgestellt werden, weil sie in der Präsenz des chromogenischen Substrats 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-Galaktosidase (X-gal) blaue Kolonien bilden. Jedoch, nach einer Fragment-Inserierung von fremd-DNA in die 'polycloning site' des Plasmids wird ein N-terminales Fragment produziert, das nicht in der Lage ist, zu α -komplementieren. Bakterien die, dieses rekombinante Plasmid beinhalten, produzieren weiße Kolonien. Innerhalb weniger Stunden können so tausende Kolonien nach der Präsenz des gewünschten Inserts untersucht werden.

Für den α -Komplementations Test wird eine LB-Amp Platte mit 40 μ l X-Gal (20mg/ml in Dimethylformamid), und 4 μ l Isopropylthio- β -D-Galaktosidase (IPTG, 200 mg/ml) ausgestrichen und bei 37°C zum trocknen inkubiert. Anschließend werden die Platten mit den zu testenden Bakterien inokuliert und 12-16 h bei 37°C inkubiert. Dann werden die Platten für die Farbentwicklung einige Stunden bei 4°C im dunkeln inkubiert. Kolonien die, das aktive β -Galaktosidase Enzym besitzen, werden blau gefärbt.

2.3.5 DNA-Sequenzierung

Die DNA Sequenzierung erfolgte auf einem ABI-Sequencer (Modell 373 und 377) mit dem DYE-Terminstor Kit von Perkin-Elmer. Die DNAA zur Sequenzierung wurde nach dem von Stemmer beschriebenen Verfahren gereinigt. Für die Reinigung einzelsträngiger DNA wurden der Bakterienstamm TG1 und der Helferphage M13K07 (Promega) eingesetzt.

2.3.6 Markierung von Nukleinsäuren

2.3.6.1 Herstellung digoxigenerter *in vitro*-Transkripte

Vektoren die, die Sequenz des nach dem Expressionsmuster zu durchsuchende mRNA beinhaltet, wird mit einem passenden Restriktionsenzym linearisiert, Phenol-extrahiert und Ethanol gefällt. Für die *in vitro* Trranskriptions-Reaktion wird zu 1 μ g des linearisierten Vektor DNA's 1 μ l plazental RNase inhibitor, 2 μ l Digoxigenin Mix, und 2 μ l RNA Polymerase (T3 oder T7) (Boehringer Mannheim), pipettiert und mit DEPC Wasser zu einem Gesamtvolumen von 20 μ l aufgearbeitet. Nach zwei Stündiger Inkubation bei 37°C wird 30 μ l DEPC H₂O, und 50 μ l Carbonat Puffer addiert und 40 min bei 70°C inkubiert. Danach wird die Reaktion mit 100 μ l Stop Lösung (Boehringer), gestoppt, und 5 μ l tRNA und 45 μ l LiCl (Endkonzentration 0,4 M), dazupipettiert. Nach kurzem Vortexen wird die Probe mit 500 μ l Ethanol präzipitiert, zweimal mit 70% Ethanol gewaschen und das Pellet in 100 μ l Hybridisierungslösung aufgenommen.

2.3.6.2 Plaque lift-Transfer

(Benton and Davis 1977)

Die über Nacht bei 37°C inkubierten Agarplatten mit den Phagenplaques werden auf RT abgekühlt. Anschließend wird für 30 s eine trockene Nylonmembran aufgelegt und deren Position auf der Platte mit einer Nadel markiert. Dann wird diese Membran für 2 min durch eine zweite Membran ersetzt, wobei die Markierungen übertragen werden. Die beiden Membranen werden daraufhin für 10 min auf einem, mit Denaturierungslösung angefeuchteten, Filterpapier denaturiert, danach auf einem frischen Filterpapier luftgetrocknet und dann für mindestens 10 min auf einem, in Neutralisierungslösung getränkten, Filterpapier neutralisiert. Anschließend wird die Membran kurz in 2x SSC geschwenkt. Nach Trocknung des Filters werden die Nukleinsäuren schließlich mit 80 mJ im UV-Stratalinker auf der Membran fixiert.

2.3.7 Konstruktion der Tribolium Genomischen Bank

(Nach Handel und Roth)

Die genomische DNA von Larven wurde nach Standard Protokollen gefertigt. Nach partiellem Verdau mit Sau3A wurde die DNA im Sucrose Gradient größenfraktioniert. Die gewünschten Sucrose Fraktionen mit einer Größe von 9-23 kb wurden mit Hilfe des Lambda DASH II/BAMHI Vektor Kits (Stratagene) an die Lambda Arme ligiert. Die ligierte DNA wurde mit dem Gigapack III Gold Packaging Extract (Stratagene) nach Angaben des Herstellers in Phagenköpfe verpackt.

2.3.8 RACE: Rapid Amplifikation of cDNA Ends

(nach dem Protokoll von Smart Race cDNA Amplification Kit von BD Biosciences):

Durch diese Prozedur wird aus der gesamt RNA, 5' bzw 3' cDNA Fragmente erzeugt:

Einzelstrang cDNA Synthese:

Im ersten Schritt wird zur Verwendung in der RACE-PCR aus 50ng-1µg gesamt RNA Einzelstrang cDNA synthetisiert. Für die 5' RACE-Ready-cDNA Synthese wird 1-3µl gesamt RNA mit 1 µl 5' CDS primer und 1 µl Smart II A oligo gemischt und mit sterilem Wasser auf einem Volumen von 5 µl gebracht. Danach wird das Gemisch 2 min bei 70°C inkubiert, bevor es auf Eis für 2 min heruntergekühlt wird. Anschließend werden 2 µl 5X First-Strand Puffer, 1µl DTT (20 mM), 1µl dNTP Mix (10mM) und 1 µl PowerScript Reverse Transcriptase zu einem Endvolumen von 10 µl addiert. Nach leichtem rühren und abzentrifugieren wird das Gemisch 1,5 h bei 42°C inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wird die cDNA durch Zugabe von 250 µl Tricine-EDTA Puffer verdünnt und die Reaktion durch eine 7 minütige Inkubation bei 72°C gestoppt. Die cDNA kann dann bei – 20°C gelagert werden und ist für mindestens 3 Monate verwendbar. Der Vorteil dieses Protokolls ist, dass während der cDNA Synthese, eine spezifische Sequenz an das 5' Ende addiert wird, gegen die in der RACE-PCR komplementäre Primer verwendet werden kann.

Notiz 1: Die synthetisierte cDNA wird anschließend in der RACE-PCR verwendet (siehe Kapitel 4.3.1.6.1).

Notiz 2: Für die cDNA die aus unbefruchteten Eiern produziert wurde, wurden die oligo dT, und die 5' Random Primer von Clontech verwendet.

2.4 Embryologie

2.4.1 Fixierung von Embryonen

Fixierungen von Embryonen werden nach der Dechorionisierung (in 50% Chlorox), durchgeführt. Die Embryonen werden in das Heptan-Fix Gemisch (siehe unten) überführt und 20 min auf dem Drehschüttler geschüttelt. Die untere, wässrige Phase und ein Teil der oberen Heptanphase werden entnommen und das doppelte Volumen an Methanol der verbliebenen oberen Phase zugegeben. Zur Devitellinisierung werden die Embryonen für 1 min kräftig geschüttelt und anschließend die obere Phase und ein Großteil des Methanols entfernt. Danach werden die Embryonen drei mal mit Methanol gewaschen, mit einer abgeschnittenen Pippetenspitze in eine Eppendorfgefäß überführt und können so in 100% Methanol bei –20°C gelagert werden.

Für Fluoreszenz Färbungen mit F-Actin werden die Eier nach der Dechorionisierung in einem 1:1 Heptan/Formaldehyd Gemisch für 25 min. fixiert und ohne Methanol Behandlung in PBS-0,1% Triton überführt. Danach werden die Eier auf eine mit Klebstoff beschichtete Petri Schale ausgebreitet. Nach dem Auffüllen der Petri Schale mit PBS-0,1% Triton werden die Eier mit Hilfe einer Wolfram Nadel Hand-devitellinisiert.

Das Heptan-Fix Gemisch besteht aus:

4 ml PEMS
 5 ml Heptan
 1 ml 20% Paraformaldehyd

PEMS:

0,1 Pipes	6,04 g
2 mM MgSO ₄	0,4 ml
1mM EGTA	<u>0,2 ml</u>
	200 ml pH 6,9

2.4.2 Behandlung der dsRNA Injizierten Puppen:

Die dsRNA Injizierten Puppen werden mit Instant Mehl leicht überschichtet und bei 30°C bis zum Schlüpfen gehalten. Nach dem alle Puppen geschlüpft sind wird zu den Weibchen im Verhältnis von 1/3 Männchen zugegeben. Am 4. Tag werden dann die ersten Eiablagen prepariert. Alle zwei Tage werden die Eier gesammelt und fixiert, entweder in Methanol gehalten oder Hand-devitellinisiert.

2.4.3 Antikörperfärbung von Embryonen

Antikörperfärbungen ermöglichen die Detektion von Genexpressionen auf Proteinebene. Dafür wird ein spezifischer Antikörper hergestellt, der die einzigartigen Epitope an dem gewünschten Protein erkennt und an sie bindet. Dieser Antikörper wird mit einer zusätzlichen Erkennungsstelle ausgestattet, das ermöglicht von einem zweiten Antikörper, an dem ein Enzym für die Farbreaktion gekoppelt ist, erkannt zu werden. In der klassischen Methode wird nach Zugabe des Substrats die Farbreaktion an den Bindungsstellen des ersten

Antikörpers verfolgt. In den moderneren Fluoreszenz Antikörper Färbungen ist der zweite Antikörper mit einem Fluoreszierendem Marker ausgestattet (in unseren anti-TcTwist Färbungen mit Cy3) welches ermöglicht, spezifische Färbungen mit Hilfe eines Fluoreszenz-Mikroskopes nachzuweisen.

Erster Antikörper

In der klassischen Methode werden für die anti-TcTwist Antikörperfärbung ca. 100-200 Embryonen in ein Eppendorfgefäß überführt und in drei Schritten mit geeigneten Mischungen von Methanol und PBST von der Alkoholischen Phase in die wässrige Phase überführt (rehydriert). Die Inkubationen mit den Mischungen sehen so aus:

1x waschen mit: 500 µl Methanol/500 µl PBST

1x waschen mit: PBST

1x Inkubation: 20 min in 1000 µl Pf/PBST (4% PF in PBST)

Die letzte methanolhaltige Lösung wird entnommen, und die Embryonen 1x in PBST für 5 min inkubiert. Anschließend werden die Embryonen 3x in PBST 1% BSA für 30 min gewaschen. Die Lösung wird entnommen und der Antikörper (1/1000 verdünnt in PBST 1% BSA) zugegeben. Die Inkubation erfolgt bei leichtem Schütteln entweder für 4 h bei RT oder üN bei 4°C. Danach werden die Embryonen 2x kurz in PBST gewaschen und 4x in PBST 1% BSA für 30 min inkubiert.

Zweiter Antikörper

Nach der Entnahme der Waschlösung werden den Embryonen,

in der klassischen Färbung das biotinylierte (GaR) und preabsorbte Antikörper (in PBST 1% BSA 1/1000 verdünnt) oder

in der Fluoreszenz Färbung der Cy3 gekoppelte Antikörper (Verdünnung von 1/500 in PBS-0,1% Triton – Zugabe und weiterer Ablauf der Färbung geschieht im Dunkeln),

zugegeben und 1-4 h bei RT oder üN bei 4°C bei leichtem Schütteln inkubiert. Anschließend 2x kurz, und 3x für 30 min mit PBS 0,2% Tween bzw. 0,1 % Triton bei leichtem schütteln

gewaschen. Die Fluoreszenz Färbungen werden anschließend in Vectashield Medium eingebettet und werden analysiert. In der klassischen Methode folgt die HRP Reaktion.

HRP Reaktion

10 μl `` A `` (Avidin) und 10 μl `` B `` (Biotin) (Vectastain- Peroxidase Standard Kit, Vektor Laboratories) werden in 1 ml PBST (ABC/PBST) gemischt und 30 min inkubiert. Dann werden die Embryos im ABC/ PBST für 30-60 min inkubiert und anschließend 3x für 5-10 min mit PBST gewaschen.

Färbung

Nach der Entnahme von PBST werden die Embryonen in DAB Solution resuspendiert. Im nächsten Schritt wird die DAB Lösung mit der DAB/ H_2O_2 Lösung ausgetauscht und die Farbreaktion unter dem Mikroskop verfolgt. Nachdem die Embryonen das gewünschte Stadium erreicht haben, wird die Färbung durch Zugabe von 0,02% NaN_3 gestoppt. Anschließend werden die Embryonen 3x mit PBST gewaschen.

Verwendete Lösungen:

PBST:	PBS + 0,2% Tween 20
DAB soln:	2 ml PBST + 200 μl 10x DAB
DAB/ H_2O_2 :	1 ml BAB soln. + 2 μl H_2O_2 (1/10 vorverdünnt)

2.4.4 F-Actin (Phalloidin) Färbung mit *Tribolium* Embryonen

Für die Phalloidin Färbung werden 100-200 Hand devitellinisierte Embryonen in einem Eppendorf Gefäß überführt und 3x mit PBS-0,1% Triton gewaschen. Anschließend werden die Embryonen 3x 15 min in PBS-0,1% Triton inkubiert. Danach werden die Embryonen 2h in PBS-2% Triton inkubiert. Anschließend wird im dunkeln Phalloidin (Konz: 1/350 in PBS-0,1% Triton) zugegeben und 2h bei RT inkubiert. Darauf folgen 3 malige Waschschrte mit PBS-0,1% Triton. Als letztes werden die Embryonen 3x 15 min. mit PBS-0,1% Triton

gewaschen, dann auf einem Objektträger in Vectashield eingebettet und an einem Fluoreszenz Mikroskop analysiert.

2.4.5 In situ Hybridisierung von *Tribolium* Embryonen mit RNA Probe

(modifiziert nach Tautz und Pfeifle, 1989)

In-situ Hybridisierungen ermöglichen die Detektion bestimmter mRNA's in Geweben. Durch Verwendung von Digoxigenin markierten antisense Proben können Gene nach ihrem Expressionsmuster auf Nukleinsäure Ebene untersucht werden.

Die vorher fixierten Embryonen werden in drei Schritten rehydriert:

1x waschen mit: 500 µl Methanol/500 µl PBST

1x waschen mit: PBST

1x Inkubation: 20 min in 1000 µl Pf/PBST (4% PF in PBST)

Danach werden die Embryonen 2x kurz, und 3x für 5 min in PBST bei RT gewaschen, anschließend für 30 s in PBST + 50 µg/ml Proteinase K und 2 min in 2 mg/ml Glycin in PBST inkubiert. Gleich danach 4x mit PBST gewaschen und für 20 min in PF/PBST (4% PF in PBST), refixiert. Den 3x mit PBST und 2x für 5 min mit PBST Waschschritten folgen Inkubationen für 10 min in 1:1 Hybridisierungs-Lösung(Hyb. Lsg.)/PBST, und für 10 min in Hyb. Lsg., (beide Schritte bei RT).

*Die Embryonen können in dieser Phase bei -20°C gelagert werden.

Anschließend folgt die Prähybridisierung der Embryonen für 1h bei 55°C in Hyb. Lsg.+ 100 µg/ml Lachsspermien DNA. Der Überstand wird dann abgenommen, das Probe-Mix dazupipettiert und ün. bei 55°C inkubiert (Probe-Mix: 50 µl Hyb. Lsg./DNA + 1-2 µl RNA Probe).

Am nächsten Tag wird die Probe entfernt und die Embryonen 3x kurz mit vorgewärmter Hyb. Lsg. gewaschen. Anschließend folgen 4 Waschschriffe mit Hyb. Lsg. bei 55°C je 30 min. Die schrittweise Überführung von der Hyb. Lsg. zu PBST ist wie folgt:

10 min in 4:1 Hyb. Lsg./ PBST bei 55°C

10 min in 3:2 Hyb. Lsg./ PBST bei 55°C

10 min in 2:3 Hyb. Lsg./ PBST bei 55°C

10 min in 1:4 Hyb. Lsg./ PBST bei bei RT

Es folgen 2 Inkubationsschritte in PBST/1% BSA für jeweils 20 min bei RT, und 1 kurzer Waschschrift mit PBST. Danach erfolgt die Inkubation mit dem PBST/ α - Digoxigenin-AP konjugiertem Antikörper (Verdünnung 1/5000), für 90 min bei RT auf dem Drehrad. Im nächsten Schritt werden die Embryonen 3x kurz mit PBST, 3x für 15 min mit PBST, und 3x für 5 min mit RNA-AP Puffer gewaschen. Während dieser Schritte wird die Farblösung vorbereitet: 1 ml RNA-AP Puffer wird in ein Eppendorfgefäß überführt, 3,5 μ l X-Phosphat Lösung addiert, kräftig geschüttelt, 4,5 μ l NBT (Nitro Tetrazolium Blau) dazupipettiert und noch mal kräftig geschüttelt. Danach werden die Embryonen in RNA-AP Puffer in 'depression slides' überführt. Das RNA-AP Puffer wird entnommen und 500 μ l von der Farblösung addiert. Zur Farbentwicklung sollten die Embryonen im dunkeln inkubiert werden. Die Reaktion kann bis zu 3 h dauern und sollte mit 15 minütigen Intervallen unter dem Mikroskop verfolgt werden. Nach dem die Farbreaktion das gewünschte Stadium erreicht hat, werden die Embryonen in ein Eppendorfgefäß transferiert und 4x mit PBST gewaschen. Es folgen folgende Inkubationsschritte zur Dehydrierung:

- 10 min in 70% Ethanol
- 10 min in 100% Ethanol
- 10 min in trocken Ethanol
- 2x 10 min in trocken Aceton
- 1:1 trocken Aceton/Araldit

Die gefärbten Embryonen werden in einem kleinen Tropfen Araldit eingebettet und unter dem Mikroskop analysiert.

Verwendete Puffer und Lösungen:

- | | |
|------------------------------------|--|
| PF/PBST: | Ausgangslösung des Paraformaldehyd: 20%,
zur Verwendung wird es 1:5 verdünnt |
| 0,2% DEPC behandeltes PBS: | 2 ml Diethyl Pyrocarbonat werden zu 1 Liter
1x PBS addiert und üN. bei 37°C inkubiert,
anschließend Autoklaviert |
| PBST: | DEPC behandeltes PBS + 0,2% Tween 20 |
| Hybridisierungslösung (für 50 ml): | 25 ml Formamid
12,5 ml SSC (20x)
50 μ l Heparin
<u>500 μl Tween 20</u>
End Volumen zu 50 ml mit DEPC H ₂ O |

Hybridisierungslösung+Lachsspermien DNA: Hyb. Lsg. + 10 µl/ml DNA
(Ausgangslösung: 10 mg/ml)

RNA-AP Puffer (für 50 ml): 1,6 ml 3 M NaCl
2,5 ml 1 M MgCl₂
5 ml 1 M Tris pH 9,5
500 µl Tween 20
End Volumen zu 50 ml mit dH₂O

2.4.6 Färbung der Embryonen mit Hoechst Farbstoff 33258 (DAPI)

Für eine Doppelfärbung mit dem Hoechst Farbstoff 33258 werden die in situ- bzw. α -H₃P gefärbten Embryonen 2x für 5 min in PBST gewaschen. Das Hoechst Farbstoff wird in PBST 1/5000 verdünnt und den Embryonen zugegeben. Nach 15 minütiger Inkubation bei leichtem Schütteln wird die Farbstoff-Lösung entnommen und die Embryonen 3x für 5 min mit PBST gewaschen. Die Embryonen können in PBST bei 4°C gelagert, oder in 87% Glycerin eingebettet und Analysiert werden.

2.5 Puppale dsRNA Injektionen

Für die puppale doppelstrang-RNA Injektion werden weibliche Puppen, bei den die Augenpigmentierung im fortgeschrittenen Stadium ist, gesammelt und auf einem Objektträger geklebt. Die Puppen werden mit dsRNA anhand einer Mikrokanüle Injiziert, dessen Luftdruck mit einer Einwegspritze manuell kontrolliert wurde. Zur dsRNA wurde Phenol-Rot in einer Endverdünnung von 2/100 zugegeben, umm es sichtbar zu machen.

3. Ergebnisse:

3.1 Komplettierung der cDNA von Toll aus *Tribolium castaneum*

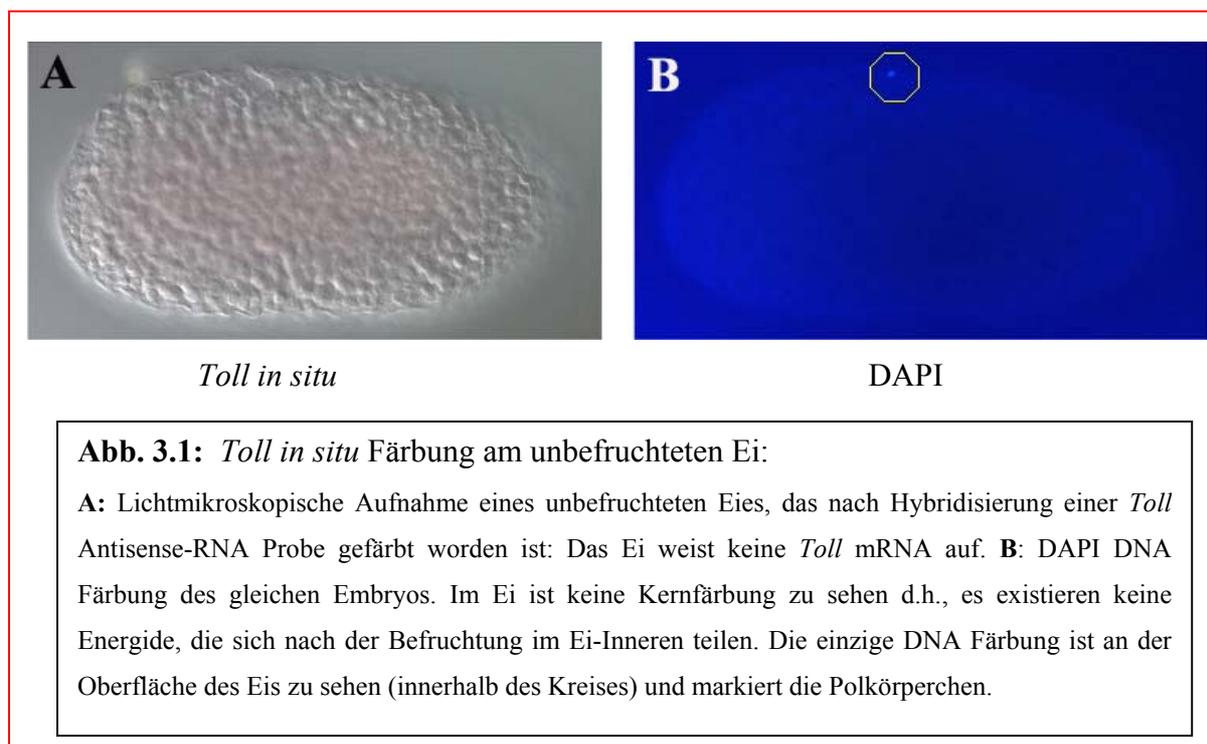
Vor Beginn meiner Arbeit war ein *Tribolium Toll* cDNA Fragment kloniert worden, das im Wesentlichen aus der zytoplasmatischen Region bestand (Maxton-Küchenmeister *et al.*, 2000). Während meiner Diplomarbeit hatte ich dieses Fragment verwendet, um aus einer *Tribolium* Phagenbibliothek die genomische Region des *Toll* Gens zu klonieren (Basal, 2000). Grundsätzlich zeigte der *TcToll* Rezeptor große strukturelle Ähnlichkeiten zu *Drosophila Toll*. Die erste Aufgabestellung meiner Doktorarbeit bestand nun darin, mittels der RACE PCR Methode die cDNA Sequenz zu komplettieren. Für die 5' Extension der cDNA wurden aus der bis dahin bekannten cDNA Sequenz Primer gewählt, und mit diesen PCR Reaktionen angesetzt. Die daraus gewonnenen PCR Fragmente wurden in TOPO 2.1 Vektoren kloniert und sequenziert. Danach wurde für das 5' Ende des längsten Klons neue Primer gewählt und der gleiche Reaktionsablauf wiederholt. Mit dieser Methode war ich in der Lage, die *Toll* cDNA Sequenz zu komplettieren. Die kodierende Region der *Tribolium Toll* cDNA Sequenz (siehe Anhang) hat eine Größe von 2,75 kb. Mit den 5' und 3' nicht kodierenden Regionen erreicht *TcToll* eine Größe von 3.05 kb. Die von der genomischen DNA abgeleiteten Protein Domänen konnten auch in der cDNA identifiziert werden (für Details siehe Basal, 2000).

3.2 Die *Tribolium Toll* Expression:

3.2.1 *Tribolium Toll* Expression in unbefruchteten Eiern:

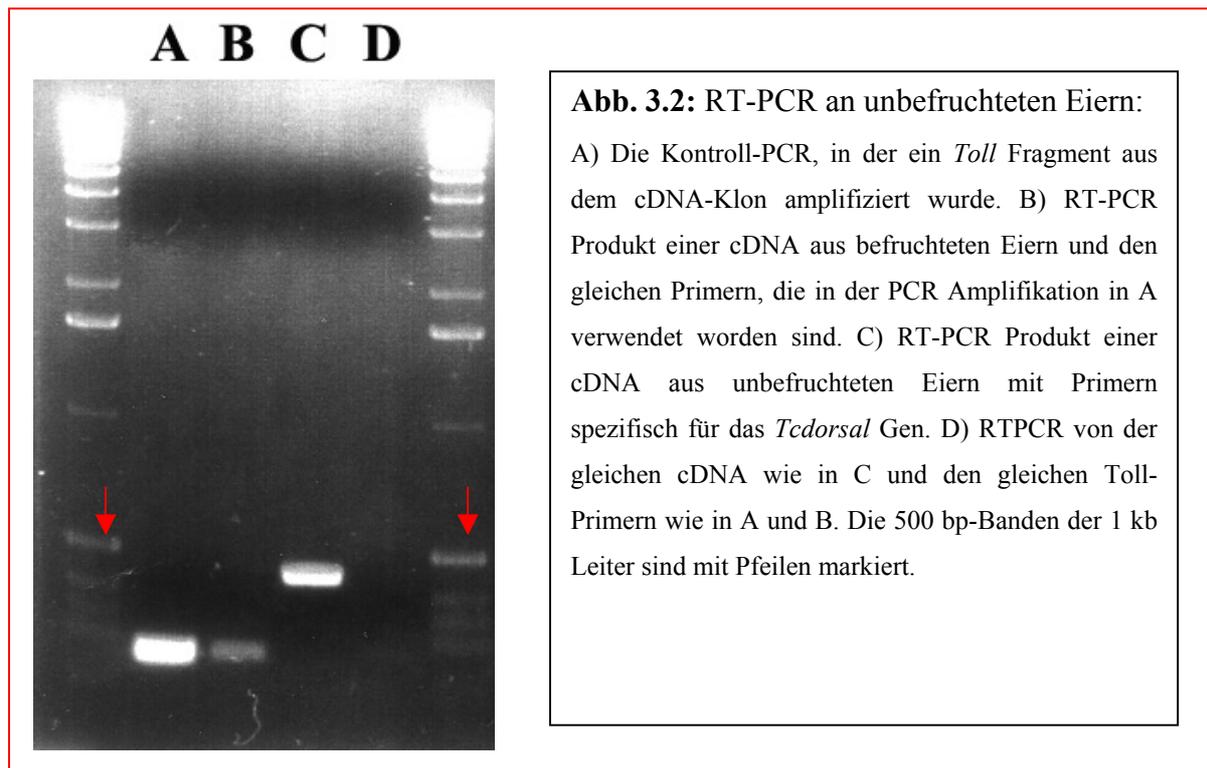
In *Drosophila* wird *Toll* maternal exprimiert, die RNA ist uniform verteilt und bis in die Blastodermstadien detektierbar (Hashimoto *et al.*, 1991). Bei *in situ* Färbungen mit einer Sonde, die im Wesentlichen mit der zytoplasmatischen Domäne korrespondierte, konnte in späten *Tribolium* Oozyten und in frühen Präblastoderm Embryonen die Präsenz von *Toll*-Transkripten nicht nachgewiesen werden. Einzig in frühen Oozyten waren sehr geringe Mengen von *Toll* mRNA detektierbar (Maxton-Küchenmeister *et al.*, 2000). Mit Digoxigenin-

markierten RNA-Sonden, die sowohl der zytoplasmatischen, als auch der neu klonierten extrazellulären Domäne entsprachen, konnten wir keine frühe embryonale *Toll*-mRNA Expression zeigen. Um diese Experiment noch präziser durchzuführen, wurde die *Toll* mRNA Expression in unbefruchteten Eiern analysiert. Dazu wurden weibliche Puppen gesammelt und die geschlüpften Tiere nicht mit Männchen verpaart. Nach einiger Zeit kommt es zur Ablage unbefruchteter Eier. Es wurden Eier von 48 Stunden-Ablagen gesammelt und fixiert. Mit diesen Eiern wurde dann eine *Toll in situ* Färbung durchgeführt. Das Resultat dieser Färbung war negativ, das bedeutet dass in unbefruchteten Eiern keine *Toll* Transkripte vorhanden sind (siehe Abb. 3.1.A). Die Präsenz der Polkörperchen (die haploiden Meiose Produkte der Oozytenkernteilungen) zeigt, dass das Ei nicht befruchtet war (Abb. 3.1.B).



3.2.2 RT-PCR an unbefruchteten Eiern

Es ist auch möglich, dass *Toll* Transkripte zwar maternal abgelegt werden und bis zu ihrer Translation im Ei verweilen, wegen ihrer niedrigen Kopiezahl jedoch nicht nachweisbar sind. Um dies zu überprüfen, wurde ein RT-PCR Versuch an unbefruchteten Eiern durchgeführt.



Für diesen Versuch wurde eine cDNA aus unbefruchteten Eiern hergestellt. Zusätzlich wurden aus der *Toll* cDNA Sequenz zwei Primer gewählt, und als Kontrolle getestet, ob es mit den Primern möglich ist, ein Fragment aus dem cDNA-Klon zu amplifizieren (Abb. 3.2, A). Außerdem wurde mit den gleichen Primern und einer cDNA, die aus befruchteten Eiern hergestellt wurde, ein PCR Fragment amplifiziert (Abb. 3.2, B). Wie erwartet ist die Bande nicht so stark wie bei der Amplifikation aus dem Klon, was mit der Kopiezahl des Templates zu tun hat. Zusätzlich wurden Primer für das *Tcdorsal* Gen gewählt. Um die Qualität der cDNA aus unbefruchteten Eiern zu überprüfen, wurde mit diesen Primern und der oben genannten cDNA eine PCR angesetzt. Von *dorsal* ist bekannt, dass es maternal exprimiert wird, also müsste es auch in unbefruchteten Eiern vorhanden sein. Das Resultat dieser PCR war positiv d.h., es gelang, ein Produkt mit den *Tcdorsal* Primern zu bekommen (Abb. 3.2, C). Als letztes und eigentliches Experiment wurden die gleichen *TcToll* Primer wie in den Kontroll-Reaktionen für eine PCR an der cDNA aus unbefruchteten Eiern verwendet, um herauszufinden, ob *Toll* Transkripte in unbefruchteten Eiern vorhanden sind (Abb. 3.2, D). Hier war das Resultat negativ, d.h. es war nicht möglich, ein PCR-Fragment zu detektieren. Zusammen mit den negativen *in situ* Färbungen zeigt die RT-PCR an unbefruchteten Eiern, dass in Präblastoderm-Stadien keine *Toll*-Transkripte vorhanden sind.

3.2.3 *Toll* Expression während der Embryogenese

Als nächstes wurden *in situ* Färbungen durchgeführt, um die *Toll* Transkript-Expression in *Tribolium*-Embryonen zu untersuchen. Erste *Toll* Transkripte konnten während der Blastodermstadien detektiert werden (Abb. 3.2.3.1.A1). Die Expression erfolgt auf der ventralen Seite entlang der gesamten anteriorposterioren Länge des Embryos. Mit Bildung der sogenannten Primitivgrube, einer Invagination am posterioren Pol-, tauchen zwei neue *Toll* Domänen auf: Die kleinere Domäne, findet sich in der Region rund um die Primitivgrube und die andere, sehr große Domäne besteht aus mittleren Regionen des Embryos. Diese zweite Domäne erstreckt sich weit in dorsale Regionen (Abb. 3.2.3.1.B1).

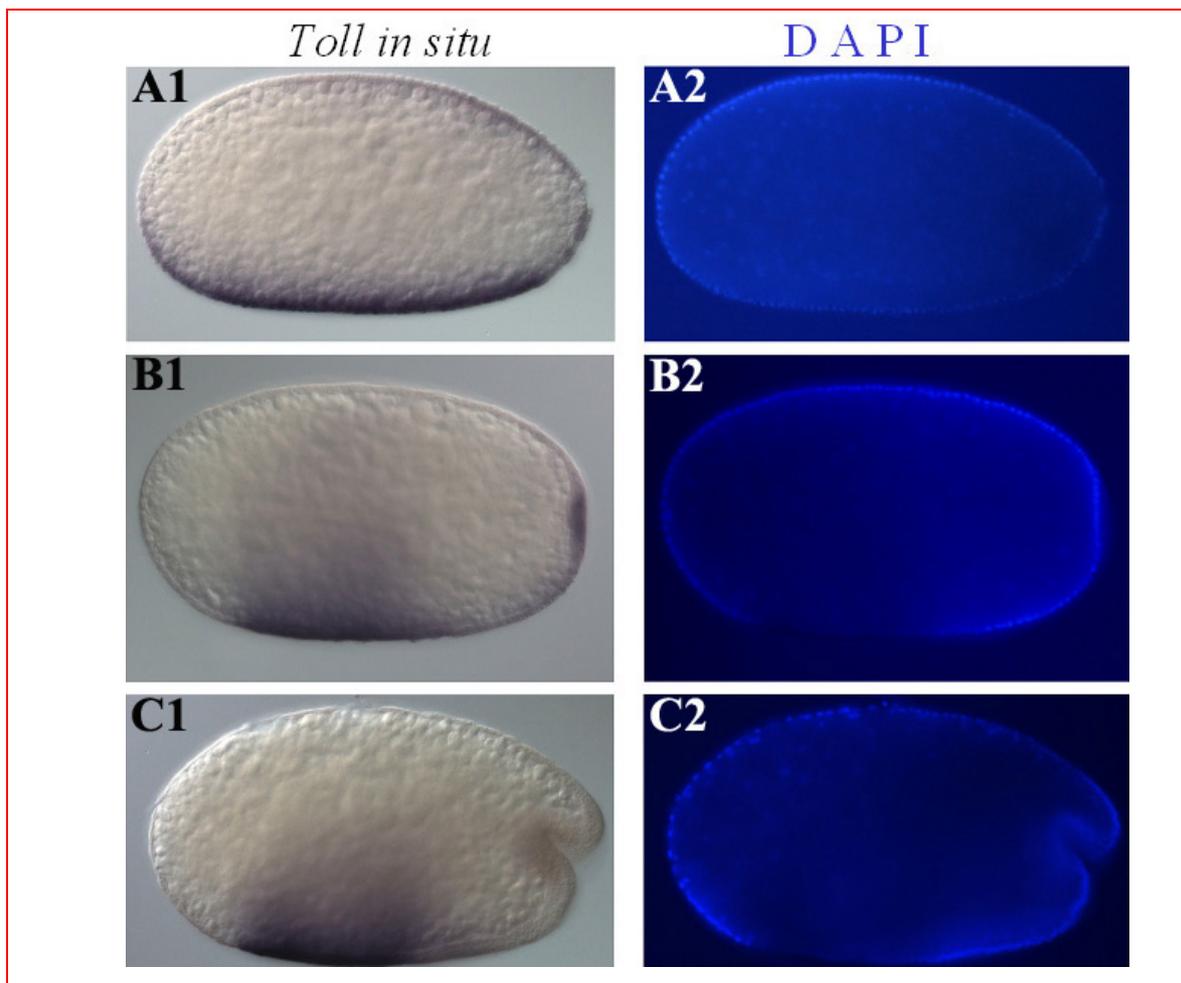
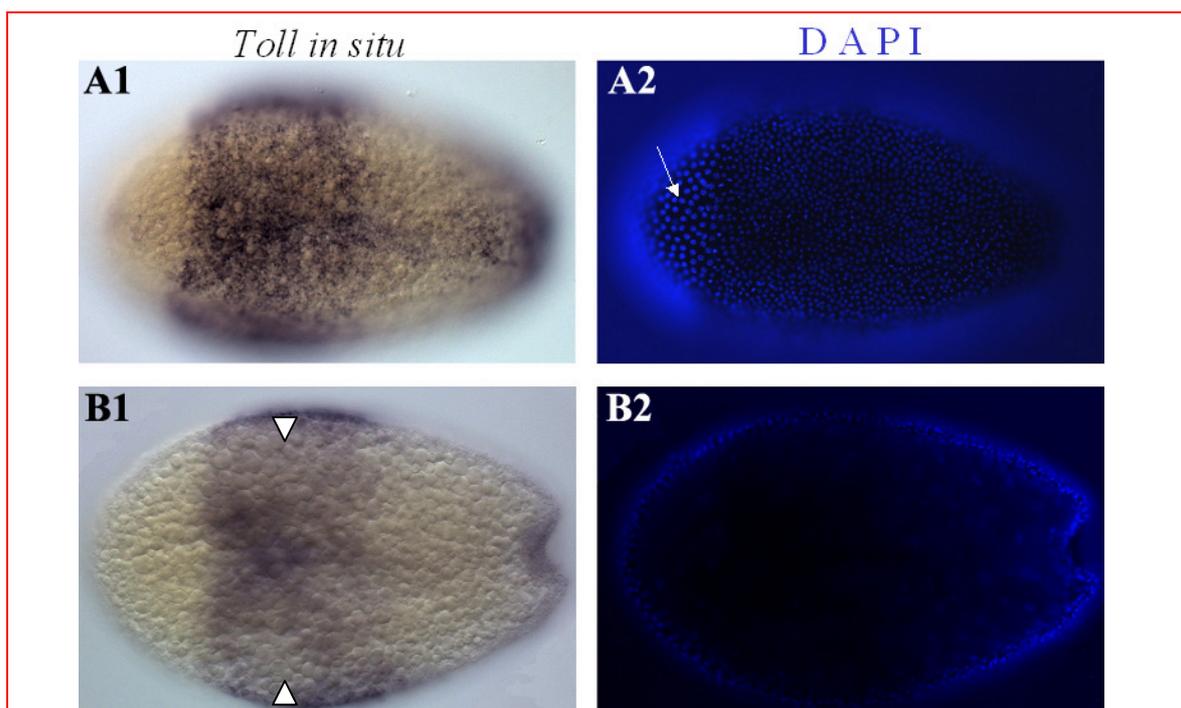


Abb. 3.2.3.1: *Toll* Expression im Blastoderm Embryo

Lateral Ansichten von Embryonen, die mit einer Dig markierten *Toll*-RNA Sonde gefärbt wurden. Sie sind mit der anterioren Seite nach links ausgerichtet. Die in **A2**, **B2** und **C2** abgebildeten Embryonen zeigen jeweils die DAPI Färbungen der **A1**, **B1** und **C1** *Toll in situ* gefärbten Embryonen in der linken Hälfte. **A1**: Die erste zygotische *Toll* Expression wird in Blastodermstadien an der Ventralseite sichtbar. **B1**: Wenn die frühe Primitivgrube sichtbar wird, wird *Toll* entlang der ventralen Mittellinie, rund um die Grube und in einer großen anterioren Domäne exprimiert. **C1**: Die posteriore *Toll*-Expression und die Expression um die Primitivgrube verschwinden mit sichtbar werden der posterioren Amnionfalte.

Im anterioren Bereich des Embryos verschwindet die Expression. Zum Zeitpunkt der Vertiefung der Primitivgrube, in dem in der dorsalen Hälfte die posteriore Amnionfalte und in der ventralen Hälfte die Keimanlage unterschieden werden können, verschwindet auch die posteriore Domäne inklusive der Expression um die Primitivgrube und die mittlere Domäne verfeinert sich (Abb. 3.2.3.1.C1).

**Abb. 3.2.3.2:** Ventralansichten von *Toll in situ* gefärbten Embryonen während der Vertiefung der Primitivgrube.

Die Embryonen sind mit anterior nach links orientiert und sind jeweils im gleichen Stadium wie die Embryonen in Abb. 3.2.3.1 B und C. A2 und B2: DAPI Färbungen der in Abb. A1 und B1 gezeigten Embryonen. In A2 klar zu unterscheiden: Die polyploiden Serosa-Zellen (siehe Pfeil) und die Keimrudimentzellen. B1: In der großen anterioren Domäne bilden sich zwei Regionen, die kein *Toll* exprimieren (Pfeilköpfe).

Werden Embryonen in diesem Stadium nicht aus der lateralen Perspektive, sondern aus der ventralen Perspektive betrachtet (Abb. 3.2.3.2), so lässt sich erkennen, dass die mittlere Domäne anterior an die extraembryonalen Serosa-Zellen angrenzt (Abb. 3.2.3.2.A2). Kurz darauf werden zwei Regionen innerhalb der anterioren Expressionsdomäne sichtbar, die kein *Toll* mehr exprimieren (Abb. 3.2.3.2.B1).

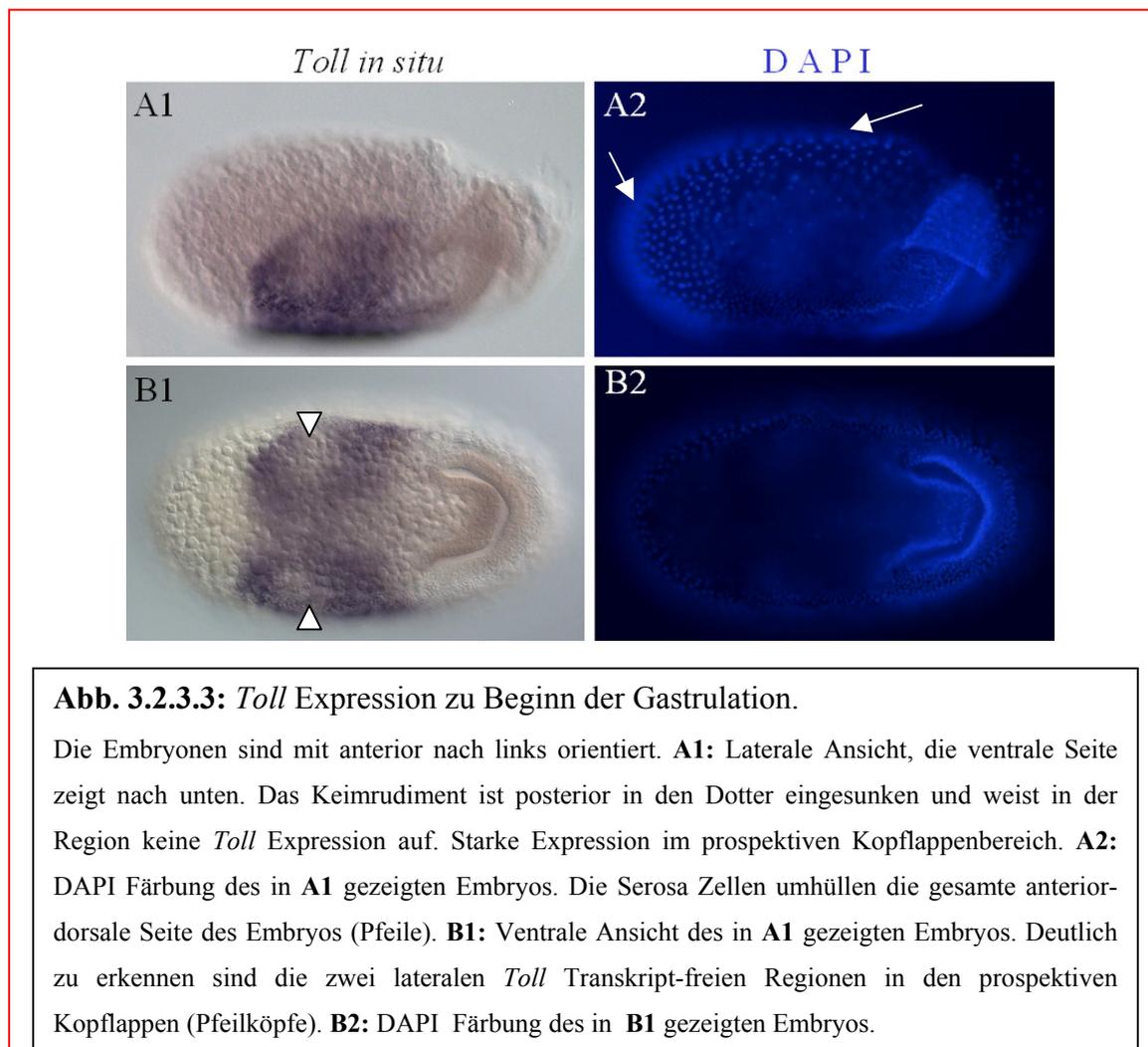
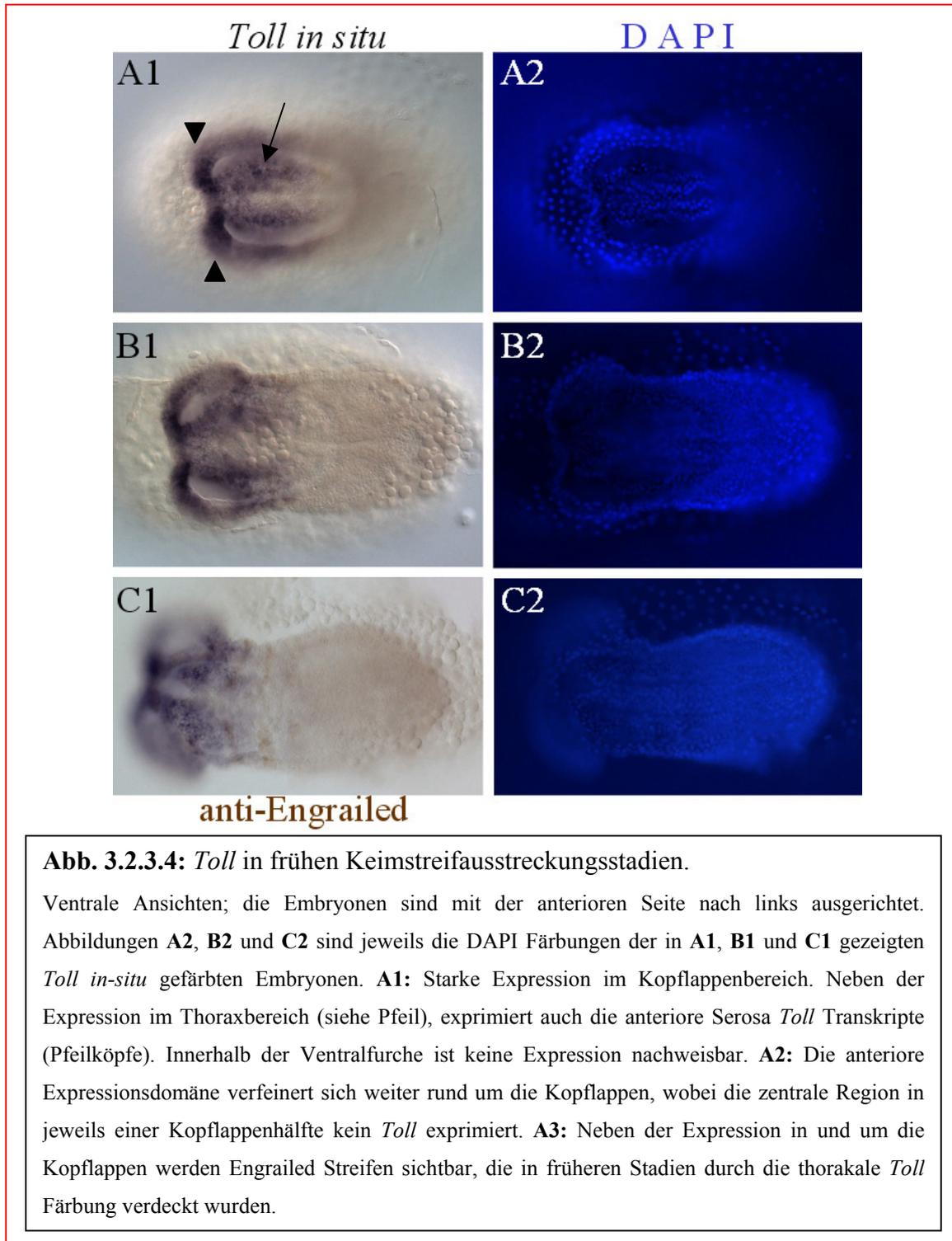


Abb. 3.2.3.3: *Toll* Expression zu Beginn der Gastrulation.

Die Embryonen sind mit anterior nach links orientiert. **A1:** Laterale Ansicht, die ventrale Seite zeigt nach unten. Das Keimrudiment ist posterior in den Dotter eingesunken und weist in der Region keine *Toll* Expression auf. Starke Expression im prospektiven Kopflappenbereich. **A2:** DAPI Färbung des in **A1** gezeigten Embryos. Die Serosa Zellen umhüllen die gesamte anterior-dorsale Seite des Embryos (Pfeile). **B1:** Ventrale Ansicht des in **A1** gezeigten Embryos. Deutlich zu erkennen sind die zwei lateralen *Toll* Transkript-freien Regionen in den prospektiven Kopflappen (Pfeilköpfe). **B2:** DAPI Färbung des in **B1** gezeigten Embryos.

Im darauf folgenden Stadium, dadurch gekennzeichnet, dass das Keimrudiment im posterioren Bereich in den Dotter einsinkt und die posteriore Amnionfalte anfängt, die ventrale Seite des Keimrudiments zu umhüllen (siehe Abb. 3.2.3.3), werden diese *Toll*-freien Regionen größer und sind klarer ausgeprägt (Abb. 3.2.3.3.A1 und Abb. 3.2.3.3.B1). In Abb.3.2.3.3.A2 ist auch zu erkennen, dass die polyploiden Serosa Zellen schon die anteriore Kappe und die gesamte dorsale Seite umhüllen. Dies ist das Stadium, in dem die

Ventralfurche sichtbar wird (siehe auch Abb.3.4.1.1.B). In diesem Stadium ist das Embryo nur noch an der posterior-ventralen Seite nicht von den Serosa-Zellen umgeben.



Im nächsten Stadium hat sich aus den ventralen Keimanlagen-Zellen der Keimstreif gebildet (Abb.3.2.3.4.A1). Die Ventralfurche entlang der ventralen Mittellinie des Embryos ist

deutlich sichtbar, und die Serosa hat sich weiter geschlossen, so dass nur noch ein kleines Fenster an der ventralen Seite des Embryos offen geblieben ist (Abb.3.2.3.4.A2). Die anteriore *Toll*-Domäne aus den früheren Stadien ist nun unterteilt in Kopflappen-, anteriore Thorax-, und anteriore Serosa-Expression (Abb.3.2.3.4.A1). In diesem Stadium sind die *Toll*-freien Regionen in den Kopflappen, die auch in den darauf folgenden Stadien *Toll*-frei bleiben (Abb.3.2.3.4.B1-Abb.3.2.3.4.C1), stärker ausgeprägt. In den darauf folgenden Stadien verschwindet die *Toll*-Expression immer mehr vom thorakalen Bereich (Abb.3.2.3.4.B1 und 3.2.3.4.C1). In diesen Stadien werden auch die Engrailed Streifen sichtbar. Die anti-Engrailed Antikörper Färbungen wurden in den oben erwähnten und in vielen weiteren Färbungen in der Arbeit als Stadium-Kontroll-Marker verwendet.

Die Kopflappenexpression bleibt während späterer Keimstreif-Extensionsstadien erhalten (Abb.3.2.3.5), allerdings beschränkt sich die Expression immer mehr auf die ventrale Region der Kopflappenhälften.

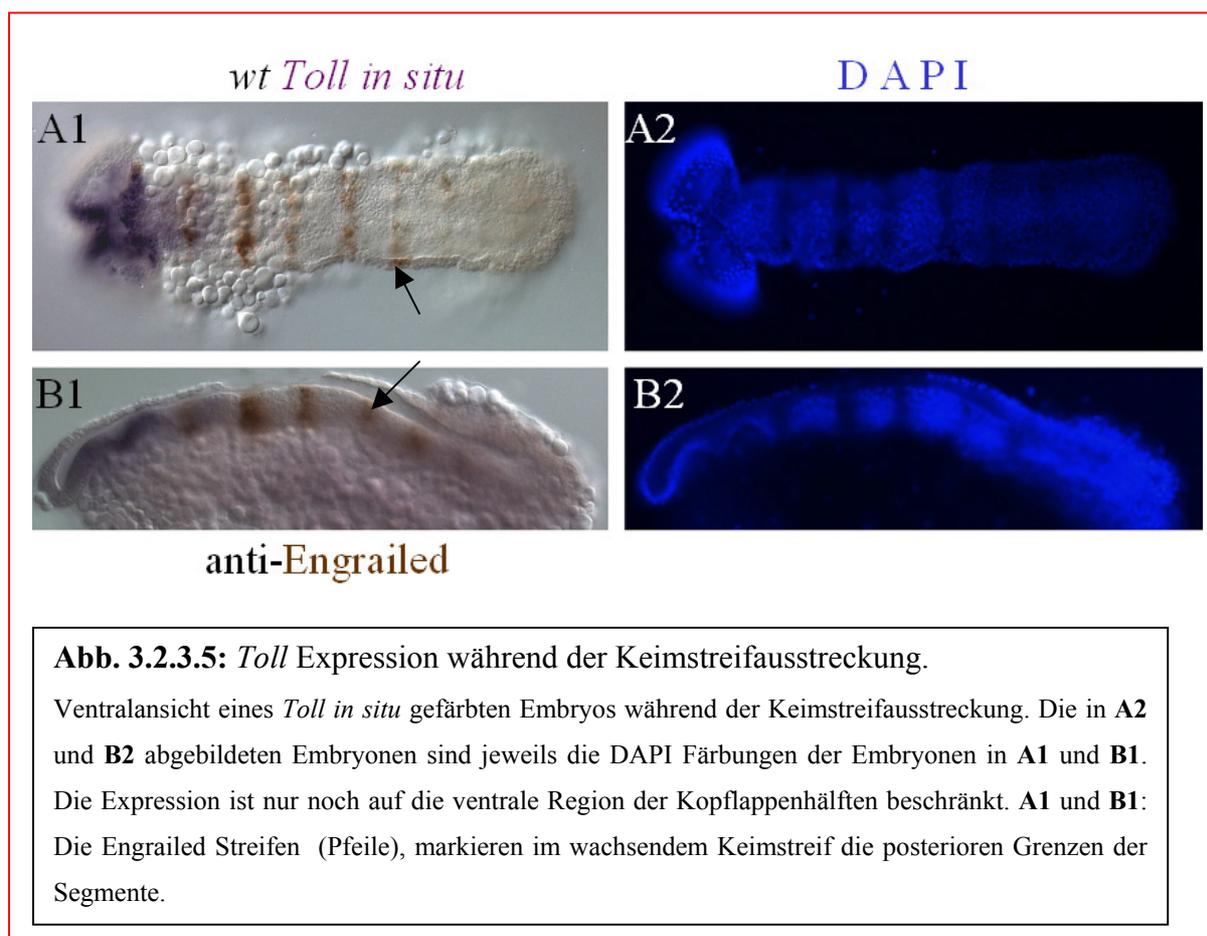


Abb. 3.2.3.5: *Toll* Expression während der Keimstreifausstreckung.

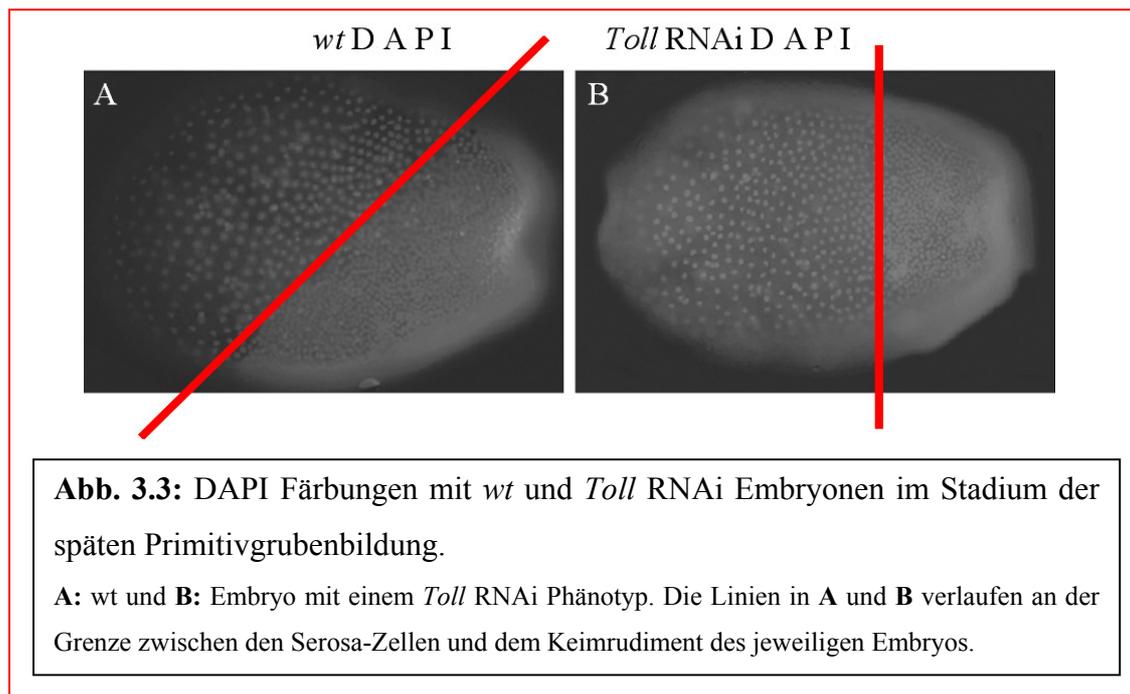
Ventralansicht eines *Toll in situ* gefärbten Embryos während der Keimstreifausstreckung. Die in **A2** und **B2** abgebildeten Embryonen sind jeweils die DAPI Färbungen der Embryonen in **A1** und **B1**. Die Expression ist nur noch auf die ventrale Region der Kopflappenhälften beschränkt. **A1** und **B1**: Die Engrailed Streifen (Pfeile), markieren im wachsendem Keimstreif die posterioren Grenzen der Segmente.

3.3 Toll Doppelstrang RNA Injektionen:

Zwar zeigt *Toll* eine auf die ventrale Seite limitierte Expression und phylogenetische Analysen ordnen *TcToll* zu *Toll* Homologen aus Organismen von denen bekannt ist, dass sie in der Etablierung der Dorsoventralachse agieren, jedoch liefern die oben erwähnten Fakten nicht den eindeutigen Beweis dafür, dass das klonierte *TcToll* auch in der dorsoventralen Achsenbildung fungiert. Ein Ausfallphänotyp würde aufschlussreiche Informationen darüber geben, ob *TcToll* auch wirklich das Ortholog zu *Drosophila Toll* ist. Die Störung der dorsoventralen Polarität wäre hierbei ein eindeutiger Hinweis.

Eine Möglichkeit, den Ausfall eines Genproduktes zu erzielen, ist mit der RNAi (RNA inhibition) Technik gegeben. Die Technik beruht auf die Annahme, dass durch die Injektion von dsRNA, ein natürlicher Abwehrmechanismus aktiviert wird, der zum Abbau der dsRNA führt. Allerdings wird neben der dsRNA auch die körpereigene mRNA des gleichen Gens abgebaut, von dem die dsRNA produziert wurde, da die dsRNA mit der mRNA einen Komplex bilden kann. Das Resultat ist das Fehlen oder die verminderte Menge eines bestimmten Genproduktes.

Um einen Ausfallphänotyp von *TcToll* zu bekommen, wurden puppale Doppelstrang RNA-Injektionen durchgeführt. In Abb. 3.3.B wird ein *Toll* dsRNA injiziertes Embryo nach Ausbildung der Primitivgrube gezeigt und mit einem Wildtyp Embryo im gleichen Stadium (Abb. 3.3.A) verglichen.



Während im Wildtyp die Serosa nur an der dorsalen Seite bis zum posterioren Bereich des Embryos expandiert und das Keimrudiment sich in ventralen Bereichen des Embryos formiert (d.h. posterior zur Trennungslinie, siehe Abb. 3.3.A), ist in *Toll* RNAi Embryonen eine gleichmäßige Expansion der Serosa Zellen in posteriore Bereiche zu beobachten (Abb. 3.3.B). Auch die Keimrudiment-Zellen formen keine posterior-ventrale Kappe, wie es im Wildtyp der Fall ist, sondern sind gleichmäßig im posterioren Bereich verteilt.

3.3.1 *zen* und *dpp* Expression in *Toll* RNAi Embryonen

zen wird in Wildtyp Embryonen während der Blastodermstadien exprimiert und bildet eine asymmetrische anterior-dorsale Kappe (Abb. 3.3.1.1.D, nach Chen *et al.*, 2000). Später, mit sichtbar werden der Primitivgrube wird die anteriore *zen* Expression schwächer, allerdings bleibt eine Domäne im dorsalen Bereich gleichstark erhalten (Abb. 3.3.1.1.E, nach Chen *et al.*, 2000).

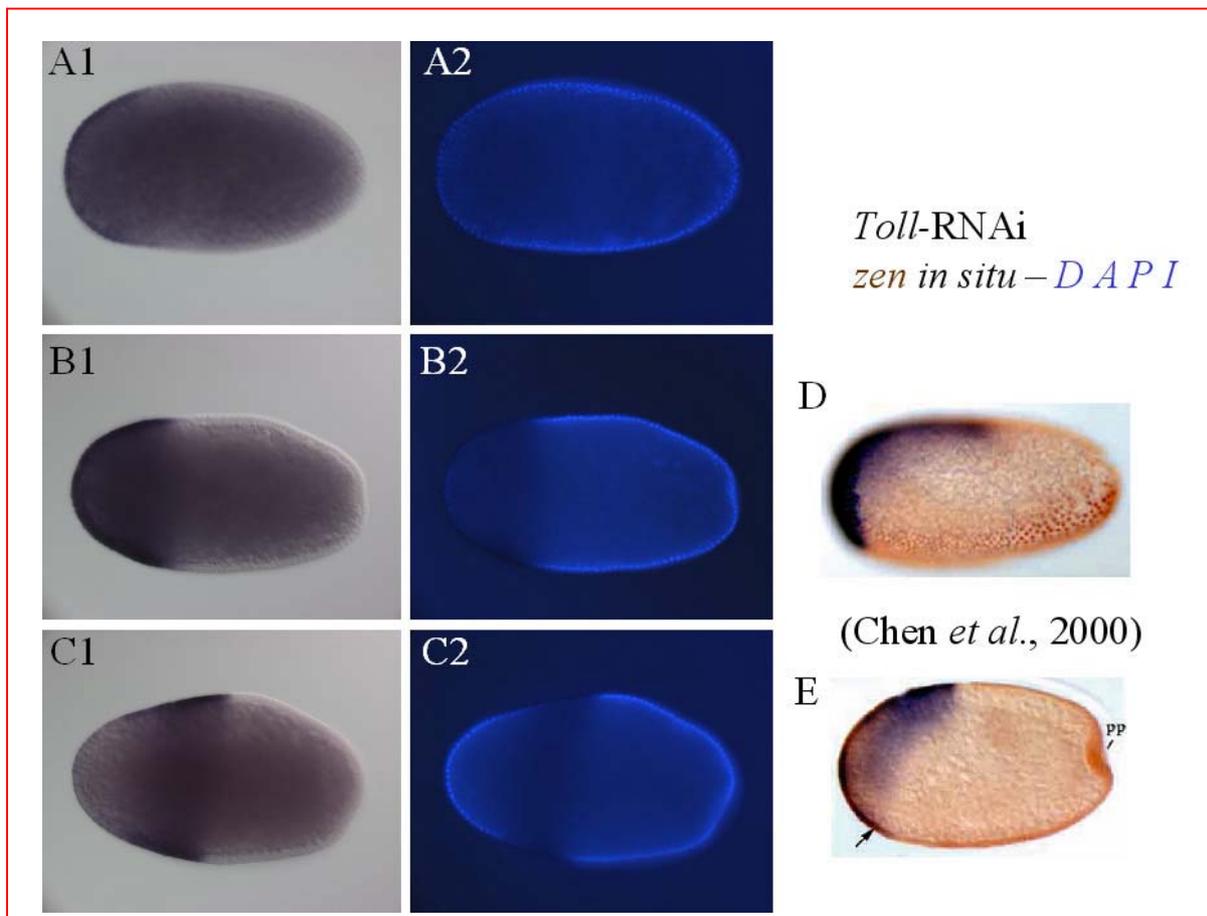


Abb. 3.3.1.1: *zen in situ* Färbungen mit *Toll* RNAi Embryonen.

Anterior ist links. **A1-C1:** Licht mikroskopische Aufnahmen von *zen* Transkript-Färbungen in progressiv älteren Blastoderm-Stadien. **A2-C2:** DAPI Färbungen der Embryonen **A1-C1**. **D, E:** Wildtyp *zen in situ* Färbungen von einem späten Blastoderm-Embryo (**D**) und einem Embryo während der Ausbildung der Primitivgrube (**E**). Die braune Färbung markiert die Kernlokalisationsdomäne des Dorsal Proteins an der ventralen Seite. Für Details, siehe Text.

In *Toll* RNAi Embryonen hingegen wird *zen* in frühen Blastodermstadien in einer anterioren Kappe exprimiert (Abb. 3.3.1.1.A1 und A2). Mit der Zellularisierung des Blastoderms vergrößert sich auch die *zen* Expressionsdomäne im anterioren Bereich, allerdings zeigt sich auch in diesem Stadium in Bezug auf die Dorsoventralachse keinerlei Asymmetrie (Abb. 3.3.1.1.B1 und B2). Während der Ausbildung der Primitivgrube verschwindet die Expression an der anterioren Kappe, aber anstelle der dorsalen Expression wird bei 60-70% der Embryo Länge ein ``Ring`` von *zen* Transkripten sichtbar (Abb. 3.3.1.1.C1 und C2).

Toll-RNAi; *dpp*-DAPI

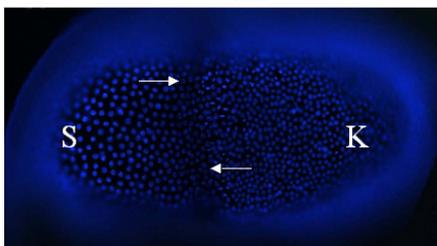


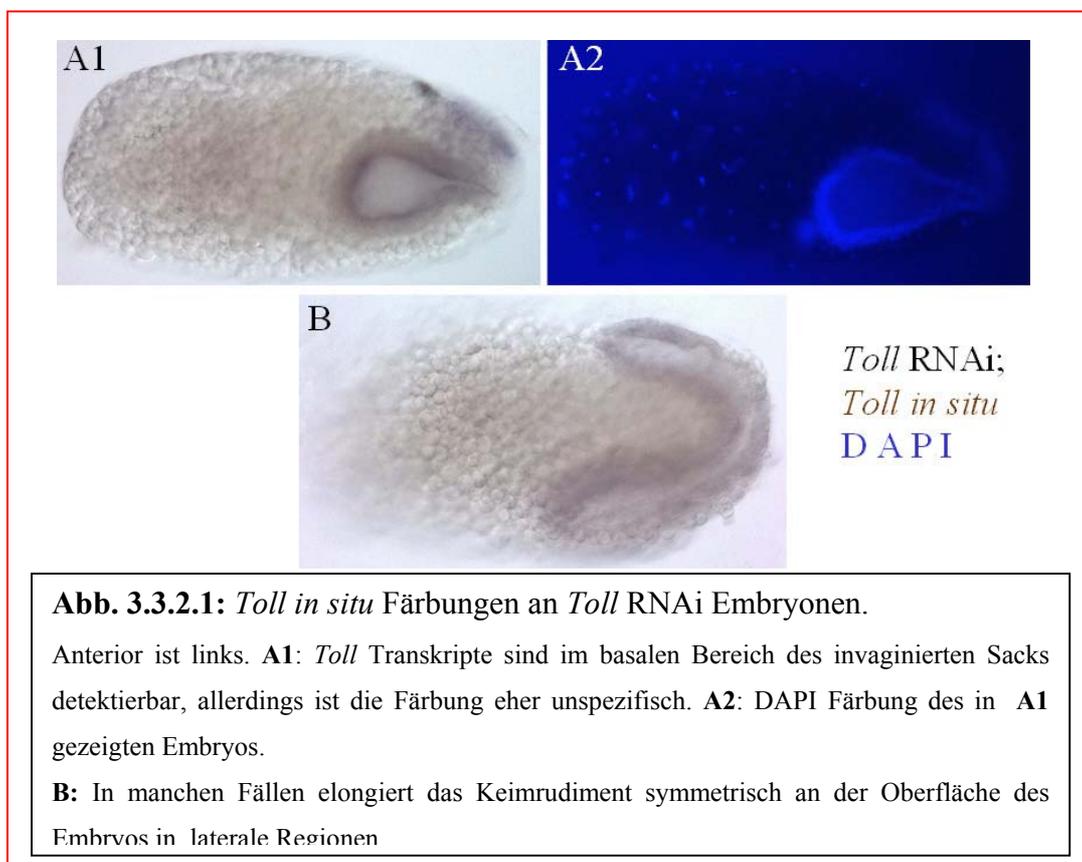
Abb. 3.3.1.2: DAPI Färbung eines *dpp in situ* gefärbten Embryos während der Ausbildung der Primitivgrube. Die *dpp in situ* Färbung ist im Hintergrund als Ring (siehe Pfeile) an der Grenze zwischen der Serosa (S) und dem Keimrudiment (K) zu sehen.

Auch *dpp* Transkripte, die im Wildtyp die Grenze zwischen Keimrudiment und der Serosa markieren, und bei Embryonen, die die Stadien der Ausbildung der Primitivgrube durchlaufen, eine schräge Linie von anterior-ventral nach posterior-dorsal formen (Chen *et al.*, 2000), bilden einen Ring an der Grenze zwischen den Serosa-Zellen und den Zellen der Keimanlage, und weisen keinerlei anteriorposteriore Asymmetrie auf (Abb. 3.3.1.2).

3.3.2 *Toll* RNAi Embryonen nach Ausbildung der Primitivgrube

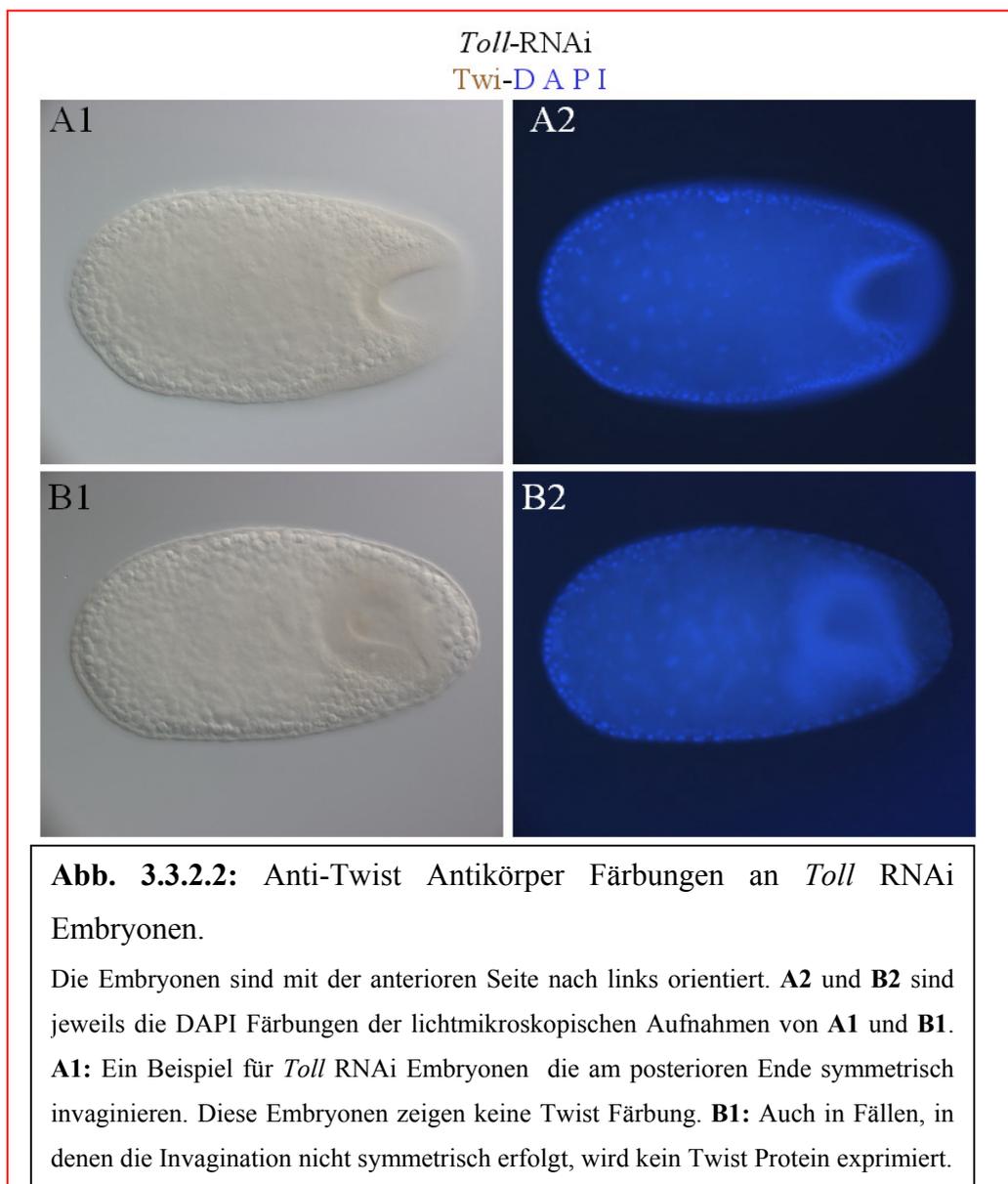
Anstatt dass sich die posteriore Amnionfalte nach der Ausbildung der Primitivgrube über die Keimanlage bewegt, vertieft sich die Grube in *Toll* RNAi Embryonen symmetrisch weit in den Dotter, und bildet eine Sack-ähnliche Struktur. Weder das Keimrudiment noch die Amnionfalte sind unterscheidbar. Um zu kontrollieren, ob in *Toll* RNAi Embryonen überhaupt noch *Toll* Transkripte vorhanden sind, wurde eine *in situ* Färbung durchgeführt (Abb. 3.3.2.1). In Wildtyp Embryonen wird *Toll* in diesem Stadium der Embryogenese sehr stark im prospektiven Kopflappenbereich exprimiert (siehe Abb. 3.2.3.3.B1).

In fast allen *Toll* RNAi Embryonen sind *Toll* Transkripte nicht detektierbar d.h., dass das Genprodukt abgebaut ist. In einem der zwölf gefärbten Embryonen mit ähnlichem Phänotyp ist eine schwache Färbung zu erkennen (Abb. 3.3.2.1.A1), die allerdings eher unspezifisch zu sein scheint. Die Färbung ist auf die innere Seite des Sacks beschränkt. In einigen Fällen wächst die Primitivgrube von der Oberfläche des posterioren Pols fast symmetrisch auseinander (Abb. 3.3.2.1.B), aber auch diese Embryonen exprimieren keine *Toll* RNA.



Als Nächstes ergibt sich die Notwendigkeit nachzuprüfen, ob trotz eines Ausschaltens der Toll-Rezeptoren, die vermutlichen Zielgene der *Toll* Kaskade aktiviert werden. Aus diesem

Grund wurde in den *Toll* RNAi Embryonen nach der Twist-Protein Expression geschaut (Abb. 3.3.2.2. A1 und A2). Hier zeigte sich, dass keiner der *Toll* RNAi Embryonen Twist exprimieren. Im Wildtyp ist Twist in diesem Stadium in der Keimanlage entlang der ventralen Mittellinie exprimiert (siehe Abb. 3.4.1.1.A und B). Einige *Toll* RNAi Embryonen weisen eine asymmetrische Verschiebung der Invagination relativ zur Mitte der posterioren Kappe auf, aber auch diese Embryonen exprimieren kein Twist (Abb. 3.3.2.2. B1 und B2).



3.3.3 Der *Toll* RNAi Effekt in Keimstreifausstreckungsstadien

Die Invaginationen im posterioren Bereich vertiefen sich immer weiter in die Dotter der Embryonen, und formen schließlich sehr lange, dünne Schläuche (Abb. 3.3.3.B-F2). Diese Schläuche ähneln den Embryonen mit einem Ausfallphänotyp für die *Dorsal*-Gruppengene (S.Roth, persönliche Mitteilung). Interessanter Weise zeigen die Schläuche ein Segmentierungsmuster, das mit dem Engrailed Antikörper dargestellt wurde (Abb. 3.3.3.C1 und C2). In den Schläuchen weist jede Engrailed exprimierende Region eine Verengung auf (siehe Pfeile in Abb. 3.3.3.C1), was auch in Wildtyp Embryonen beobachtet wird (Abb. 3.3.4.2.C).

Auch *Tcdorsal* RNAi Embryonen formen diese langen Schläuche, die Segmentierungsmuster zeigen (P. Kalscheuer, persönliche Mitteilung). Die dorsalisierten Schläuche zeigen am posterioren Ende eine abgeflachte, runde Struktur (Abb. 3.3.3.D1 und D2, siehe Pfeile). An ihrem posterioren Rand lässt sich eine Zellgruppe finden, die mit dem *Tribolium* Twist Antikörper und auch mit *twi* RNA Sonden gefärbt werden kann (Abb. 3.3.3.D1 und F1, siehe Pfeile).

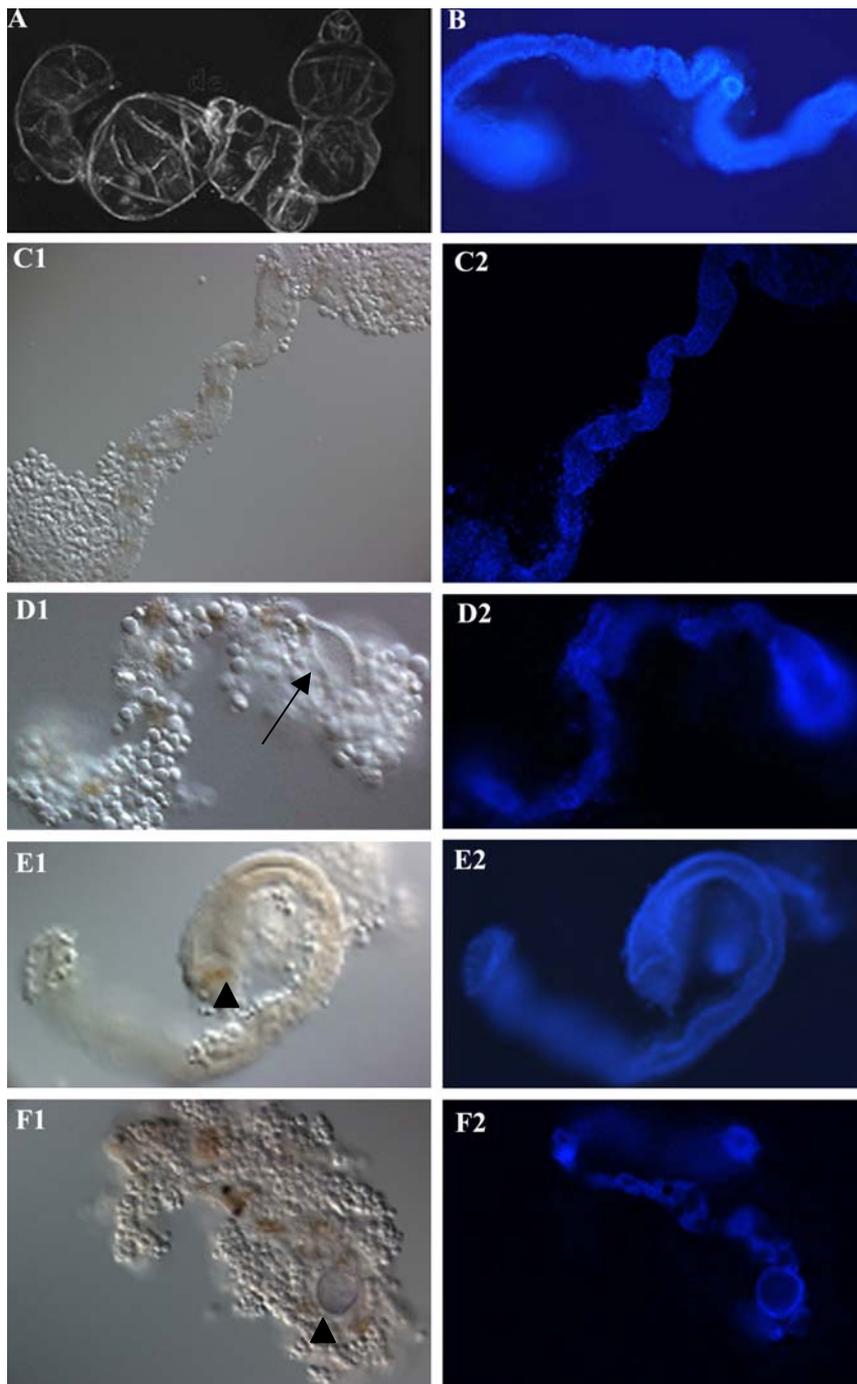


Abb. 3.3.3: *Toll* RNAi Embryonen in Keimstreifstadien.

A: Dunkelfeld Aufnahme einer dorsalisierten Kutikula von *D. melanogaster* (nach Handel *et al.*, 2000). **B:** DAPI Färbung eines *Toll* RNAi Keimstreif-Embryos. **C2-F2:** Jeweilige DAPI Färbungen der Embryonen, die in **C1-F1** dargestellt sind. **C1:** Die schlauchförmigen Embryonen zeigen Hinweise auf Segmentierung, da sie mit dem Engrailed Antikörper gefärbt werden können. **D1:** In der posterioren Region zeigen die Schläuche eine verbreitete, gleichmäßig runde Struktur (siehe Pfeil), die auch Twist Protein (**E1**) und *twist* RNA (**F1**) exprimieren (jeweils Pfeilkopf). Für Details, siehe Text.

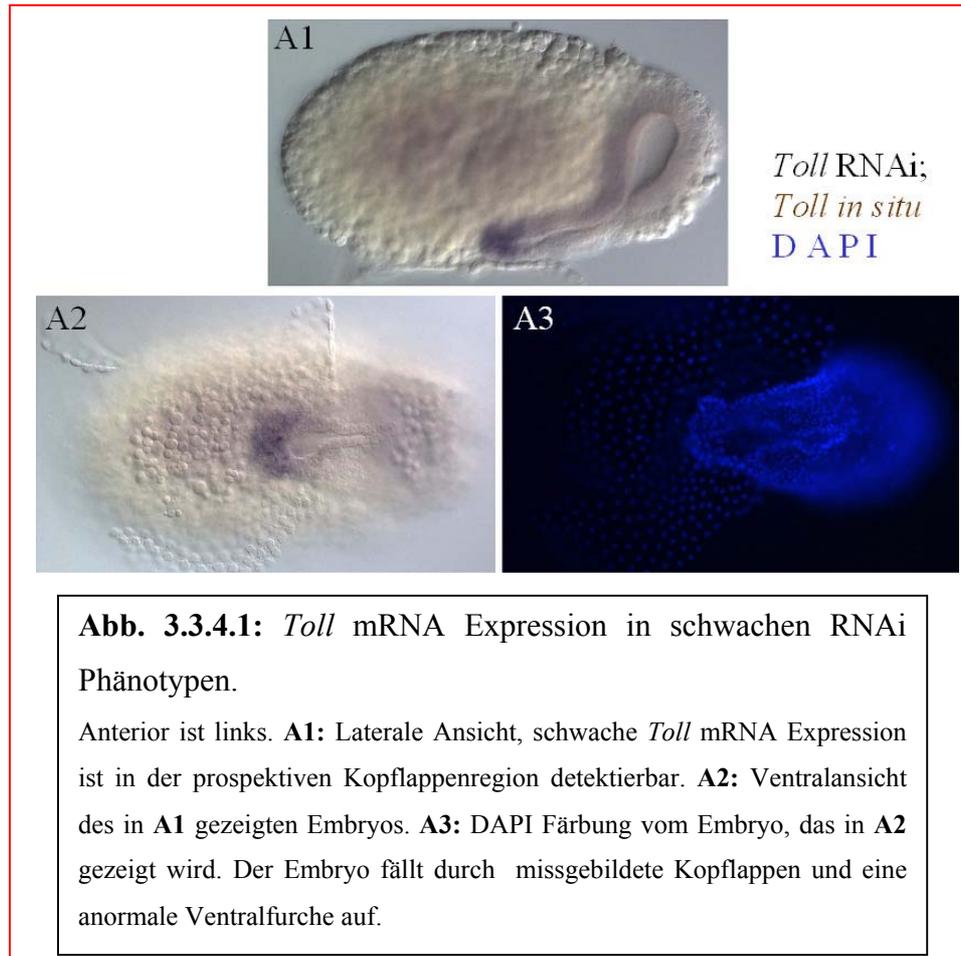
3.3.4 Schwache *Toll* RNAi Phänotypen

Der Nachteil der RNAi Technik ist, dass nicht einwandfrei geklärt werden kann, ob mit der Methode ein völliger Ausfall des Genproduktes erzielt wird. Der Vorteil wiederum liegt darin, dass bei einer erfolgreichen Durchführung puppaler dsRNA Injektion das Auftreten einer Reihe von unterschiedlich starken Ausfallphänotypen ermöglicht wird.

Schwächere Phänotypen treten auch dadurch auf, dass der RNAi Effekt durch den Abbau der dsRNA mit der Zeit abnimmt, d.h. je später bezüglich des Injektionsdatums Eiablagen gesammelt werden, desto höher die Wahrscheinlichkeit, schwächere Phänotypen zu bekommen. Auch für dieses Projekt sind moderate Ausfallphänotypen von Bedeutung, weil sie zeigen, wie eine Teildeaktivierung des Toll Rezeptors sich auf stromabwärtsliegende Ereignisse wie Zielgen-Aktivierung, Ventralfurchen- und Kopflappenbildung auswirkt.

Die Abbildungen 3.3.4.1, 3.3.4.2 und 3.3.4.3 zeigen Embryonen mit unterschiedlich stark ausgeprägten Ausfallphänotypen. In Abb. 3.3.4.1 wurde ein RNAi Embryo mit einer *Toll* antisense-RNA Probe gefärbt. Das Keimrudiment ist nach posterior verschoben (Abb. 3.3.4.1.A1). Auch die posteriore Amnionfalte macht einen viel größeren Bogen um das Keimrudiment. Im Kopflappenbereich ist die *Toll* Expressionsdomäne viel kleiner und auch schwächer.

Die eigentlichen Unterschiede zeigen sich jedoch, wenn der Embryo aus der ventralen Perspektive betrachtet wird (Abb. 3.3.4.1.A2 und A3): Anterior ist eine Kopflappenmissbildung zu erkennen und die Ventralfurche ist unregelmäßig stark ausgeprägt, d.h. anterior liegen die lateralen Ektodermalplatten, die an die Ventralfurche angrenzen, relativ zum Wildtyp viel zu weit auseinander, und auch in übrigen Bereichen ist eine Ungleichmäßigkeit der Ventralfurche zu erkennen.



In Stadien der Ausbildung der posterioren Amnionfalte exprimieren die Embryonen mit moderaten Phänotypen *twist* Transkripte in der Keimanlage, jedoch bildet sie sich viel weiter nach posterior versetzt aus (vergleiche Abb. 3.3.4.2.A und B). Auch die Primitivgrube ist tiefer und formt sich oft in weiter dorsalen Regionen als im Wildtyp (Abb. 3.3.4.2.B). Während der Keimstreifausstreckung sehen schwache *Toll* RNAi Embryonen äußerlich fast völlig wildtypisch aus (Abb. 3.3.4.2.D). Die Kopflappen werden ausgebildet (Daten nicht gezeigt). Die *twist* Expression ist im Gegensatz zum Wildtyp auf die neu geformten, posterioren Segmenten und die Wachstumszone beschränkt (Abb. 3.3.4.2.D).

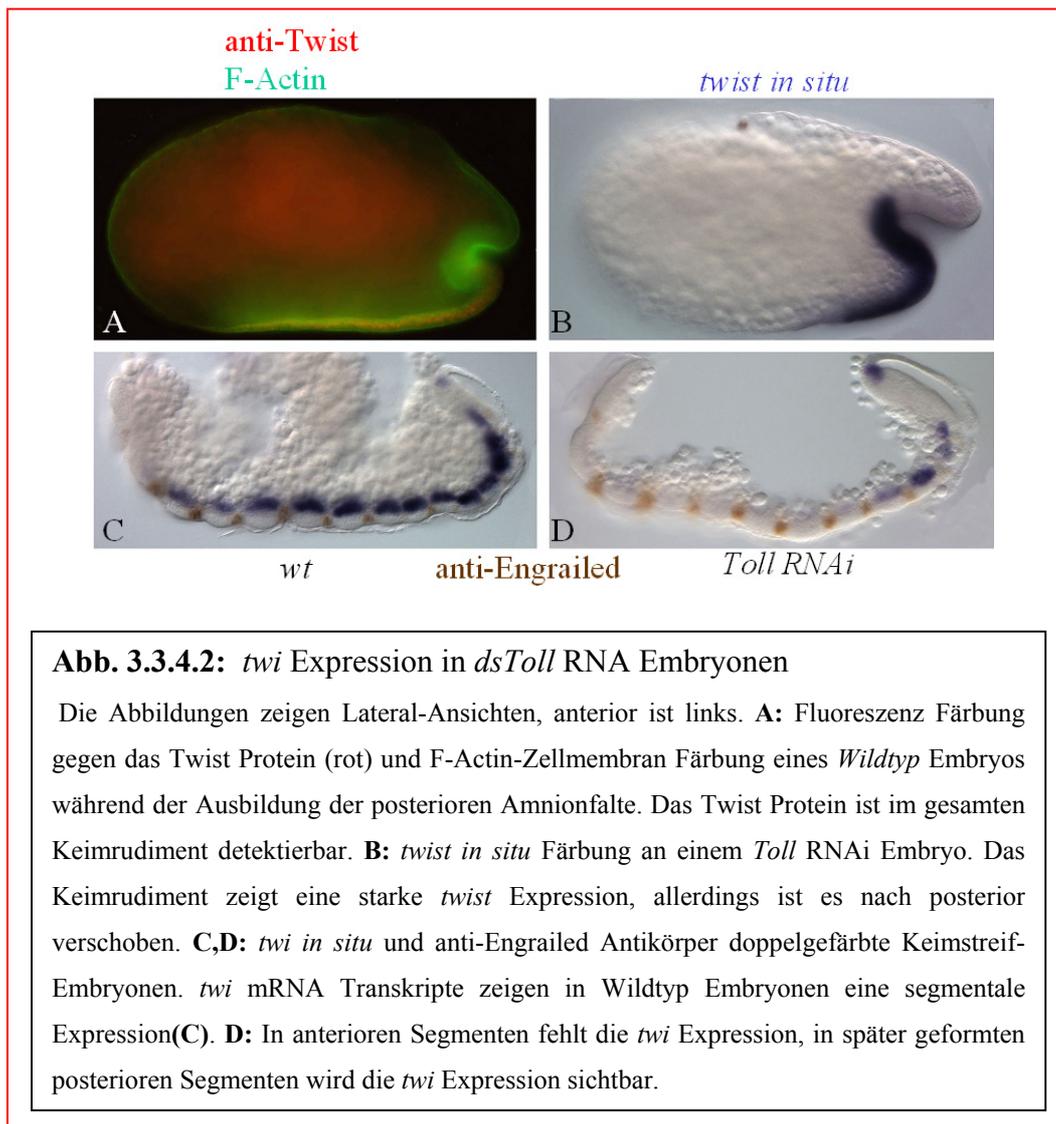
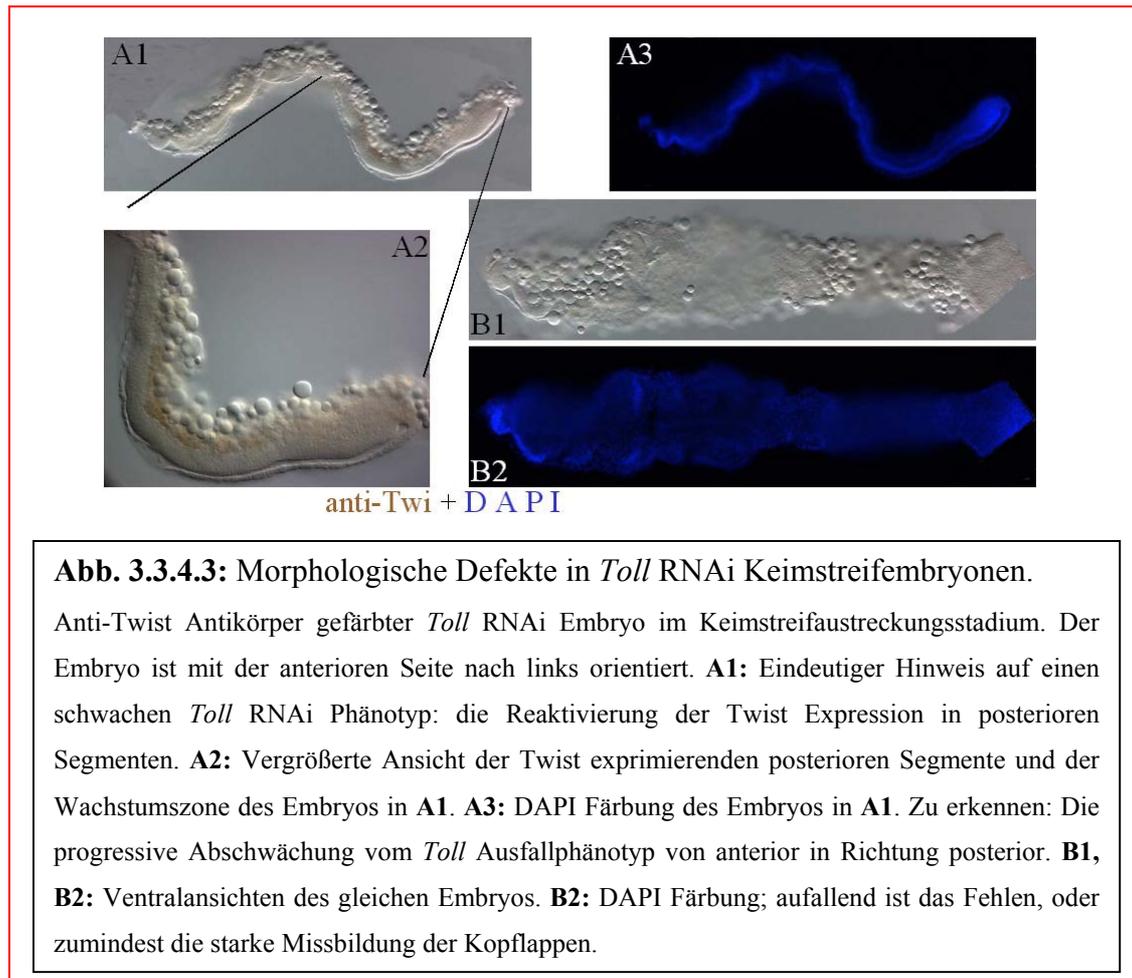


Abb. 3.3.4.2: *twi* Expression in *dsToll* RNA Embryonen

Die Abbildungen zeigen Lateral-Ansichten, anterior ist links. **A:** Fluoreszenz Färbung gegen das Twist Protein (rot) und F-Actin-Zellmembran Färbung eines *Wildtyp* Embryos während der Ausbildung der posterioren Amnionfalte. Das Twist Protein ist im gesamten Keimrudiment detektierbar. **B:** *twist in situ* Färbung an einem *Toll* RNAi Embryo. Das Keimrudiment zeigt eine starke *twist* Expression, allerdings ist es nach posterior verschoben. **C,D:** *twi in situ* und anti-Engrailed Antikörper doppelgefärbte Keimstreifen-Embryonen. *twi* mRNA Transkripte zeigen in Wildtyp Embryonen eine segmentale Expression(**C**). **D:** In anterioren Segmenten fehlt die *twi* Expression, in später geformten posterioren Segmenten wird die *twi* Expression sichtbar.

Diese Embryonen stellen die schwächsten gefundenen Phänotypen dar.

Außer an der Reaktivierung der *twist* Expression ist es auch möglich, rein morphologisch das progressive Verschwinden des RNAi Effektes zu dokumentieren. Der Embryo in Abbildung 3.3.4.3 zeigt nicht nur die Reaktivierung der Twist Protein-Expression (siehe auch Kapitel 3.4.1.1) in posterioren Segmenten (Abb. 3.3.4.3.A1 und A2) und eine morphologisch normale Wachstumszone, an deren posterioren Ende auch Twist exprimiert wird (Abb. 3.3.4.3.A2), sondern auch die Verbesserung der Morphologie von anterior nach posterior.



Zwar umhüllt das Amnion die ventrale Seite des Embryos, aber das Keimrudiment ist an mehreren Stellen gewölbt und uneben (Abb. 3.3.4.3.A3). Ein eindeutiger Hinweis der Stärke des RNAi Effektes in früh angelegten anterioren Regionen ist das Fehlen der Kopflappen (Abb. 3.3.4.3.A3 und B2).

Die Untersuchung der *Toll* RNAi Embryonen zeigt, dass ein Ausfallen des Rezeptors sich auf die Ausbildung der Dorsoventralachse auswirkt. Somit scheint die Funktion von *TcToll* hinsichtlich der dorsoventralen Musterbildung konserviert zu sein.

3.3.5: Statistik der *Toll* RNAi Ausfallphänotypen

Wie schon in Kapitel 3.3.4 erwähnt, beeinflusst der Zeitpunkt der Fixierung der Embryonen bezüglich des Injektionsdatums die Häufigkeit und Stärke der auftretenden Phänotypen. Je

mehr Zeit vergeht, desto schwächer werden die RNAi Phänotypen und desto mehr wildtypische Embryonen sind in der jeweiligen Ablage zu finden. In der Tabelle 3.3.5 sind die Statistiken über die Häufigkeit und Stärke der *Toll* Ausfallphänotypen von zwei Ablagen dokumentiert. Die angegebenen Statistiken beruhen auf Antikörper und *in situ* Färbungen, sowie auf beobachteten morphologischen Defekten während der Embryogenese. Die erste Fixierung von Embryonen wurde 9 Tage nach der puppalen Injektion durchgeführt, die zweite Fixierung 13 Tage danach. Dabei stellte sich heraus, dass im Zeitraum von nur 4 Tagen die Zahl der Mutanten Phänotypen um mehr als 20% zurückging. Den wesentlichen Unterschied macht der Rückgang der starken Phänotypen aus. Mit starken Phänotypen sind hier hauptsächlich die rotationssymmetrischen Embryonen und die langen schlauchförmigen Strukturen gemeint. In den intermediären und schwachen Phänotypen sind keine großen Differenzen zu dokumentieren (siehe Tabelle 3.3.5.1).

<i>Toll</i> RNAi Injektion						
Tage nach Injektion	Gesamtelte Eier	Phänotyp				Anzahl der Mutanten (%)
		<i>stark;</i> (%)	<i>medium;</i> (%)	<i>schwach;</i> (%)	<i>wt;</i> (%)	
9	159	108; (67,0)	18; (11,1)	12; (6,7)	21; (15,2)	138/159; (84,8)
13	131	63; (48,1)	13; (10,0)	8; (6,1)	47; (35,8)	84/131; (64,2)

Tabelle 3.3.5.1: Statistik des Auftretens der *Toll* Ausfallphänotypen.
Für Details, siehe Text.

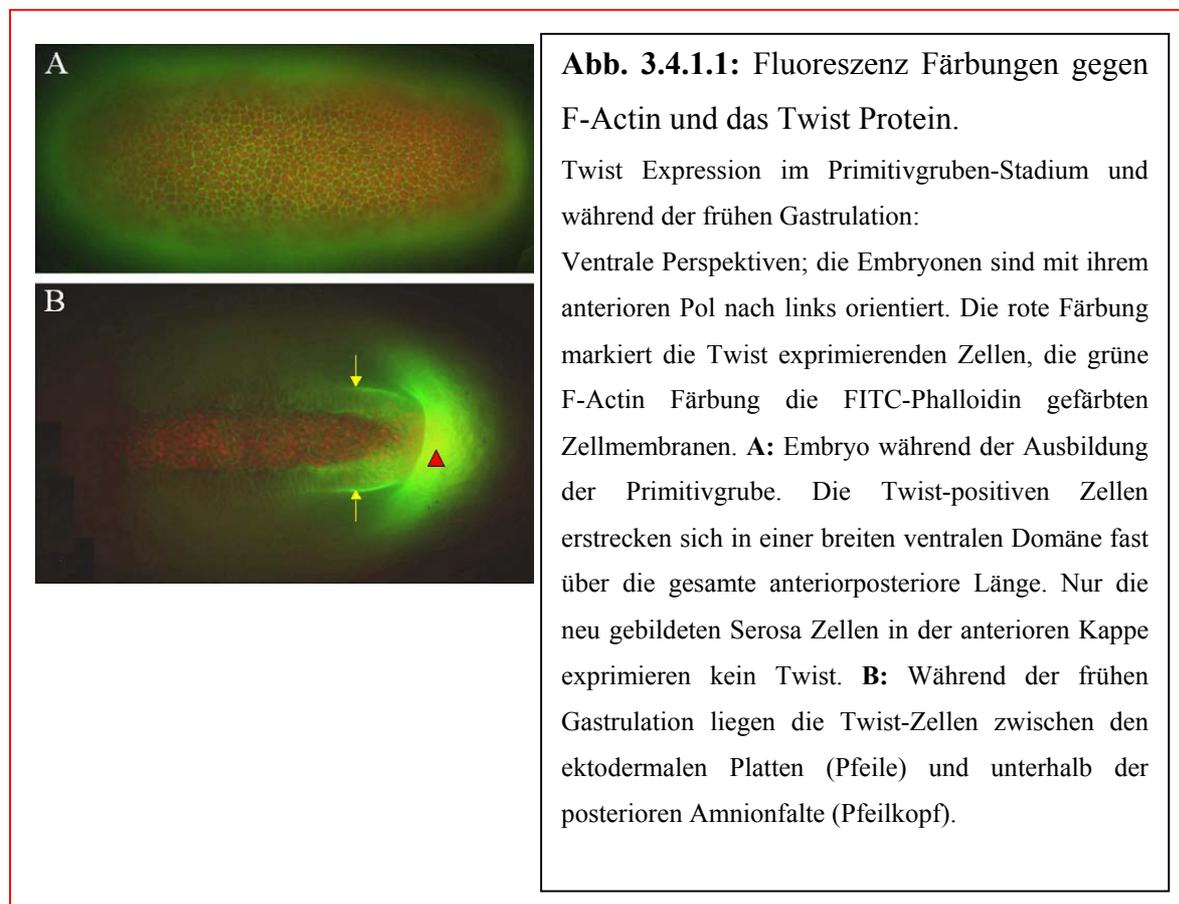
3.4 Vermeintliche Zielgene der *Toll* Kaskade

In Kapitel 3.3 konnten wir zeigen, dass ein Ausschalten des *Toll* Rezeptors gravierende Konsequenzen mit sich bringt, die sich in dorsalisierten Embryonen widerspiegeln. In *Drosophila* sind die beiden mesodermalen Gene *twist* und *snail* direkte Ziele der *Toll* Kaskade. In *Tribolium* werden *twi* und *snail* auch ventral exprimiert (Sommer und Tautz,

1994), (siehe Kapitel 3.4.1.1 und 3.4.1.2) und genaue Studien der Ventralfurchen-Expression des Twist Proteins sind vorhanden (Handel *et al.*, in Bearbeitung), jedoch ist die Funktion der beiden Gene hinsichtlich Ventralfurchenbildung, Gastrulation und Mesodermentwicklung nicht geklärt. Studien der Expressionsmuster und RNAi mit den Genen sowie puppale Doppel-RNAi's mit *twi* und *sna* sollten die genaue Funktion der beiden Gene aufklären.

2.4.1.1 Das Twist Expressionsmuster

Die cDNA Sequenz von *Tribolium twist* ist vollständig kloniert worden und es existiert auch ein Antikörper gegen das Twist Protein, mit dem das genaue Expressionsmuster studiert werden konnte (Handel *et al.*, in Bearbeitung). So ist die Twist Expression in Blastodermstadien in einer breiten Domäne entlang der gesamten anteriorposterioren Achse detektierbar (Handel *et al.*, in Bearbeitung).



Mit der Ausbildung der Serosa-Zellen in der anterioren Region verschwindet dort die Expression (Abb. 3.4.1.1.A). Wenn die posteriore Amnionfalte sich über die Keimanlage erstreckt, und die lateralen ektodermalen Platten sichtbar werden, wird *Twist* in den Zellen exprimiert, die zwischen den beiden Platten verbleiben (Abb. 3.4.1.1.B). Das sind genau die Zellen, die durch die Gastrulationsbewegungen in das Embryo-Innere gelangen. Später, in Keimstreifstadien zeigt *twist* eine segmentale Expression (siehe Abb. 3.3.4.2.C). Die *Twist* Expression bleibt bis zum Schlüpfen der Larve im visceralen und somatischen Mesoderm, im Stomodeum und im Proctodeum erhalten (Handel *et al.*, in Bearbeitung).

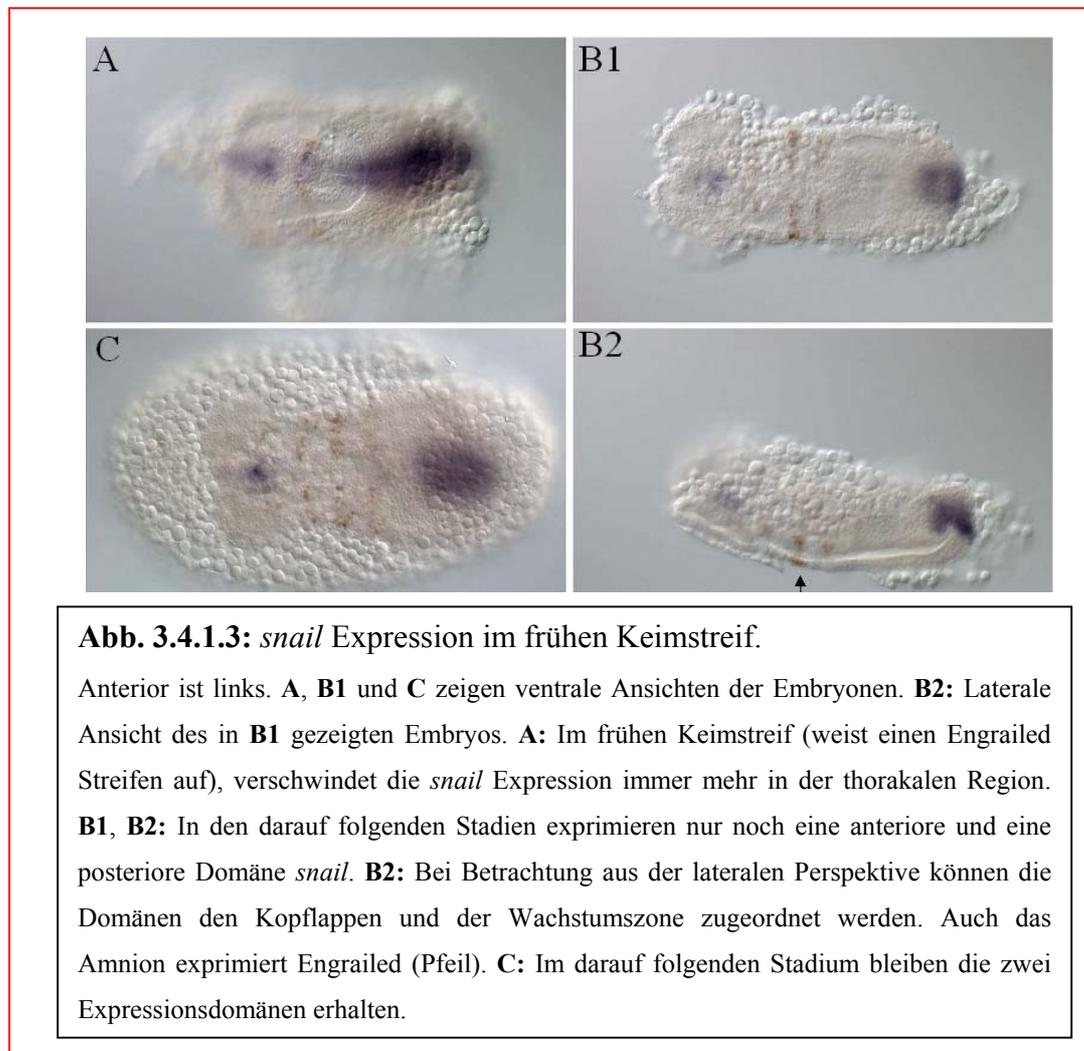
3.4.1.2 Die *snail* mRNA Expression

Ein zweites Gen, das in *Drosophila* in mesodermalen Vorläuferzellen exprimiert wird, ist *snail*. Zusätzlich wird *snail* in späteren Stadien auch im zentralen Nervensystem exprimiert. Auch in *Tribolium* beginnt die *snail* Expression auf der ventralen Seite des Embryos (Sommer und Tautz, 1994), (Abb. 3.4.1.2.A). Sie setzt allerdings später als die *twist* Expression ein.

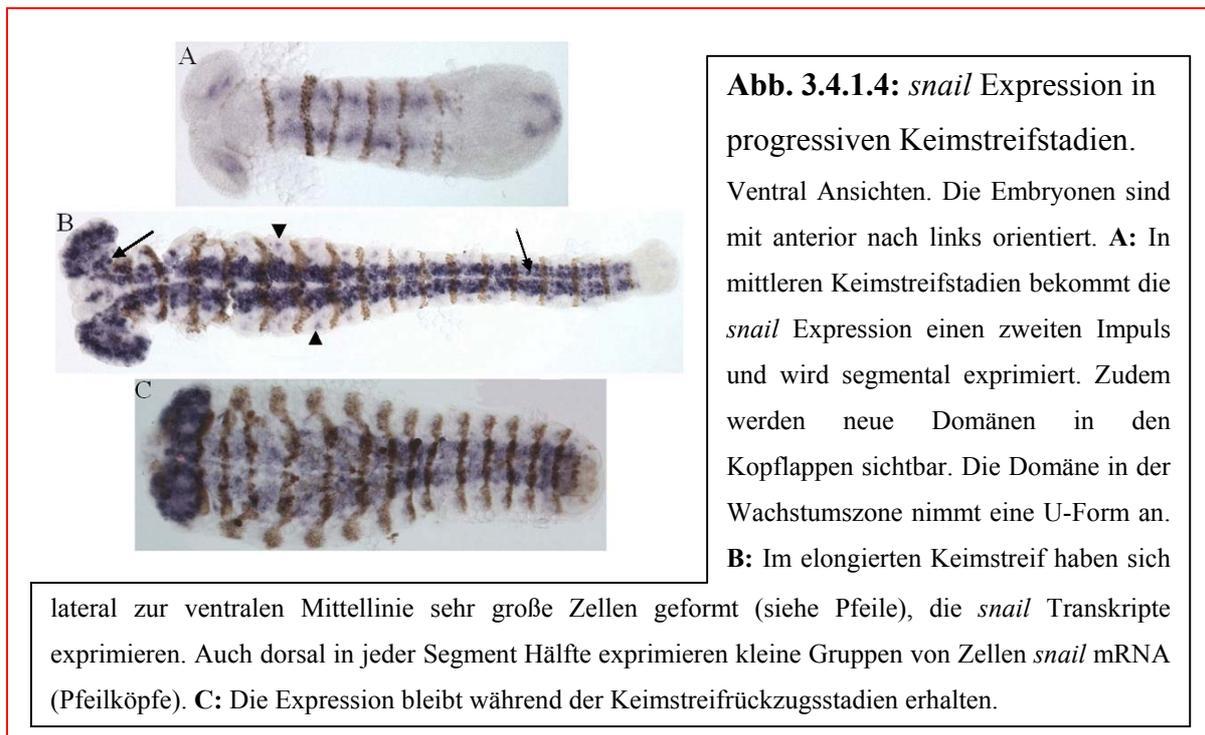


Die *snail* Expression beginnt in einer fortgeschrittenen Phase der Zellularisierung, fast schon zu einem Zeitpunkt, in dem sich anterior die Serosa-Zellen formen. In Stadien, in denen die Primitivgrube gebildet wird, wird *snail* entlang der ventralen Mittellinie der Keimanlage in hohen Konzentrationen exprimiert (Abb. 3.4.1.2.B1 und B2, vergleiche mit A). Besonders im posterioren Bereich der Keimanlage ist die Expression sehr stark. Dies ist auch der Zeitpunkt, zu dem der erste Engrailed Streifen im Keimrudiment sichtbar wird (En in Abb. 3.4.1.2.B2). Das darauf folgende Stadium wurde anhand der Even-Skipped (Eve) Streifen dokumentiert, da Eve auch segmentales Expressionsmuster im Amnion zeigt und somit eine bessere Unterscheidung der Keimanlagenzellen möglich macht. *snail* ist auch in dem Stadium

exprimiert (Pfeile in Abb. 3.4.1.2.C1 und C2), in dem die Keimanlage in den Dotter eintaucht, und der Rand der posterioren Amnionfalte bereits Teile der Keimanlage umhüllt (siehe Pfeilköpfe in Abb. 3.4.1.2.C1 und C2).



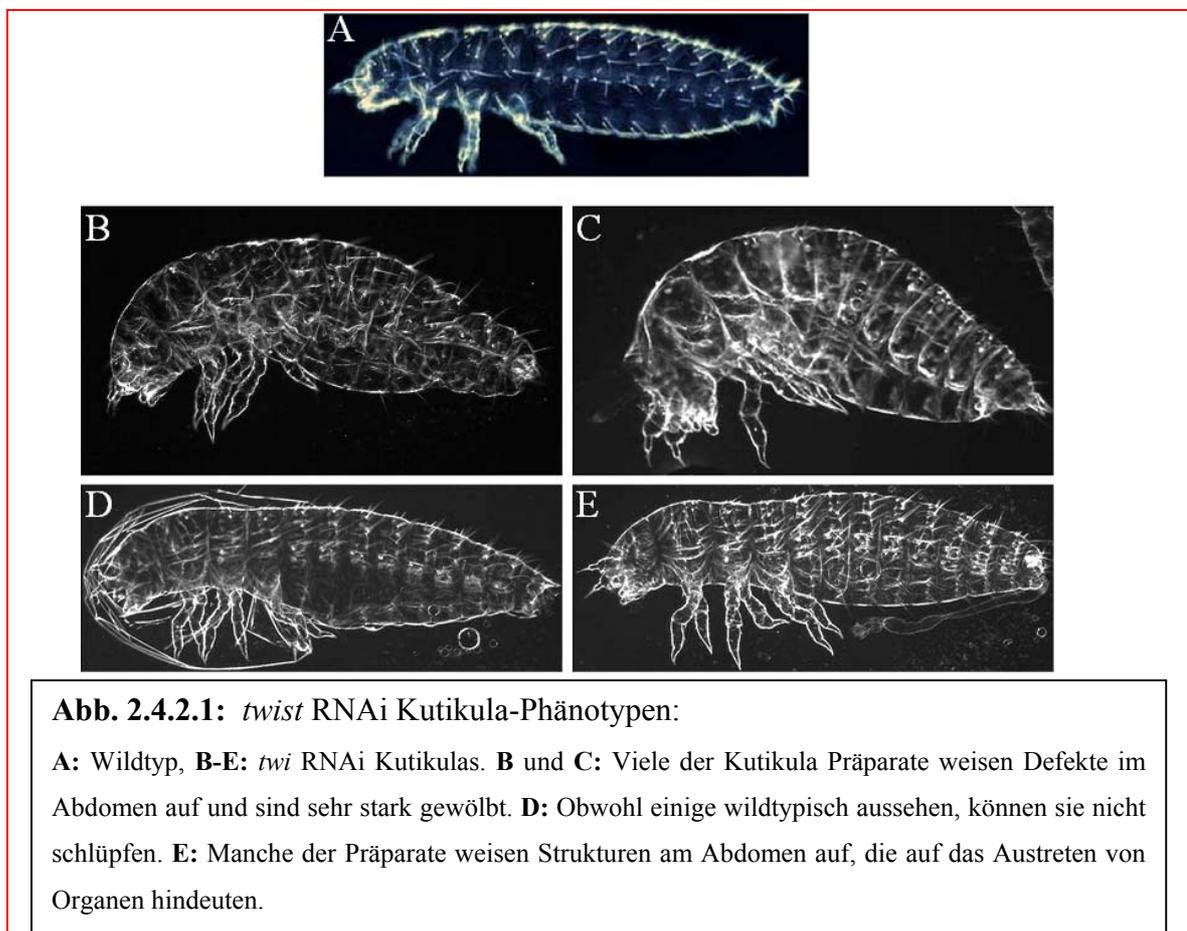
Nach der Gastrulation im frühen Keimstreif-Embryo verschwindet die *snail* Expression immer mehr aus den thorakalen und abdominalen Bereichen (Abb. 3.4.1.3.A). Mit der Formierung neuer Segmente (dokumentiert durch die steigende Zahl von Engrailed Streifen in Abb. 3.4.1.3), bleiben nur noch zwei *snail* exprimierende Domänen übrig: Die posteriore Domäne in der Wachstumszone und die kleinere, anteriore Domäne im Kopflappenbereich (Abb. 3.4.1.3.B1, B2 und C).



In mittleren Keimstreifstadien werden segmentale *snail* Transkripte sichtbar. Dabei wird *snail* nicht entlang der ventralen Mittellinie exprimiert, sondern in zwei lateralen Bereichen innerhalb eines Segments. Die Kopflappendomäne geht über in zwei *snail* exprimierende Regionen, und die Domäne in der Wachstumszone verfeinert sich und nimmt eine U-Form an (Abb. 3.4.1.4.A). Erst im elongierten Keimstreif (siehe die 17 Engrailed Streifen in Abb. 3.4.1.4.B) wird die Natur des zweiten Expressionsimpulses sichtbar. Das Keimblatt in dem es exprimiert wird, ist nicht das Mesoderm, sondern das Ektoderm. Dabei wird *snail* in den Kopflappen und in den Segmenten in sehr großen Zellen (vermutlich sind es Neuroblasten) exprimiert (Pfeile in Abb. 3.4.1.4.B). Außerdem werden in jedem Segment zwei dorsale Regionen sichtbar, in denen *snail* Transkripte detektierbar sind (Pfeilköpfe in Abb. 3.4.1.4.B). Hierbei handelt es sich vermutlich um Neuronen des peripheren Nervensystems. Das neuronale Muster der *snail* Expression bleibt auch während der Keimstreifrückzugsstadien (Abb. 3.4.1.4.C) bis hin zum dorsalen Rückenschluss erhalten.

3.4.2 Puppale Doppelstrang-RNA Injektionen mit *twist*

Wie in Kapitel 1.2.3.1 erwähnt, ist *twist* in *Drosophila* an der Aktivierung von mesodermalen Differenzierungsgenen beteiligt. Zudem kontrolliert es auch die Expression von *snail*. Deshalb verursacht das Fehlen von *twist* gravierende Defekte in der Ventralfurchen- und Mesodermbildung (Leptin und Grünewald, 1990). Um festzustellen, ob *twi* auch in *Tribolium* Funktionen in der Mesoderm-Entwicklung hat, und ob *snail* *twist* untergeordnet ist, wurden *twi* RNAi Injektionen durchgeführt. Als erstes wurden Kutikula Präparationen der RNAi Larven untersucht (siehe Abb. 3.4.2.1).



Zwar zeigen diese bei erstem Hinschauen keine wesentlichen Unterschiede gegenüber dem Wildtyp (Abb. 3.4.2.1.A), allerdings sind nur 8 von 327 Larven geschlüpft. Erst nach genauer Betrachtung lassen sich die Unterschiede erkennen: Viele der Larven sind kürzer und dicker, und sie sind auf der dorsalen Seite stark gewölbt. In einigen Fällen ist der ganze Thorax weit verdickt (Abb. 3.4.2.1.C).. In 11 der 319 Kutikula Präparate konnte eine lange schlauchförmige Struktur ausgemacht werden, die aus dem Abdomen austrat und vermutlich

das Proktodeum darstellt (Abb. 3.4.2.1.E, siehe auch Kapitel 4.4). In einigen Kutikulas konnten verdickte klumpige Beine festgestellt werden (Daten nicht gezeigt).

Als nächstes ging es darum festzustellen, in wie fern mit der RNAi eine Abschaltung des Gens erreicht werden konnte. Waren die Kutikula-Anomalien eine Konsequenz der unzureichenden Genaktivität von *twist* oder wirkte die ganze Prozedur einfach toxisch, und konnten die Larven aus diesem Grund nicht schlüpfen. Eine *in situ* Färbung mit einer *twist* Sonde sollte Aufschluss geben, inwiefern noch *twist* Aktivität übriggeblieben ist.

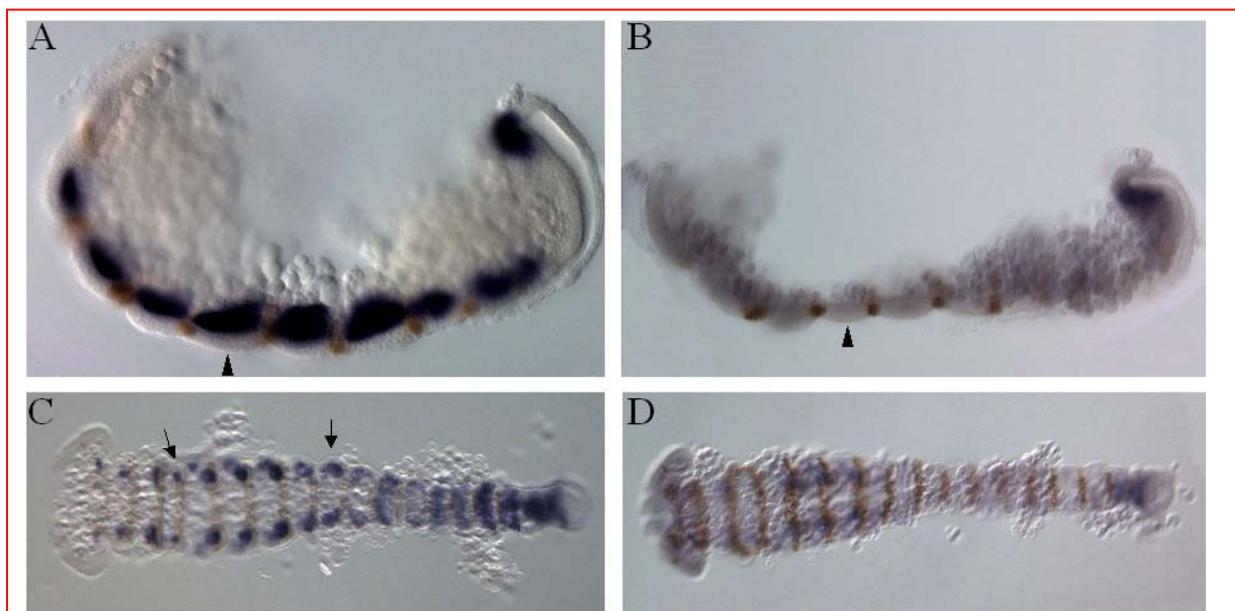


Abb. 3.4.2.2: *twist in situ* und anti-Engrailed Antikörper Färbungen an *twi* RNAi Embryonen.

Anterior ist links. **A** und **C** sind Wildtypen, **B** und **D** *twi* RNAi Embryonen. **A** und **B**: Laterale Ansichten. **A**: Embryonen im Keimstreifausstreckungsstadium zeigen eine starke segmentale *twist* Expression. **B**: Lediglich in schwächeren Phänotypen werden die *twi* Transkripte in der Wachstumszone nicht mehr abgebaut. Der Embryo scheint nur aus einem Keimblatt, dem Ektoderm, zu bestehen (vergleiche Pfeilköpfe von **B** mit **A**). **C**: Im elongierten Keimstreif wird *twi* in den Segmenten in coelomischen Säcken exprimiert (Pfeile). In *twi* RNAi Embryonen ist die *twi* Expression auch im elongierten Keimstreif nicht detektierbar. **D**: In einigen Embryonen werden *twi* Transkripte in den letzten beiden Segmenten und in den sich neu bildenden Beinknospen sichtbar.

Die *in situ* Färbung zeigt, dass in fast allen Embryonen ein Abbau der *twist* Transkripte erzielt wurde, da keine *twist* Expression nachgewiesen werden konnte (Daten nicht gezeigt). In einigen Embryonen konnte ähnlich wie in den *Toll* RNAi Embryonen, in neu formierten

Segmenten *twist* Transkriptexpression nachgewiesen werden (siehe Abb. 3.4.2.2). Während in früher gebildeten Segmenten keine *twist* Transkripte detektierbar sind (Abb. 3.4.2.2.B und D), fangen neu gebildete Segmente an, *twist* zu exprimieren. Die Reaktivierung kann zu unterschiedlichen Entwicklungsstadien erfolgen. Während der Embryo in Abb. 3.4.2.2.B sich noch im Keimstreifextensionsstadium befindet und die Wachstumszone anfängt, *twist* zu exprimieren, ist der Embryo in Abb. 3.4.2.2.D schon im voll-elongierten Keimstreif (zu erkennen an den 17 Engrailed Streifen), und exprimiert das Gen sowohl in den letzten beiden abdominalen Segmenten als auch in den sich formierenden Beinknospen. Die Expression in den coelomischen Säcken, die sich in dieser Phase der Entwicklung geformt haben (siehe Pfeile in Abb. 3.4.2.2.C), ist in den *twist* RNAi Embryonen nicht zu sehen. Es scheint auch, als würden diese Embryonen nur aus einem einzigen Keimblatt bestehen, (siehe Pfeilköpfe in A: Wildtyp und B: *twist* RNAi Embryo). Letztendlich bedeutet das, dass durch die RNAi eine Ausschaltung der *twist* mRNA erreicht wurde.

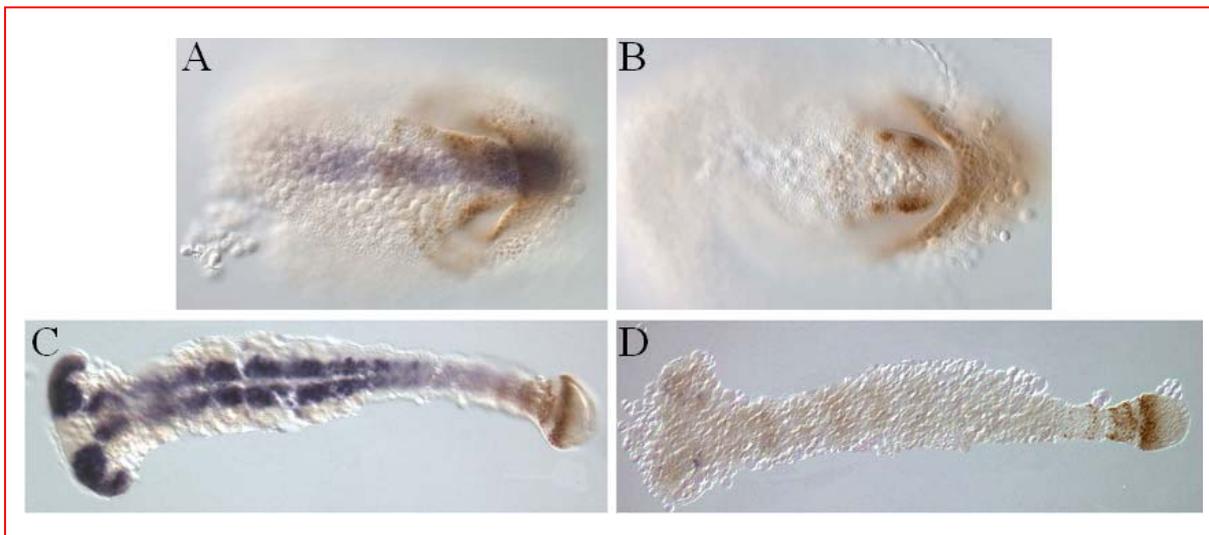
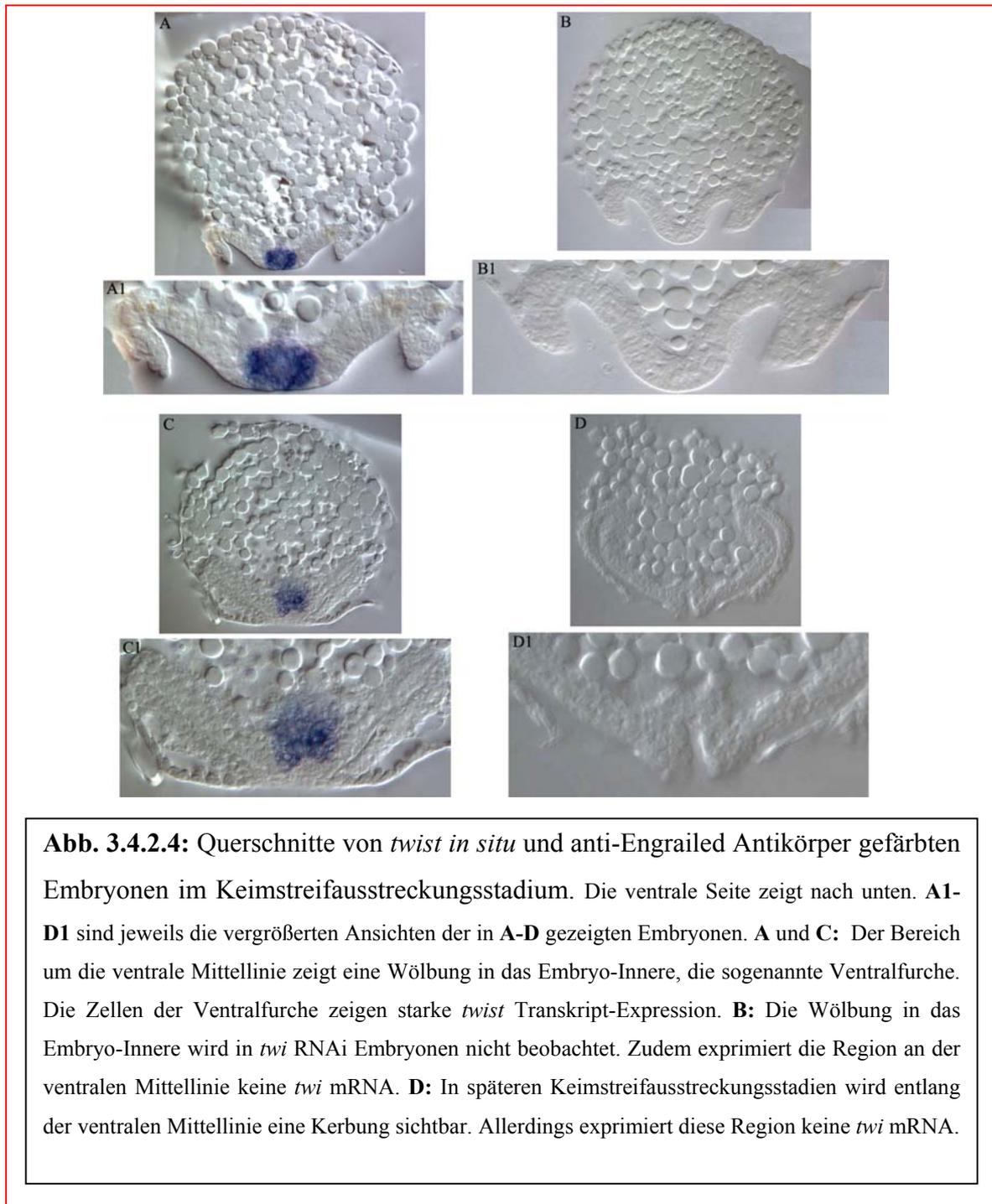


Abb. 3.4.2.3: *snail* Expression in *twi* RNAi Embryonen.

Die Embryonen sind mit anterior nach links orientiert; Ventral-Ansichten. **A** und **C** sind wildtypisch, **B** und **D** sind *twi* RNAi Embryonen. **A** und **B**, und **C** und **D** sind jeweils im ähnlichen Stadium. Als Kontrolle für das Stadium in dem sie sich befinden, sind die Embryonen mit dem Eve Antikörper gefärbt (braune Färbung). **A:** Während der frühen Gastrulation erstreckt sich die *snail* Domäne entlang der ventralen Mittellinie über die gesamte anterior-posteriore Achse der Keimanlage. **B:** In *twi* RNAi Embryonen ist die *snail* Expression völlig verschwunden, oder nicht mehr detektierbar. **C:** Im elongierendem Keimstreif wird eine starke ektodermale Expression sichtbar, die in *twi* RNAi Embryonen völlig verschwindet. **D:** In einigen Embryonen wird nach dem abschwächen des RNAi Effekts eine sehr schwache *snail* Expression in den Kopflappen detektierbar.

Es ist aber auch interessant herauszufinden, ob *snail* ähnlich wie bei *Drosophila*, von *twist* kontrolliert wird. Dazu wurde mit den *twist* RNAi Embryonen *snail in situ* Hybridisierungen durchgeführt. Das Resultat dieser Färbungen ist in Abb. 3.4.2.3 gezeigt. In *twi* RNAi Embryonen sind keine *snail* Transkripte nachweisbar (Abb. 3.4.2.3.B und D). Überraschender Weise gilt dies auch für Embryonen Keimstreifstadium. (Abb. 3.4.2.3.D, vergleiche mit Abb. 3.4.2.3.C). Es konnte keine Expression von *snail* in den Neuroblasten des ZNS nachgewiesen werden. Allerdings zeigt sich in dem Embryo in Abb. 3.4.2.3.D eine Reaktivierung der Expression im Kopflappenbereich. In dieser Arbeit konnte die Auswirkung der *twi* RNAi in Bezug auf *twist* Transkriptexpression und die Funktion von *Tribolium twist* als ein zygotisches Master-Kontroll-Gen dokumentiert werden. Zum Abschluss dieses Versuchs habe ich Querschnitte von *twi* RNAi Embryonen präpariert um festzustellen, wie die Ausschaltung der *twist* mRNA sich auf die Ventralfurchenbildung auswirkt. In *Drosophila* zeigen *twist* mutante Embryonen gravierende Defekte in der Ausbildung der Ventralfurche.



Die Abbildung 3.4.2.4 zeigt Querschnitte von Embryonen, die *twist in situ* gefärbt worden sind. Während in frühen Keimstreifausstreckungsstadien die Ventralfurche die gewöhnliche Kerbung zeigt und *twist* Transkripte exprimiert (Abb. 3.4.2.4.A), weist die ventrale Region der *twi* RNAi Embryonen absolut keine Furche auf (Abb. 3.4.2.4.B). Außerdem exprimiert der ventrale Bereich keine *twi* mRNA (siehe auch Abb 3.4.2.4.B1). In späteren Keimstreif Ausstreckungsstadien, wenn die ektodermalen Platten in Richtung der dorsalen Mittellinie

elongieren, bildet sich eine Furche, die allerdings keine mesodermalen Zellen beinhaltet (Abb. 3.4.2.4.D und D1). Solch eine Furchenbildung in diesem Stadium ist in Wildtypembryonen nicht beobachtet worden (Abb. 2.4.2.4.C und C1).

3.4.3 RNAi Injektionen mit *snail* dsRNA und Doppelinjektionen mit *snail* und *twist* dsRNA

In *Drosophila* ist *snail* zusammen mit *twist* an der Ausbildung der Ventralfurche und des Mesoderms beteiligt. Um herauszufinden, welchen Einfluss *Tribolium snail* auf die Venralfurchen-Ausbildung und auch auf die Ausbildung von mesodermalen Zellen hat, wurden puppale *snail* dsRNA Injektionen durchgeführt. Zusätzlich wurden Doppel-Injektionen mit *twist* und *snail* dsRNA durchgeführt. Die Idee ist, eine Amplifizierung des *twist* oder *snail* Ausfallphänotyps durch Doppelinjektionen zu erzielen.

Das Resultat der *snail* RNAi wies keine großen Unterschiede zu der *twist* RNAi auf. Fast alle RNAi Larven waren nicht in der Lage, aus den beiden Hüllen zu schlüpfen, obwohl sie phänotypisch zum Wildtyp keine erkennbaren Unterschiede aufwiesen (Daten nicht gezeigt). Auch die Doppel-Injektionen zeigten keine wesentlichen Unterschiede zu der *twist* dsRNA Injektion (Daten nicht gezeigt, für weitere Information, siehe Kapitel 4.5).

4. Diskussion

In dieser Arbeit wurde mit der 5'RACE Methode die *Tribolium Toll* cDNA Sequenz vervollständigt und das Expressionsmuster studiert. Mit der puppalen RNAi Technik wurde gezeigt, welche Funktion *Tribolium Toll* hinsichtlich der dorsoventralen Achsenbildung hat. Zusätzlich wurde der Ausfallphänotyp des mesodermalen Gens *twist* analysiert. Die *snail* mRNA Expression wurde ebenfalls studiert und mit *snail* paternale dsRNA Injektionen durchgeführt.

4.1 Die *Tribolium Toll* cDNA

Die kodierende Region der *Tribolium Toll* cDNA Sequenz (siehe Anhang) mit einer Größe von 2,75 kb ist kleiner als die kodierende Region der *Drosophila Toll* cDNA Sequenz mit 3,40 kb. Die *Drosophila* mRNA besteht aus insgesamt 5 Exons, wobei nur das 3. und das 4. Exon translatiert werden. Die kodierende Region von *TcToll* wird von 2 Introns unterbrochen. Das erste Intron konnte nach dem Vergleich der genomischen DNA mit der cDNA Region, die die zytoplasmatische Domäne kodiert, identifiziert werden (Basal, 2000). Das zweite Intron wurde anhand dieser Studie in der extrazellulären Domäne auffindig gemacht. Die Intron-Exon Strukturen, sowie die Größe der kodierenden Regionen sind zwischen *TcToll* und *DmToll* nicht konserviert. Mit den 5' und 3' nicht kodierenden Regionen erreicht *DmToll* eine Größe von 5,50 kb, während die zur Zeit bekannten *TcToll* Sequenzen sich zu einer Größe von 3,05 kb aufaddieren.

Zwar gelang es für *TcToll*, den aus der genomischen DNA Sequenz vorhergesagten Translationsstartpunkt auch in der cDNA zu finden, allerdings besteht immer noch Unsicherheit in Bezug auf den Transkriptionsstartpunkt. Dieser ist von Interesse, um cis-regulatorische Sequenzen von *TcToll* zu analysieren. .

Zweifel an der Vollständigkeit der mittels der 5' RACE Methode amplifizierte cDNA ergeben sich aus zwei Gründen: Erstens wird in *DmToll* das Translationsstartkodon von einer nicht-translatierten Sequenz flankiert, die mehrere hundert Basen groß ist. So ist es möglich, dass auch *TcToll* eine große 5' nicht-translatierte Region (5' UTR) beinhaltet. Der eigentliche Grund liegt aber in der Limitation der angewandten Methode. Die RACE Methode stößt bei Amplifikationsgrößenordnungen von 3,5-4,0 kb an ihre Grenzen. Es ist sehr schwierig, cDNA Fragmente zu amplifizieren, die größer als 4,0 kb sind.

Jedenfalls ist die 5' nicht-translatierte Sequenz der cDNA nicht in der 2,5 kb Region enthalten, welche 5' zur genomischen *Toll* Region liegt. Diese Region wurde während der Arbeiten an der genomischen Sequenz kloniert (Basal, 2000). Die genomische *Drosophila Toll* Region erstreckt sich über 44 kb. So ist es nicht verwunderlich, dass in der genomischen DNA Sequenz von *Tribolium* die 5' UTR nicht in unmittelbarer Nähe zum Translationsstartpunkt liegt.

4.2 *TcToll* und seine ursprüngliche Rolle in der Embryonalentwicklung

Wie in Kapitel 1.2.1 beschrieben, werden in *Drosophila Toll* Transkripte maternal abgelegt und sind im Ei uniform verteilt in hohen Konzentrationen zu finden. Nur die Aktivierung erfolgt in syncytialen Blastodermstadien auf der ventralen Seite des Embryos. Zudem zeigt *Drosophila Toll* während den Embryogenesestadien ein komplexes Expressionsmuster und übernimmt diverse Funktionen (siehe Kapitel 1.3.1).

In *Tribolium* konnten weder durch die RT-PCR Technik mit cDNA aus unbefruchteten Eiern, noch mit *in situ* Färbungen an Präblastoderm-Embryonen und an unbefruchteten Eiern maternale *Toll* Transkripte nachgewiesen werden. Erste Transkripte werden in Blastodermstadien direkt auf der ventralen Seite des Embryos sichtbar. Deshalb muss ein anfänglicher Aktivator für die zygotische *Toll*-Transkription gefordert werden. Da während der frühen Oogenese *Toll* Transkripte detektiert werden können, ist es möglich, dass das *Toll* Protein schon während der Oogenese translatiert wird. Da die Kernlokalisierung von Dorsal und die Transkript-Expression von *Toll* zum gleichen Zeitpunkt beobachtet werden, würde das vorhandene Toll Protein ausreichen, um die Kernlokalisierung von Dorsal zu initiieren. Danach würde ein Rückkopplungsmechanismus zwischen *Dorsal* und *Toll* die zygotische Expression von *Toll* auslösen. Allerdings würde dies nur unter einer Voraussetzung geschehen, nämlich dass der Toll-Ligand ventral-spezifisch aktiviert wird. Da die Translation von *Toll* auf der ventralen Seite verstärkt wird, würde nebenbei auch verhindert werden, dass der Ligand vom Aktionsort wegdiffundiert. Der schnelle Verbrauch des Liganden wiederum würde den zeitlichen Aktionsradius von Toll eingrenzen. Dies könnte auch die Erklärung für die sehr dynamische Expression von *Toll* entlang der ventralen Mittellinie sein, denn auch die Kernlokalisierung von Dorsal geschieht in einem relativ kleinen Zeitfenster. Allerdings lässt es sich mit diesem Modell nicht erklären, wie die starke Expression im Kopflappenbereich ausgebildet und während den Keimstreifextensionsstadien aufrecht erhalten wird, weil Dorsal

in diesem Stadium nicht mehr vorhanden ist. Eine Möglichkeit, eine Antwort auf diese Fragestellung zu bekommen, ist die präzise Analyse des Expressionsmusters des *TcToll* Proteins. Dazu müsste ein Antikörper produziert, die Expression in verschiedenen Entwicklungsstadien (unter anderem auch in Ovarien), und die Interaktionen mit den anderen bekannten dorsoventral-Genen studiert werden.

DmToll wird während später Embryogenese in Motorneuronen und im zentralen Nervensystem exprimiert, und in anderen Regionen, in denen starke morphogenetische Bewegungen beobachtet werden. Die starke *TcToll* Expression im Kopflappenbereich lässt daher vermuten, dass Toll in den Kopflappen ähnliche Funktionen ausüben könnte: Bekanntlich finden in den Kopflappen während den Keimstreifstadien sehr starke morphogenetische Bewegungen statt.

Außer der Expression in den Kopflappen, konnte ich während der späten Embryogenese keine weitere gewebe-spezifische Expression von *Toll* Transkripten beobachten. Es scheint, als würde *Toll* in späteren Entwicklungsprozessen nicht gebraucht werden. In *Drosophila* hingegen werden während der späteren Embryogenese nicht nur *Toll*, sondern auch die restlichen *Toll* Homologen in verschiedensten Geweben exprimiert. So könnte es sein, dass *Toll* eine ursprünglich weniger bedeutende Rolle hatte. Die Funktionen, die *Toll* nun in den Dipteren hat, könnten in primitiveren Insekten zum Teil von anderen *Toll*-ähnlichen Rezeptoren abgedeckt worden sein. So kann es sein, dass die *Tribolium-Toll* Funktion sich im zentralen Nervensystem nur auf die Kopfregion (vielleicht auf eine Funktion in der Gehirn-Entwicklung) beschränkt, während die restliche Aktivität, die in den Dipteren beobachtet wird, von anderen *Toll*-Homologen ausgeführt wird. Im Laufe der Evolution könnte *Toll* diese zusätzlichen Funktionen übernommen haben. Die Klonierung von *Toll* Homologen aus *Tribolium* und die Studie der Expressionsmuster, sowie die Vergleiche mit *Drosophila* könnten aufschlussreich sein.

Außer für seine Funktion in der dorsoventralen Achsenbildung und bei der Immunantwort ist für *DmToll* zu keinem anderen Zeitpunkt und in keinem anderen Gewebe bewiesen worden, dass es von Spätzle aktiviert wird. Möglicher Weise fungieren die Toll-Rezeptoren in diesen Geweben ohne Liganden-abhängige Aktivierung. Dies könnte auch für die Funktion von *Tribolium Toll* in den Kopflappen zutreffen. Jedenfalls ist die *Toll* Expression in den Kopflappen nicht von Dorsal abhängig, denn in den Kopflappen wird keine Dorsal Expression beobachtet. Hinzu kommt, dass die dorsoventrale Musterbildungs-Kaskade zum Zeitpunkt der Kopplappenausbildung ihre Funktion zum größten Teil vollbracht hat.

4.3 Die Toll RNAi Phänotypen:

Die *in situ* Färbungen mit *zen* und *dpp* und DAPI Färbungen an *Toll* RNAi Embryonen (siehe Abb. 3.3, 3.3.3.1 und 3.3.3.2) zeigen, dass die Embryonen bezüglich der Dorsoventralachse keine Polarität mehr besitzen. Die Zellen des Keimrudiments verschieben sich gleichmäßig zum posterioren Pol. Ebenfalls völlig gleichmäßig expandieren die Serosa-Zellen über die anterioren und mittleren Bereiche. Deshalb formen *zen* und *dpp*, die im Wildtyp während der Ausbildung der Primitivgrube an der Grenze zwischen der Serosa und dem Keimrudiment exprimiert werden und eine anterior-dorsale Kappe bilden, in *Toll* RNAi Embryonen Ringe, die zwar auch an der Grenze zwischen Serosa und Keimrudiment lokalisiert sind, die aber den gesamten Umfang des Embryos gleichmäßig umspannen. Diese rotationssymmetrische Expression von *zen* und *dpp* Transkripten zeigt, dass die dorsoventrale Positionsinformation verloren gegangen ist.

Ein anderer Hinweis auf fehlende Positionsinformation zeigt sich in Stadien, in denen sich im Wildtyp die Primitivgrube formt und gleichzeitig an der dorsalen Seite der Grube die posteriore Amnionfalte und an der ventralen Seite das Keimrudiment sichtbar werden. In *Toll* RNAi Embryonen vertieft sich die Grube völlig gleichmäßig von der posterioren Seite in das Embryo-Innere (siehe Abb. 3.3.2.2.A1 und A2). In dem Stadium ist nicht zu unterscheiden, ob die zur Grube benachbarten Zellen das Amnion ausbilden, oder eher rund um die Grube das Keimrudiment formen. In einigen Fällen zeigt die Invagination, die zunehmend die Form eines Sacks annimmt, eine gewisse dorsoventrale Polarität (Abb. 3.3.2.2.B), obwohl die *twist* Expression völlig abgeschaltet ist. So könnte eine geringe Anzahl von Toll Rezeptoren genügen, um erste Positionsinformationen zu vermitteln, allerdings würde es nicht ausreichen, um Zielgene, oder auch den Rückkopplungsmechanismus mit *dorsal* zu aktivieren, der eventuell einen höheren Schwellenwert an verfügbaren Toll Proteinen braucht.

Bei Betrachtung der schwächeren RNAi Phänotypen wird es noch komplizierter, zu einer klaren Aussage über die Funktion von *TcToll* in der Vermittlung von dorsoventraler Positionsinformation zu kommen (siehe Abb. 3.3.4.1 und 3.3.4.2.B). Zwar bilden sich in diesen Embryonen das Amnion und die Keimanlage, wobei in manchen Fällen im Kopflappenbereich *Toll* und im Thorax- und Abdomenbereich *twist* exprimiert werden, aber die Anlage wird relativ zum Wildtyp weiter posterior versetzt gebildet. In extrem Kurzkeim-Insekten wie *Schistocerca* wird die Keimanlage am posterioren Pol ausgebildet. Studien an *Toll* Homologen aus anderen Organismen aber auch unsere Arbeit an *TcToll* deuten darauf

hin, dass *Toll* ursprünglich nicht die Bedeutung in der dorsoventralen Achsenbildung besaß, die es jetzt in den Dipteren hat. Die frühere Funktion der *Toll/Dorsal* Kaskade beschränkte sich womöglich hauptsächlich auf die Immunabwehr. So könnte es sein, dass durch einen geringen Rückgang der *Toll*-Aktivität die Keimanlage sich verkleinert und im Gegensatz zum Wildtyp eine weitaus kleinere Portion des Embryos ausmacht; dadurch, wie bei den extrem Kurzkeimern weiter posterior gebildet wird, also die gesamte Embryonalentwicklung sich dem Grundtypus nähert, (auch RNAi Embryonen von *short gastrulation* zeigen einen sehr ähnlichen Phänotyp, O. Stockhammer u. C. Mikulski, persönliche Mitteilung). Eine geringe *Toll*-Aktivität würde ausreichen, um dorsoventrale Positionsinformation zu vermitteln, da der Oozytenkern ähnlich wie bei *Drosophila* asymmetrisch positioniert wird und dadurch der *Toll*-Ligand ventral-spezifisch aktiviert werden würde. Für die korrekte Positionierung der Keimanlage im Embryo hingegen bedarf es möglicherweise der präzisen Regulierung der *Toll*-Kaskade.

Allerdings muss ich zugeben, dass die oben erwähnten Aussagen sehr spekulativ sind. Womöglich sind die eigentlichen Abläufe völlig anders.

Hingegen ist es weniger spekulativ zu behaupten, dass ein schwacher *Toll* RNAi Effekt, Defekte in der Ventralfurchenbildung und in den Kopflappen verursacht (siehe Abb. 3.3.4.1 und Abb. 3.3.4.3). Dies ist nicht verwunderlich, denn es sind genau die Regionen, die im Wildtyp die *Toll* Transkripte stark exprimieren. Selbst das Fehlen von geringer *Toll* Aktivität wirkt sich anscheinend auf die Ausbildung der beiden Strukturen aus. Dass auch die Ventralfurchenbildung nicht richtig ausgebildet werden kann, deutet darauf hin, dass die Gene, die für die Ventralfurchenausbildung zuständig sind, auch in *Tribolium* über *Toll* aktiviert werden. *twist* Färbungen an *Toll* RNAi Embryonen lieferten dazu den Beweis. Selbst in sehr schwachen RNAi Phänotypen konnte in anterioren Segmenten keine *twist* Aktivität nachgewiesen werden, während mit zunehmendem Alter neu gebildete Segmente anfangen, *twist* zu exprimieren (siehe Abb.3.3.4.2.D und Abb. 3.3.4.3).

4.3.1 Die *twist* Expression am posterioren Ende des *Tribolium* Embryos

Angesichts der Färbungen die in Abb. 3.3.4.2.D und Abb. 3.3.4.3 gezeigt werden, stellt sich dann eine Frage, die nicht eindeutig beantwortet werden kann: Wenn die *Toll* Expression anfänglich nicht ausreicht, um *twist* in anterioren Segmenten zu aktivieren, wie kommt es zur

Aktivierung in neu gebildeten posterioren Segmenten, obwohl im Keimstreif kein *Toll* exprimiert wird?

Eine Hilfestellung leisten *Toll* RNAi Embryonen, deren Ausfallphänotyp stark ausgeprägt ist und die gegen *twist* gefärbt wurden. Selbst die langen dünnen Schläuche exprimieren an ihren posterioren Enden *twist* (siehe Abb. 3.3.3.E1 und F1), obwohl eindeutig klar ist, dass *Toll* sehr stark deaktiviert ist. Also unterliegt *twist* am posterioren Pol nicht der Kontrolle der *Toll* Kaskade (zumindest nicht in allen Stadien der Embryogenese). Analog zu *Drosophila* könnte *Tctwist* im posterioren Bereich durch das terminale System kontrolliert werden, aus diesem Grund würde das Ausfallen der *Toll* Aktivität die posteriore *twist* Expression nicht beeinflussen. Bestärkt wird diese Annahme durch Experimente, in denen *LacZ* Reporter-Konstrukte mit genomischen Regionen des *Tctwist* Gens in *Drosophila* exprimiert wurden. In *torso* mutanten Embryonen verschwand die posteriore Expressionsdomäne (Handel *et al.*, in Bearbeitung). So könnten durch den Einfluss des terminalen Systems neue Segmente, die von der Wachstumszone gebildet werden *twist* exprimieren, während frühe Segmente kein *twist* exprimieren würden.

Anscheinend wird die posteriore *twist* Expression auch benötigt, um das Proctodeum auszubilden. Im Wildtyp wird im Proctodeum eine starke *twist* Expression beobachtet (Handel *et al.*, in Bearbeitung). In den schlauchförmigen *Toll* RNAi Embryonen kann man am posterioren Terminus eine Struktur unterscheiden, die womöglich das Überbleibsel eines Proctodeums ist (Abb. 3.3.3.D1).

4.3.2 Welchen Ursprung haben die Zellen der Schlauchförmigen *Toll* RNAi Embryonen?

Lässt man die rotationssymmetrischen *Toll* RNAi Embryonen weiter entwickeln, so bilden sie die in Abb. 3.3.3 gezeigten schlauchförmigen Strukturen. Der interessante Punkt ist, dass diese Strukturen mit Segmentierungsmarkern wie *Engrailed* oder *Even-skipped* gefärbt werden können. D.h., diese Schläuche zeigen Hinweise auf Segmentierung. Die Schläuche zeigen in den Bereichen, in denen sie *Engrailed* exprimieren, Verengungen, was darauf hindeutet, dass die einzelnen Segmente auch eine gewisse Polarität besitzen. Da bei den rotationssymmetrischen Embryonen nicht zu unterscheiden ist, ob die nach posterior verschobenen Keimanlagenzellen das Amnion bilden oder die Anlagen des Embryos, stellt sich die Frage, welchen Ursprung die Zellen der Schläuche haben.

Im Wildtyp formt sich nach der Ausbildung der Primitivgrube aus dem dorsalen Bereich, also der Region, die keine Information von der *Toll* Kaskade bekommt, die posteriore Amnionfalte. In dorsalisierten *Toll* RNAi Embryonen, würde die ventrale Positionsinformation verloren gehen, und alle Zellen rund um die Grube würden dorsale Identitäten bekommen. Da die Grube sich auch völlig symmetrisch in das Ei-Innere vertieft, würden die invaginierenden Zellen, die die gleichmäßig runden Schläuche bilden, nur aus dem Amnion bestehen. Verstärkt wird diese Annahme durch *Engrailed* oder *Even-skipped* Färbungen an Wildtyp Embryonen (siehe Abb. 3.4.1.2 und Abb. 3.4.1.3). Parallel zur *Engrailed* Domäne des Embryos wird eine Region im Amnion sichtbar. Die *Even-skipped* Domänen im Amnion des wachsenden Keimstreifs fallen sogar stärker aus.

4.3.3 Der zeitliche Rückgang des *Toll* RNAi Effektes

Die Stabilität des RNAi Effektes kann anhand von Vergleichen der Kutikula Präparate untersucht werden, die relativ zum parentalen Injektionsdatum aus progressiv älteren Ablagen präpariert werden. Generell wird bei RNAi ein logarithmischer Rückgang des Ausfallphänotyps beobachtet (Bucher *et al.*, 2002). Die Aufstellung solcher Verlaufskurven ist schwieriger, wenn das Fehlen des Genproduktes sehr starke Konsequenzen für die Embryogenese hat, so dass die RNAi Embryonen keine Kutikulas ausbilden können. Dies ist bei den *Toll* RNAi Embryonen der Fall gewesen. Die ersten Embryonen die von *Toll* dsRNA injizierten Müttern gelegt wurden, formten zum größten Teil keine Kutikulas, sie waren völlig leer (Daten werden nicht gezeigt).

In den darauf folgenden Eiablagen nahm die Prozentzahl der leeren Eier kontinuierlich ab, dafür stieg die Zahl der wildtypischen Kutikulas. Kutikulas mit dorsoventralen Defekten konnten auch in späteren Eiablagen nicht identifiziert werden. Allerdings konnten bei *dorsal* dsRNA Injektionen moderate Kutikula Phänotypen beobachtet werden (P. Kalscheuer, persönliche Mitteilung). Es ist natürlich möglich, dass das Fehlen von geringer *Toll*-Aktivität, wegen zusätzlicher Funktionen wie zum Beispiel in der Kopflappen-Ausbildung oder einer möglichen Schlüsselfunktion in der Immunabwehr schwerwiegendere folgen für das Embryo hat, und sie aus diesem Grund keine Kutikulas ausbilden.

Da es nicht möglich war, schwache Kutikula-Phänotypen zu bekommen, wurde der zeitliche Rückgang des *Toll* RNAi Effektes anhand von Embryonalfärbungen dokumentiert. Dabei

zeigte sich, dass in den vier Tagen, die zwischen der ersten und der zweiten Eiablage vergingen, das Auftreten der starken Phänotypen (d.h., rotationssymmetrische und schlauchförmige Embryonen) um fast 20% zurückging. Jedoch erhöhte sich nicht die Prozentzahl der Embryonen mit moderaten oder schwachen Ausfallphänotypen, sondern es erhöhte sich die Prozentzahl der wildtypischen Embryonen. Auch wenn die Immunabwehr im Ei bzw. im Embryo graduell heruntergefahren wird, scheint die Präsenz von *Toll*-Transkripten einem an/aus Mechanismus zu unterliegen. Mit anderen Worten: Der Übergang vom Fehlen der *Toll*-Transkripte in den RNAi-Embryonen auf Vorhanden sein in wildtypischen Konzentrationen scheint sehr rasch zu verlaufen. Das könnte die geringe Anzahl beobachteter intermediärer und schwacher Phänotypen erklären. Ein möglicher Grund für diese Beobachtung könnte sein, dass sobald sich in den Zellen der Abwehrmechanismus, der gegen die dsRNA aktiviert wurde, abschwächt, *Toll*-Transkripte nicht mehr komplett abgebaut werden, und die nun vorhandene geringe Toll-Aktivität ausreicht, um den positiven Rückkopplungsmechanismus zwischen Toll und Dorsal anzuschalten. So könnte die Konzentration von Toll in ziemlich kurzer Zeit Normalwerte erreichen, somit auch wildtypische Embryonen hervorbringen.

In diesem Teilprojekt konnten wir durch die RNAi Injektionen den funktionellen Beweis bringen, dass das von uns klonierte Gen im dorsoventralen Musterbildungsprozess agiert und somit ein Ortholog von *DmToll* ist. Da die *Toll*-Rezeptor aktivität auch die Expression des mesodermalen Gens *twist* beeinflusst, konnte anhand der *Toll* RNAi gezeigt werden, dass *twist* ein Zielgen der *Toll* Kaskade ist.

4.4 Der *twist* Phänotyp

Mit dem Expressionsmuster und der Aktivierung von *Tctwist* durch die *Toll* Kaskade, sowie der *Dmdorsal* abhängigen Aktivierung der *LacZ* Reporter Konstrukte mit den regulatorischen Elementen des *Tctwist* Gens (Handel *et al.*, in Bearbeitung) konnte gezeigt werden, dass die grundlegenden Mechanismen der Regulierung der *Tctwist* und *Dmtwist* Gene ähnlich sind. Zusätzlich zu den bisher bekannten Eigenschaften konnten wir mit dieser Arbeit anhand der Ausfallphänotypen zeigen, dass *twist* für die Ventralfurchen-Ausbildung notwendig ist. Dass sich in frühen *twist* RNAi Embryonen keine Ventralfurchen ausbildet, ähnelt dem *Dmtwist* mutanten Phänotyp sehr. Interessant ist auch die Beobachtung, dass sich bei *Drosophila* in

späten Keimstreifstadien eine relativ tiefe Kerbung ausbildet (Leptin und Grünewald, 1990), wobei deren Zellen ihre ektodermalen Eigenschaften nicht verlieren. Die gleiche Beobachtung konnten wir an *Tctwist* RNAi Embryonen machen (siehe Abb. 3.2.4.2.D): Die invaginierenden Zellen bilden eine durchgehende ektodermale Zellschicht und sind *twist* und *snail* negativ. Eine andere Eigenschaft dieser Embryonen ist, dass sie als natürliches Resultat des Fehlens der mesodermalen Anlagen, auch in späten Keimstreifstadien aus nur einem Keimblatt bestehen. Jedoch sind sie in der Lage, Kutikulas zu produzieren, die keine großen Defekte aufweisen. Dass viele der *twi* RNAi Larven nicht in der Lage waren zu schlüpfen, kann sehr wahrscheinlich auf das Fehlen von Muskelgeweben zurückgeführt werden. Die *twist* RNAi Embryonen exprimieren keine mesodermalen Differenzierungsmarker wie *mef 2* und *tinman* (die PCR Fragmente der beiden Gene haben wir von Ralf Müller bekommen, Daten werden hier nicht gezeigt), was unsere Vermutung verstärkt, dass keine Muskeln gebildet werden können. Der Grund dass einige Kutikulas gefunden wurden, bei denen vom Abdomen Gewebe aus dem Embryo-Inneren ausgetreten zu sein scheint, könnte auch darauf zurückgeführt werden, dass das Proctodeum nicht von abdominalen Muskeln und anderen mesodermalen Derivativen umgeben wird, folglich nicht im Körper-Inneren gehalten werden kann. Deshalb tritt es aus dem Abdomen aus. Da es ektodermale Eigenschaften besitzt, kann es in Kutikula-Präparaten nachgewiesen werden. Allerdings müsste dazu der *twist* RNAi-Effekt zwar stark genug sein, um die Muskeldifferenzierung anzuschalten, aber nicht so stark, dass auch schon die Entwicklung des Proctodeums gestört ist.

4.4.1 Die Regulation der *snail* Expression

Eine weitere Ähnlichkeit zu *Dmtwist* findet sich auf der Ebene der Regulation von *snail*. Wie in *Drosophila* kontrolliert *Tctwist* die Aktivität von *Tcsnail*. Embryonen, bei denen die *twist* Aktivität unterbunden ist, exprimieren kein *snail*. In *Drosophila* hat *twist* zwar eine Funktion als Master Gen, das unter anderem auch die *snail* Expression kontrolliert, allerdings erfolgt die anfängliche Aktivierung von *snail* nicht durch *twist*, sondern durch die Kernlokalisation von Dorsal. Die Lokalisation von *TcDorsal* und die erste *Tctwist* Expression erfolgen in fast gleichen Blastodermstadien und entlang der gesamten anterior-posterioren Länge, während *snail* deutlich später exprimiert wird und die Expression nicht bis zum anterioren Pol reicht. Mit den RNAi Injektionen konnten wir nicht belegen, dass die anfängliche Expression von *Tcsnail* *Tctwist*-unabhängig ist. Im Gegenteil, die zeitlich verzögerte Aktivierung im

Vergleich zu *Tctwist* spricht dafür, das *Tcsnail* nicht durch Dorsal aktiviert wird. So scheint es Unterschiede in der anfänglichen Aktivierung von *Tcsnail* gegenüber der Aktivierung von *Dmsnail* zu geben.

Die Expression und Regulation von *Tcsnail* während später Keimstreifstadien stellt ein weiteres Problem dar. Zwar ist auch die Expression in Neuroblasten zwischen *Drosophila* und *Tribolium snail* konserviert, allerdings können wir nicht zweifelsfrei klären, wie ein mesodermales Gen wie *Tctwist* die späte Expression von *Tcsnail* in Neuroblasten kontrollieren kann. Unsere Beobachtung könnte auf die interessante Möglichkeit hindeuten, dass die Ausbildung des neuronalen Zellschicksals in *Tribolium* von Signalen des Mesoderms ausgeht. Um ein solches Szenario zu bestätigen, müssen weitere Färbungen mit neuronalen Markern in *twist* RNAi Embryonen durchgeführt werden.

4.5 Das snail Expressionsmuster und der mutante Phänotyp:

Als Protein der Zinkfingerklasse reprimiert *snail* in der Mesodermanlage die Expression von nicht-mesodermalen Genen (Ip *et al.*, 1992a). Zusätzlich hat *snail* regulatorische Funktionen während der Neurogenese. Es wird sowohl im zentralen, als auch im peripheren Nervensystem exprimiert. Die Funktion in der Neurogenese ist bisher nicht charakterisiert worden.

Der *Tcsnail* Expressionsmuster zeigt große Ähnlichkeiten zu *Dmsnail*. Im elongierenden Keimstreif wird *Tcsnail* sowohl in neuronalen Vorläuferzellen des ZNS als auch des PNS exprimiert (siehe Abb. 3.4.1.4).

Die Ausfallphänotypen der *snail* RNAi Embryonen zeigen keine wesentlichen Unterschiede zu denen der *twist* RNAi Embryonen. Durch das Fehlen von *snail* könnten ektodermale Gene in der Mesodermanlage exprimiert werden, wodurch diese epitheliale Eigenschaften erlangen würde. Dies würde eine Ventralfurchenbildung unmöglich machen. Da *Tcsnail* von *Tctwist* kontrolliert wird, würde das Ausfallen der *twist* Aktivität gleichzeitig auch das Ausfallen der *snail* Aktivität bedeuten, was auch erklären würde, warum wir in den Doppelinjektionen keine Unterschiede zu den *twist* RNAi Phänotypen beobachten. Da die Neuroblasten des zentralen Nervensystems im Laufe der Neurogenese delaminieren, muss ein Fehlen der *snail* Aktivität nicht unbedingt gravierende Konsequenzen für das Ektoderm oder für die Ausbildung der Kutikula haben. Der Verlust von *snail* im peripheren Nervensystem könnte allerdings sich im

Kutikulaphänotyp auswirken.. Denn das typische Borstenmuster der *Tribolium*larve besteht hauptsächlich aus Sinnesborsten, die mit peripheren Sinnesorganen assoziiert sind. Es wurden aber keine Borstendefekte beobachtet. Dies erinnert an die Situation bei *Drosophila*. Hier führt der Verlust von *snail* kaum zu detektierbaren Phänotypen im ZNS und PNS, da *snail* zu einer Gruppe von 4 Zinkfinger-Transkriptionsfaktoren zählt, die redundante Funktionen bei der Neurogenese haben (Ashraf *et al.*, 1999).

5. Literaturverzeichnis

- Aderem, A. und Ulevitch, R. (2000). Toll-like receptors in the induction of innate immune response. *Nature* 406, 782-787.
- Ahmad-Nejad, P., Hacker, H., Rutz, M., Bauer, S., Vabulas, R.m. and Wagner, H. (2002). Bacterial CpG-DNA and lipopolysaccharides activate Toll-like receptors at distinct cellular compartments. *Eur. J. Immunol.* 32, 1958-1968.
- Akam, M. (1987). The molecular basis for metameric pattern in the *Drosophila* embryo. *Development* 101, 1-22.
- Alexopoulou, L., Thomas, V., Schnare, M., Lobet, Y., Anguita, J., Schoen, R.T., Medzhitov, R., Fikrig, E. and Flavell, R.A. (2002). Hyporesponsiveness to vaccination with *Borrelia burgdorferi* OspA in humans and in TLR1- and TLR2- deficient mice. *Nat. Med.* 8, 878-884.
- Altschul, S. F., Boguski, M. S., Gish, W. und Wootton, J. C. (1994). Issues in searching molecular sequence databases. *Nature genet.* 6, 119-129.
- Anderson, K. V. und Nüsslein-Volhard, C. (1984). Information for the dorsal-ventral pattern of the *Drosophila* embryo is stored as maternal mRNA. *Nature* 311, 223-227.
- Anderson, K. V., Jürgens, G. und Nüsslein-Volhard, C. (1985). Establishment of Dorsal-Ventral Polarity in the *Drosophila* Embryo: Genetic Studies On the Role of the *Toll* Gene Product. *Cell* 42, 779-790.
- Anderson, K.V. (2000). Toll signaling pathways in the innate immune response. *Cur. Opin. in Immunology.* 12, 13-19
- Arora, K. and Nüsslein-Volhard, C. (1992). Altered mitotic domains reveal fate map changes in *Drosophila* embryos mutant for zygotic dorsoventral patterning genes. *Development* 114, 1003-1024.
- Ashburner, M. (1989). *Drosophila: A Laboratory Handbook and Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Ashraf, S.I., Hu, X., Roote, J and Ip, Y.T. (1999). The mesoderm determinant snail collaborates with related zinc-finger proteins to control *Drosophila* neurogenesis. *EMBO J.* 18(22):6426-6438.
- Azpiazu, A. and Frash, T. (1993). *tinman* and *bagpipe*, two homeobox genes that determine cell fates in the dorsal mesoderm of *Drosophila*. *Genes Dev.* 7(7B):1325-1340.
- Baker, B., Zambryski, P., Staskawicz, B. and Dinesh-Kumar, S.P. (1997). Signalling in plant-microbe interactions. *Science* 276, 726-733.
- Basal, A. Untersuchungen zu einem *Toll*-Homologen und zum Ursprung der dorsoventral-Achse in *Tribolium castaneum*. (2000). Diplomarbeit Universität zu Köln.

- Baeuerle, P. A. Baltimore, D. (1988). I-kappa-B, a specific inhibitor of the NF-kappa-B transcription factor. *Science* 242, 540-546.
- Belvin, M. P., Jin, Y. und Anderson, K. V. (1995). *Cactus* protein degradation mediates *Drosophila* dorsal-ventral signaling. *Genes Dev.* 9, 783-793.
- Berghammer, A., Bucher, G., Maderspacher, F. and Klingler, M. (1999). A system to efficiently maintain embryonic lethal mutations in the flour beetle *Tribolium castaneum*. *Dev. Genes Evol.* 209, 382-388.
- Bergmann, A., Stein, D., Geisler, R., Hagenmaier, S., Schmid, B., Fernandez, N., Schnell, B. und Nüsslein-Volhard, C. (1996). A gradient of cytoplasmic Cactus degradation establishes the nuclear localization gradient of the Dorsal morphogen in *Drosophila*. *Mech. Dev.* 60, 109-123.
- Biehs, B., Francois, V. and Bier, E. (1996) The *Drosophila* short gastrulation gene prevents Dpp from autoactivating and suppressing neurogenesis in the neuroectoderm. *Genes Dev* 10, 2922-2934.
- Brand, A. H. und Perrimon, N. (1993). Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* 118, 401-415.
- Brown, S. J., Patel, N. H. und Denell, R. E. (1994). Embryonic expression of the single *Tribolium engrailed* homolog. *Dev. Genetics* 15, 7-18.
- Bucher, G., Scholten, J., and Klingler, M. (2002). Parental RNAi in *Tribolium*. *Curr. Biol.* 12(3), R85-R86.
- Campos-Ortega, J. A. und Hartenstein, V. (1985). The Embryonic development of *Drosophila melanogaster*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.
- Campos-Ortega, J. A. und Hartenstein, V. (1997). The Embryonic development of *Drosophila melanogaster*, 2nd edn Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York
- Cao, Z., Henzel, W. J. und Gao, X. (1996a). IRAK: A kinase associated with the Interleukin-1 receptor. *Science* 271, 1128-1131.
- Chang, A.J., Donald, M. (2002). Regulation of Easter activity is required for shaping the Dorsal gradient in the *Drosophila* embryo. *Development* 129, 5635-5645.
- Charatsi, I., Luschnig, S., Bartowszewski, S., Nüsslein-Volhardt, C. and Moussian, B. (2003). Krapfen/dMyd88 is required for the establishment of dorsoventral pattern in the *Drosophila* embryo. *Mech. Dev.* 120, 219-226.
- Chasan, R. und Anderson, K. V. (1989). The role of Easter, an apparent serine protease, in organizing the dorsal-ventral pattern of the *Drosophila* embryo. *Cell* 56, 391-400.
- Chasan, R. und Anderson, K. V. (1993). Maternal control of dorsal-ventral polarity and pattern in the embryo. In The development of *Drosophila melanogaster*, M. Bate und A. Martinez-Arias ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, pp. 387-424.

- Chen, G., Handel, K. und Roth. S (2000 in Druck). The maternal NF- κ B/Dorsal gradient in *Tribolium castaneum*: dynamics of early dorsal-ventral patterning in a short germ beetle. *Development*.
- Choe, K.M., Werner, T., Stoven, S., Hultmark, D. and Anderson, K.V. (2002). Requirement of a peptidoglycan recognition protein (PGRP) in Relish activation and anti-bacterial immune responses in *Drosophila*. *Science* 296 359-362.
- Costa, M., Sweeton, D. and Wieschaus, E. (1993). Gastrulation in *Drosophila*: cellular mechanism of morphogenic movements in the development of *Drosophila melanogaster*, A. Martinez-Arias, and M. Bate, eds. (New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press), pp. 425-465.
- DeLotto, R. und Spierer, P. (1986). A gene required for the specification of the dorsal-ventral pattern in *Drosophila* appears to encode a serine protease. *Nature* 323, 688-692.
- Driever, W. (1993). Maternal control of anterior development in the *Drosophila* embryo in the development of *Drosophila melanogaster*, M. Bate und A. Martinez Ariaz ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, pp. 301-324.
- Eldon, E., Kooyer, S., D'Evelyn, D., Dunman, M., Lawinger, P., Botas, J. und Bellen, H. (1994). The *Drosophila 18 wheeler* is required for morphogenesis and has striking similarities to Toll. *Development* 120, 885-899.
- Falciani, F., Hausdorf, B., Schröder, R., Akam, M., Tautz, R., Denell, R. and Brown, S. (1996). Class 3 Hox genes in insects and the origin of zen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 10343-10347
- Ferguson, E. L. und Anderson, K. V. (1992). Decapentaplegic acts as a morphogen to organize dorsal-ventral pattern in the *Drosophila* embryo. *Cell* 71, 451-461.
- Galindo, R. L., Edwards, D. N., Gillespie, S. K. H. und Wasserman, S. A. (1995). Interaction of the Pelle kinase with the membrane-associated protein Tube is required for transduction of the dorsoventral signal in *Drosophila* embryos. *Development* 121, 2209-2218.
- Geisler, R., Bergmann, A., Hiromi, Y. und Nüsslein-Volhard, C. (1992). *Cactus*, a Gene Involved in Dorsoventral Pattern Formation of *Drosophila* is Related to the IkappaB Gene Family of Vertebrates. *Cell* 71, 613-621.
- Ghigliione, C., Bach, E.A., Paraiso, Y., Carraway, K.L., 3rd, Noselli, S. and Perrimon, N. (2002). Mechanisms of activation of the *Drosophila* EGF Receptor by the TGFalpha ligand Gurken during oogenesis. *Development* 129, 175-186.
- Gray, S., Cai, H., Barolo, S. und Levine, M. (1995). Transcriptional repression in the *Drosophila* embryo. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* 349, 257-262.
- Greenfelder, S. A., Nunes, P., Kwee, L., Labow, M. und Ju, G. (1995). Molecular cloning and characterization of the second subunit of the interleukin 1 receptor complex. *J. Biol. Chem.* 270, 13757-13765

- Gross, I., Georgel, P., Kappler, C., Reichhart, J. M. und Hoffmann, J. A. (1996). *Drosophila* immunity: A comparative analysis of the Rel proteins Dorsal and Dif in the induction of the genes encoding *diptericin* and *cecropin*. *Nucleic Acids Res.* 24, 1238-1245.
- Großhans, J., Bergmann, A., Haffter, P. und Nüsslein-Volhard, C. (1994). Activation of the kinase Pelle by Tube in the dorsoventral signal transduction pathway of *Drosophila* embryo. *Nature* 372, 563-566.
- Häcker, U. und Perrimon, N. (1998). *DRhoGEF2* encodes a member of the Dbl family of oncogenes and controls cell shape changes during gastrulation in *Drosophila*. *Genes Dev.* 12, 274-284.
- Halfon, M. S. und Keshishian, H. (1998). The *Toll* Pathway Is Required in the Epidermis for Muscle Development in the *Drosophila* Embryo. *Dev. Biol.* 199, 164-174.
- Halfon, M. S., Hashimoto, C. und Keshishian, H. (1995). The *Drosophila Toll* Gene Functions Zygotically and is Necessary for Proper Motoneuron and Muscle Development. *Dev. Biol.* 169, 151-167.
- Handel, K., Chen, G. und Roth, S. (2000 in Druck). The *Tribolium castaneum twi* gene: gastrulation and mesoderm formation in a short germ beetle. *Dev. Genes Evol.*
- Handel, K., Grünfelder, C., 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, 167-179.
- Hashimoto, C., Hudson, K. L. und Anderson, K. V. (1988). The *Toll* gene of *Drosophila*, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein. *Cell* 52, 269-279.
- Hashimoto, C., Gerttula, S. und Anderson, K. V. (1991). Plasma membrane localization of the *Toll* protein in the syncytial *Drosophila* embryo: importance of transmembrane signaling for dorsal-ventral pattern formation. *Development* 111, 1021-1028.
- Hayashi, F., Smith, K. D., Ozinsky, A., Hawn, T.R., Yi, E.C., Goodlett, D.R., Eng, J.k., Akira, S., Underhill, D.M. and Aderem, A. (2001). The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature* 410, 1099-1103.
- Hecht, P. M. und Anderson, K. V. (1992). Extracellular Proteases and Embryonic Pattern Formation. *Trends Cell Biol.* 2, 197-202.
- Hemmi, H., Kaisho, T., Takeuchi, O., Sato, S., Sanjo, H., Hoshino, K., Horiuchi, T., Tomizawa, H., Takeda, T. and Akira, S. (2002). Small anti-viral compounds activate immune cells via the TLR-7 MyD88-dependent signalling pathway. *Nat. Immunol.* 3 196-200.
- Hoffmann, J. A. und Reichhart, J.-M. (1997). *Drosophila* immunity. *Trends Cell Biol.* 7, 309-316.
- Hoffmann, J. A. und Reichhart, J.-M. (2002). *Drosophila* innate immunity: an evolutionary perspective. *Nat Immunol* 3, 121-126.

- Hoffmann, J. A., Kafatos, F.C., Janeway, C.A. und Ezekowitz, R.A. (1999). Phylogenetic perspective in innate immunity. *Science* 284, 1313-1318.
- Hong, C.C., Hashimoto, C. (1996). An unusual protein with a protease domain, encoded by the *nudel* gene, is involved in defining embryonic dorsoventral polarity in *Drosophila*. *Cell* 1995, 785-794.
- Hornig, T. and Medzhitov, R. (2001). *Drosophila* MyD88 is an adapter in the Toll signalling pathway. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 98, 12654-12658.
- Ip, Y. T., Park, R. E., Kosman, D., Yazdanbakhsh, K. und Levine, M. (1992a). Dorsal-Twist interactions establish *snail* expression in the presumptive mesoderm of the *Drosophila* embryo. *Genes Dev.* 6, 1518-1530.
- Ip, Y. T., Park, R. E., Kosman, D., Bier, E. und Levine, M. (1992b). The Dorsal gradient morphogen regulates stripes of *rhomboid* expression in the presumptive neuroectoderm of the *Drosophila* embryo. *Genes Dev.* 6, 1728-1739.
- Ip, Y. T., Reach, M., Engstrom, Y., Kadalayil, L., Cai, H., Gonzalez-Crespo, S., Tatei, K. und Levine, M. (1993). *Dif*, a dorsal-related gene that mediates an immune response in *Drosophila*. *Cell* 75, 753-763.
- Jazwinska, A., Rushlow, C. and Roth, S. (1999). The role of *brinker* in mediating the graded response to Dpp in early *Drosophila* embryos. *Development* 126, 3323-3334.
- Jebanathirajah, J, Peri, S. and Pandey, A. (2002). Toll and Interleukin-1 receptor domain-containing proteins in plants: a genomic perspective. *Trends Plant Sci* 7, 388-391.
- Kambris, Z., Hoffmann, J.A., Imler, J.L. and Capovilla, M. (2002). Tissue and stage-specific expression of the *Tolls* in *Drosophila* embryos. *Gene Exp. Pat.* 2, 311-317.
- Keith, F. J. und Gay, N. J. (1990). The *Drosophila* membrane receptor Toll can function to promote cellular adhesion. *EMBO J.* 9, 4299-4306.
- Kidd, S. (1992). Characterization of the *Drosophila cactus* Locus and Analysis of Interactions Between Cactus and Dorsal Proteins. *Cell* 71, 623-635.
- Kobe, B. und Deisenhofer, J. (1994). The leucin-rich repeat: a versatile binding motif. *TIBS* 19, 415-420.
- Konsolaki, M. und Schüpbach, T. (1998). *Windbeutel*, a gene required for dorsoventral patterning in *Drosophila*, encodes a protein that has homologies to vertebrate proteins of the endoplasmic reticulum. *Genes Dev.* 12, 120-131.
- Kosman, D., Ip, Y.T., Levine, M. and Arora, K. (1991). Establishment of the mesoderm-neuroectoderm boundary in the *Drosophila* embryo. *Science* 254, 118-122.
- Lemaitre, B., Nicolas, E., Michaut, L., Reichhart, J. M. und Hoffmann, J. A. (1996). The dorsoventral regulatory gene cassette *spätzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* 86, 973-983.

- Lemaitre, B., Reichhart, J. M. und Hoffmann, J. A. (1997). *Drosophila* host defense: Differential induction of antimicrobial peptide genes after infection by various classes of microorganisms. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 94, 14614-14619.
- LeMosy, E. K., Kemler, D. und Hashimoto, C. (1998). Role of Nudel protease activation in triggering dorsoventral polarization of the *Drosophila* embryo. *Development* 125, 4045-4053.
- Leptin, M. (1991a). Mechanics and Genetics of Cell Shape Changes During *Drosophila* Ventral Furrow Formation. In *Gastrulation*, R.Keller, ed. (New York, Plenum Press), pp. 199-212.
- Leptin, M. (1991b). *twist* and *snail* as positive and negative regulators during *Drosophila* mesoderm development. *Genes Dev.* 5, 1568-1576.
- Leptin, M. and Grünewald, B. (1990). Cell shape changes during gastrulation in *Drosophila*. *Development* 110, 73-84.
- Letsou, A., Alexander, S., Orth, K. und Wasserman, S. A. (1991). Genetic and molecular characterization of *Tube*, a *Drosophila* gene maternally required for embryonic dorsoventral polarity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 810-814.
- Letsou, A., Alexander, S. und Wasserman, S. A. (1993). Domain mapping of *Tube*, a protein essential for dorsoventral patterning of the *Drosophila* embryo. *EMBO J.* 12, 3449-3458.
- Maxton-Küchenmeister, J., (1999) Vergleichende Studien zur Funktion und Evolution des Membranrezeptors Toll in Insekten. Doktorarbeit Philipps-Universität Marburg.
- Maxton-Küchenmeister, J., Handel, K., Schmitt-Ott, U., Roth, S. und Jäckle, H. (1999). *Toll* homolog expression in the beetle *Tribolium* suggests a different mode of dorsoventral patterning than in *Drosophila* embryos. *Mech. Dev.* 83, 107-114.
- Medzhitov, R., Preston Hurlburt, P. und Janeway, C. A., Jr. (1997). A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 388, 394-397.
- Medzhitov, R. und Janeway, C. A., Jr. (1998). An ancient system of host defense. *Current Biol.* 10, 12-15.
- Medzhitov, R., Preston Hurlburt, P., Kopp, E., Stadlen, A., Chen, C., Gosh, S. und Janeway, C. A., Jr. (1998). MyD88 is an adaptor protein in the hToll/IL-1 receptor family signaling pathways. *Mol. Cell* 2, 253-258.
- Michel, T., Reichart, J.M., Hoffmann, J. A. and Royet, J. (2001). *Drosophila* Toll activated by Gram-positive bacteria through a circulating peptidoglycan recognition protein. *Nature* 414, 756-759.
- Misra, S., Hecht, P., Maeda, R. und Anderson, K. V. (1998). Positive and negative regulation of *Easter*, a member of the serine protease family that controls dorsal-ventral patterning in the *Drosophila* embryo. *Development* 125, 1261-1267.

- Mitcham, J. L., Parnet, P., Bonnert, T. P., Garka, K. E., Gerhart, M. J., Slack, J. L., Gayle, M. A., Dower, S. K. und Sims, J. E. (1996). *T1/ST2* signaling establishes it as a member of an expanding *interleukin-1 receptor* family. *J. Biol. Chem.* *271*, 5777-5783.
- Mizuguchi, K., Parker, J. S., Blundell, T. L. und Gay, N. J. (1998). Getting Knotted - a Model For the Structure and Activation of Spätzle. *Trends Biochem. Sci.* *23*, 239-242.
- Morisato, D. und Anderson, K. V. (1994). The *spätzle* gene encodes a component of the extracellular signaling pathway establishing the dorsal-ventral pattern of the *Drosophila* embryo. *Cell* *76*, 677-688.
- Morisato, D. und Anderson, K. V. (1995). Signaling pathways that establish the dorsal-ventral pattern of the *Drosophila* embryo. *Annu. Rev. Genetics* *29*, 371-399.
- Neuman-Silberberg, F. S. und Schüpbach, T. (1993). The *Drosophila* dorsoventral patterning gene *gurken* produces a dorsally localized RNA and encodes a TGF α -like protein. *Cell* *75*, 165-174.
- Nilson, L. A. und Schüpbach, T. (1998). Localized requirements for *windbeutel* and *pipe* reveal a dorsoventral prepatterning within the follicular epithelium of the *Drosophila* ovary. *Cell* *93*, 253-262.
- Nüsslein-Volhard, C. und Wieschaus, E. (1980). Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature* *287*, 795-801.
- Nüsslein-Volhard, C., Frohnhofer, H. G. und Lehmann, R. (1987). Determination of anteroposterior polarity in *Drosophila*. *Science* *238*, 1675-1681.
- Pai, L.M., Barcelo, G. and Schüpbach, T. (2000). D-cbl, a negative regulator of the EGFR pathway, is required for dorsoventral patterning in *Drosophila* oogenesis. *Cell* *103*, 51-61.
- Patel, N.H., Martin, B.E., Coleman, K.G., Poole, S.J., Ellis, M.C., Kornberg, Z.B. and Goodman, C.S. (1989). Expression of Engrailed proteins in arthropods, annelids and chordates. *Cell* *58*, 955-968.
- Patel, N. (1994a). The evolution of arthropod segmentation: insights from comparisons of gene expression patterns. *Development* *120* suppl. *120*, 201-207
- Patel, N. (1994b). Developmental evolution: Insights from studies of insect segmentation. *Science* *266*, 581-589.
- Patel, N., Condrón, B. und Zinn, K. (1994). Pair rule expression patterns of even-skipped are found in both short- and long-germ beetles. *Nature* *367*, 429-434.
- Peri, F., Technau, M. and Roth, S. (2002). Mechanisms of Gurken dependent *pipe* regulation and the robustness of dorsoventral patterning in *Drosophila*. *Development* *129*, 2965-2975.
- Ray, R. P., Arora, K., Nüsslein-Volhard, C. und Gelbart, W. M. (1991). The Control of Cell Fate Along the Dorsal Ventral Axis of the *Drosophila* Embryo. *Development* *113*, 35-54.

- Reach, M., Galindo, R. L., Towb, P., Allen, J. L., Karin, M. und Wasserman, S. A. (1996). A gradient of Cactus protein degradation establishes dorsoventral polarity in the *Drosophila* embryo. *Dev. Biol.* 180, 353-364.
- Reuter, R. and Leptin, M. (1994). Interacting functions of *snail*, *twist* and *huckebein* during the early development of germ layers in *Drosophila*. *Development* 120, 1137-1150.
- Rock, F. L., Hardiman, G., Timans, J. C., Kastelein, R. A. und Bazan, J. F. (1998). A family of human receptors structurally related to *Drosophila Toll*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 588-593.
- Rose, D., Zhu, X., Kose, H., Hoang, B., Cho, J. und Chiba, A. (1997). Toll, a muscle cell surface molecule, locally inhibits synaptic initiation of the RP3 motoneuron growth cone in *Drosophila*. *Development* 124, 1561-1571.
- Roth, S., Stein, D. und Nüsslein-Volhard, C. (1989). A Gradient of Nuclear Localization of the Dorsal Protein Determines Dorsoventral Pattern in the *Drosophila* Embryo. *Cell* 59, 1189-1202.
- Roth, S., Hiromi, Y., Godt, D. und Nüsslein-Volhard, C. (1991). *Cactus*, a Maternal Gene Required For Proper Formation of the Dorsoventral Morphogen Gradient in *Drosophila* Embryos. *Development* 112, 371-388.
- Roth, S. (1993). Mechanisms of dorsal-ventral axis determination in *Drosophila* embryos revealed by cytoplasmic transplantations. *Development* 117, 1385-1396.
- Roth, S. (1998). The secrets of delayed induction. *Curr. Biol.* 8, R906-R910.
- Roth, S. (2003). The Origin of Dorsoventral Polarity in *Drosophila*. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 358(1436):1317-1329.
- Roth, S. und Schüpbach, T. (1994). The relationship between ovarian and embryonic dorsoventral patterning in *Drosophila*. *Development* 120, 2245-2257.
- Roth, S., Neuman-Silberberg, F. S., Barcelo, G. und Schüpbach, T. (1995). *cornichon* and the EGF receptor signaling process are necessary for both anterior-posterior and dorsal-ventral pattern formation in *Drosophila*. *Cell* 81, 967-978.
- Rupp, R.A.W., Snider, L. und Weintraub, H. (1994). *Xenopus* embryos regulate the nuclear localization of XMyoD. *Genes Dev.* 8, 1311-1323.
- Rusch, J. and Levine, M. (1996). Threshold responses to Dorsal regulatory gradient and the subdivision of primary territories in the *Drosophila* embryo. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 6, 416-423.
- Rushlow, C., Doyle, H., Hoey, T. und Levine, M. (1987). Molecular characterization of the *zerknüllt* region of the *Antennapedia* gene complex in *Drosophila*. *Genes Dev.* 1, 1268-1279.

- Sanchez-Salazar, J., Pletcher, M. T., Bennett, R., Brown, S. J., Danda, T. S., Denell, R. und Doctor, J. S. (1996). The *Tribolium decapentaplegic* gene is similar in sequence, structure and expression to the *Drosophila dpp* gene. *Dev. Genes Evol.* 206, 237-246.
- Sander, K. (1976). Specification of the basic body pattern in insect embryogenesis. *Adv. Insect Physiol.* 12, 125-238.
- Sasai, Y. und De Robertis, E. M. (1996). A common plan for dorsoventral patterning in Bilateria. *Nature* 380, 37-40.
- Schmid, K.J. and Tautz, D. (1999). A Comparison of Homologous Developmental Genes from *Drosophila* and *Tribolium* Reveals Major Differences in Length and Trinucleotide Repeat Content
- Schmidt-Ullrich, R., Memet, S., Lilienbaum, A., Feuillard, J., Raphael, M. und Israel, A. (1996). NF- κ B activity in transgenic mice: developmental regulation and tissue specificity. *Development* 122, 2117-2128.
- Schneider, D. S., Hudson, K. L., Lin, T. Y. und Anderson, K. V. (1991). Dominant and recessive mutations define functional domains of Toll, a transmembrane protein required for dorsal-ventral polarity in the *Drosophila* embryo. *Genes Dev.* 5, 797-807.
- Schweiger, M. (1991). A Novel Modular Mosaic of Cell Adhesion Motifs in the Extracellular Domains of the Neurogenic Trk and Trkb Tyrosine Kinase Receptors. *Oncogene* 6, 1807-1812.
- Seher, T. (2002). Untersuchungen zur genetischen Kontrolle der Gastrulation von *Drosophila melanogaster*. Doktorarbeit Universität zu Köln.
- Seppo, A., Matani, P., Sharrow, M. and Tiemayer, M. (2003). Induction of neuron-specific glycosylation by Tollo/Toll-8, a *Drosophila* Toll-like receptor expressed in non-neural cells. *Development* 130, 1439-1448.
- Shelton, C. A. und Wasserman, S. A. (1993). *pelle* encodes a protein kinase required to establish dorsoventral polarity in the *Drosophila* embryo. *Cell* 72, 515-525.
- Shen, B. und Manley, J. L. (1998). Phosphorylation modulates direct interactions between the Toll receptor, Pelle kinase and Tube. *Development* 125, 4719-4728.
- Shimazu, R., Akashi, S., Ogata, H., Nagai, Y., Fukudome, K., Miyake, K. and Kimoto, M. (1999). MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4. *J. Exp. Med.* 189, 1777-1782.
- Small, S., Kraut, R., Hoey, T., Warrior, R. und Levine, M. (1991). Transkriptional regulation of a pair-rule stripe in *Drosophila*. *Genes Dev.* 5, 827-839.
- Sommer, R. J. und Tautz, D. (1989). Minimal Homology Requirements for PCR Primers. *Nucleic Acids Res.* 17, 6749.

- Sommer, R. J., Retzlaff, M., Goerlich, K., Sander, K. und Tautz, D. (1992). Evolutionary Conservation Pattern of Zinc-Finger Domains of *Drosophila* Segmentation Genes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 10782-10786.
- Sommer, R. J. und Tautz, D. (1994). Expression patterns of *twist* and *snail* in *Tribolium* (Coleoptera) suggest a homologous formation of mesoderm in long and short germ band insects. Dev. Genetics 15, 32-37.
- Sprenger, F. und Nüsslein-Volhard, C. (1993). The terminal system of axis determination in the *Drosophila* embryo. In The development of *Drosophila melanogaster*, M. Bate und A. Martinez-Arias ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, pp. 365-386.
- St Johnston, D. (1993). Pole plasm and the posterior group genes. In The development of *Drosophila melanogaster*, M. Bate und A. Martinez-Arias ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, pp. 325-364.
- Stein, D., Roth, S., Vogelsang, E. und Nüsslein-Volhard, C. (1991). The polarity of the dorsoventral axis in the *Drosophila* embryo is defined by an extracellular signal. Cell 65, 725-735.
- Stein, D. und Nüsslein-Volhard, C. (1992). Multiple Extracellular Activities in *Drosophila* Egg Perivitelline Fluid Are Required For Establishment of Embryonic Dorsal-Ventral Polarity. Cell 68, 429-440.
- Steward, R. (1987). *Dorsal*, an embryonic polarity gene in *Drosophila*, is homologous to the vertebrate proto-oncogene, c-rel. Science 238, 692-694.
- Takeda, K. and Akira, S. (2003). Toll receptors and pathogen resistance. Cell Microbiol. 5(3) 143-153.
- Takeuchi, O., Sato, S., Horiuchi, T., Hoshino, K., Takeda, K., Dong, Z., Modlin, R.L. and Akira, S. (2002). Cutting edge: Role of Toll-like Receptor 1 in mediating immune response to microbial lipoproteins. J. Immunol 169, 10-14.
- Tan, M. und Ausubel, F. (2000). Curr. Opin. Immunol. 3, 29-34.
- Tatei, K. und Levine, M. (1995). Specificity of Rel-inhibitor interactions in *Drosophila* embryos. Mol. Cell. Biol. 15, 3627-3634.
- Tauszig, S., Jouanguy, E., Hoffmann, J. und Imler, J. (2000). Toll-related receptors and the control of antimicrobial peptide expression in *Drosophila*. Proc. Natl. Acad. Sci. 97, 10520-10525.
- Tauszig-Delamasure, S., Bilak, H., Capovilla, M., Hoffmann, J.A. and Imler, J.L. (2002). *Drosophila* MyD88 is required for the fungal and Gram-positivbacterial infections. Nat. Immunol. 3, 91-97.
- 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, 81-85.

- Tautz, D., Friedrich, M. und Schröder, R. (1994). Insect embryogenesis-what is ancestral and what is derived? *Development* 120, 193-199.
- Thisse, B., Stoetzel, C., Gorostiza-Thisse, C. und Perrin-Schmitt, F. (1988). Sequence of the *twist* gene and nuclear localization of its protein in endomesodermal cells of early *Drosophila* embryos. *EMBO J.* 7, 2175-2183.
- Thisse, C., Perrin-Schmitt, F., Stoetzel, C. und Thisse, B. (1991). Sequence-specific transactivation of the *Drosophila twist* gene by the *dorsal* gene product. *Cell* 65, 1191-1201.
- Towb, P., Bergmann, A. and Wasserman, S.A. (2001). The protein kinase Pelle mediates feedback regulation in the *Drosophila Toll* signalling pathway. *Development* 128, 4729-4736.
- Wasserman, J. and Freeman, M. (1998). An autoregulatory cascade of EGF receptor signalling patterns the *Drosophila* egg. *Cell* 95, 355-364.
- Weber, A., Tauszig-Delamasure, S., Hoffmann, J.A., Lelievre, E., Gascan, H., Ray, K., Morse, M.A., Imler, J.L. and Gay, N.J. (2003). Binding of the cytokine Spätzle to Toll is direct and establishes signalling. *Nat. Imm.* 4, 794-800.
- Wesche, H., Henzel, W.J., Shillinglaw, W., Li, S. and Cao, Z. (1997). MyD88: an adapter that recruits IRAK to the IL-1 receptor complex. *Immunity* 7, 837-847.
- Wharton, K. A. und Crews, S. T. (1993). CNS Midline Enhancers of the *Drosophila Slit* and *Toll* Genes. *Mech. Dev.* 40, 141-154.
- Whitham, S., Dinesh-Kumar, S. P., Choi, D., Hehl, R., Corr, C. und Baker, B. (1994). The product of the tobacco mosaic virus resistance gene *N*: Similarity to *Toll* and the *interleukin-1 receptor*. *Cell* 78, 1101-1115.
- Wilimzig, M. (1985). LiCl-boiling method for plasmid mini-preps. *Trends Genet.* 1, 158.
- Williams, M. J., Rodriguez, A., Kimbrell, D. A. und Eldon, E. D. (1997). The *18 wheeler* mutation reveals complex antibacterial gene regulation in *Drosophila* host defense. *EMBO J.* 16, 6120-6130.
- Winans, K. A. und Hashimoto, C. (1995). Ventralization of the *Drosophila* embryo by deletion of extracellular leucine-rich repeats in the Toll protein. *Mol. Biol. Cell* 6, 587-596.
- Wolpert, L. (1998). Principles of development. Oxford University Press, Oxford.
- Wolf, C., Thisse, C., Stoetzel, C., Thisse, B., Gerlinger, P. und Perrin-Schmitt, F. (1991). The *M-twist* of *Mus* is expressed in subsets of mesodermal cells and is closely related to the *Xenopus X-twi* und *Drosophila twist* genes. *Dev. Biol.* 143, 363-373.
- 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, 4227-4236.

- Wolff, C., Schröder, R., Tautz, D. und Klingler, M. (1998). Regulation of the *Tribolium* homologues of *caudal* and *hunchback* in *Drosophila*: Evidence for maternal gradient systems in short germ embryos. *Development* *125*, 3645-3654.
- Yamagata, M., Merlie, J. P. und Sanes, J. R. (1994). Interspecific comparisons reveal conserved features of the *Drosophila* Toll protein. *Gene* *139*, 223-228.

6. Anhang

Die *Tribolium Toll* cDNA Sequenz:

Die 5'- und 3' nicht-translatierten Sequenzen sind jeweils mit dargestellt. Ab dem Translationstartpunkt sind die kodierten Aminosäuren hinzugefügt.

```

RAGCAGTGGTAACAACGCAGAGTACGCGGGGGGTTTTTGACAGGAACAAGTGATTTGACAGCAATTAATAATGAAATT 80

GAAAAATAAACTAAATAATCAAAAGGATGATAAAAAGAGGAGTGTGAGTTATTAGACATGGACAGTAAATAGCTACG 160

GTAAAAATCTAACATTGGATACCTTCCGGTCCGATTCCAATCTAATTAATAATTCAAAACAAGAACTACTAGCTGA 240

TGATAATTTAGTACGTAAAAACAGTCCTTTTTCCCAACAAAATTTAGTAATTTTTATTCCGGCAGTGTCTAAAAACA 320
M N N L V R K N S P F S Q Q N F S N F L F R Q C L K T
TTTCTACTTTCGATACGCTCGCTATCGCTTTGTGCACTCGTCTTCAGTGCCAACTCAACTGATTTTTGCTTCTGCTGTA 400
F L L S I T L A I A L C T R L Q C Q S T D F C F C P E
AGATTTTGAAGACACTTACCTTTGCCCGTTTGATTATGCCCAATTTGGAGGTTTCCAATCACCATAACAAAACCTCCAC 480
D F E D T Y L C P F D Y A Q I G G F Q I T I T K L Q
AAGTCATAATTGAGTGTCTAATTTACCAATTTCAACCCCAACATTTACCCACATAACTCTCACTAAAACCTAATTTG 560
Q V I I E C S N L P I F N P K H L P N I T L T K T N L
CTACGTTTGAAGGTTTTGTCCTTTACCACCTCAGGTTTTGGGGAAATTTTGCAAAATCTAGGAGTCGAGACGTTTCAAT 640
L R L R F C P L P P Q G F G E I L Q N L G V E D V S M
GGTCGATGTTGAATATGGAATTCGCTAATCGGAAAAGATCAATTCACCAATTACGAAGCTTGAATATTTGAACCTGA 720
V D V E Y G N S L I G K D Q F Q Q L R S L K Y L K L
GCGAAAACATTTTAACAATCTTGAAGACGGTATTTTTCAAACTCCAATTTGCGAGGGCTCGAACTAACACACAAT 800
S E N I L N N L E D G I F S N T P N L R G L E L N N N
CATTARCCCTATTAACCAATTTATTGCACAACTTGAGTTTCTGGATTATTAAACCTAGCCGACAACTCAATTGGA 880
H L T L L K P N L L H K L E F L E L L N L A D N Q L E
AACAACTCCGGATGATTTATTCAAAAATGCCAAAATTAATAGTTGTGGTACTTCGAGGCAATAAGCTTAACACCTCC 960
T I P D D L F T K C Q K L I V V V L R G N K L K H L
CCGTAATTTGTTTAAAATTTACACAACCTTGGAAGAAATTTGGATTTGTGCGACACCAATTTGAACAATTCACACTTG 1040
P V N L F K N L H N L E E L D L S D N Q I E T I H T L
CCTTTGAAATCGCTCAAAAATTTGGATCTGAGCTATAACCAAGTTTGGTACTACCGAACAGTTTTTCTTAATCTTTA 1120
P L K S L K N L D L S Y N Q S L V L P E Q F F L N L Y
CCGATTGGAAACAATCGACTTGGCTGGTTGCACTTGACAAAATTAACCAATAACATGTTCAAAAACCTGTCATGATTAA 1200
R L E Q I D L A G C N L T K L P N N M F K N C H E L
AARTGGTGGCGCTCCGAAGGAACAATTTGAAGTACTTCCCCAAAATTTTTCGACAACTCTACAACTGGAAGAATTGAC 1280
K M V A L R R N N L K Y F P Q K F S T I S T T G R I D
GTAGCAAGCAACCAATTTGAATCATTCCCGATTAAAGTCATTAACAAAATTAATAATCATCAACTGAAAACAACAACAT 1360
V A S N Q I E S F P I K V I N K I K N H Q T E N N N I
TCAGGTACTACCTCCGAAATTTTCAGCGATTTGATCCGACTTGAAAGACTGTATCTTCAACAAAACCAATCGAGACTA 1440
Q V L P P E I F S D L I R L E E L Y L Q Q N Q I E T
TTCATTCAAACTTTTTTTCATAACGACGAATTACGGATTATAAACCTGTCTGAAAACCGTTACTCGAGAAGTGACGAA 1520
I H S K L F F N N D E L R I I N L S E N R Y S R S D E
GTGCTCTTCAGGACACTATCAATATTGAAGAAATCGACTTAAGTAACAACCTTAATTACAAGAAATGAGGATGTTGTGAC 1600
V L F K D T I N I E E I D L S N N L I T R I E D V V T

```

GCTTGACAATAAACCATTCTCCAAAAAATTGACCTGACTTACAACTAATTGGTGCCGTTTCGCTCGTAACTCTACAAG 1680
L D N K P F L Q K I D L T Y N L I G A V S L V T L Q
GGGTTTCAAAATGTGGACGTGTTTTGGACCACAACAATATATCAATAATGCGATTTCGACAATATCGATTTAATTTCCAGT 1760
G V S N V D V F L D H N N I S I M R F D N I D L I S S
ACTTACGTTTCAACGATTTATCTAAGCGACAATCCTTTGACATACGACTGTCACAATTATGTGTTATTTAAGCACATTGA 1840
T Y V S T I Y L S D N P L T Y D C H N Y V L F K H I E
GAGCCACAATGGTCACATTTTCGACATACGAAGTGACCTTGAARTGGTACCACCTGCCACCATTTACTGTCCTTTAACAA 1920
S H N G H I F D I R S D L E M V P L A T I Y C P L T
AGTGTCAGAACATGTTTTGCAAGTGGAGACCGTTCGACAATTCATTTATTGTTGACTGTGCCAATAGGAAACTTTCA 2000
K C P E Q C F C K W R P F D N S F I V D C A N R K L S
TCAGTTCACCACACTACTTTTCAACTGGACCAATTTTCAGTCAATTTGAGGTGCATTTGCAAATAACAATTTGCAACAGT 2080
S V P P L L F N W T N F S Q I E V H L Q N N N L Q T V
TGATTTGACCGTTATGCCAATGTACAAAATTTGTTCTTTCTGGGAACCTTATAAGGGGAATTATCATGCGTACCGCCAA 2160
D L T G Y A N V T K L F L S G N F I R E L S C V P P
AAATACAGATGCTACATTTGGACCATAACAACATCACTCGGTTAAATTACGACATAATTCAGCCTTGAATACTTCAAGT 2240
K I Q M L H L D H N N I T R L N Y D I I Q A L N T S S
TTGCGTAATTTAACTCTGGACCATAATCCATGGATTTGTGATTGTAGTACTGAAAATTTGACAAGTTTCATCCGAATCG 2320
L R N L T L D H N P W I C D C S T E N L T S F I R N R
CTTTAAACAGATAAATTTATCACCATGTCATTTGCACCAACAGTACTAGGGAGCTTGTAGACTTAACCCGAGCGTTTTAT 2400
F K Q I N Y H H V I C T N S T R R L V D L T R S V L
GTCCCAGCTGACCCTACTTTACCTAACTCTAGTTGCAAGCTTTCTAGTACTACCCTCCATATTCGTAGCTATTTTCTCG 2480
C P D L T L L Y L T L V A S F L V L P S I F V A I F S
GTTTTCAAAAAAACATAAAATTTTGGTTGTTTTCGAAGAATTTATGCTTATGGTGGGTCTCTGAGGAGGATTTAGACAA 2560
V F K K N I K F W L F S K N L C L W W V S E E D L D K
GGATAAATTTGTTGACGCCTTTGTGAGTTATTTCCACAAAGATGAGGCATATATTGTAGAAACGTTGGTACCAGATTGG 2640
D K L F D A F V S Y S H K D E A Y I V E T L V P R L
AATCAGAGGTTACAAAATTTGTTTACATTTTCGGGATTGGGTACC6GGTGAARTGATCAGTACCCAAATTTGTAACCTCA 2720
E S E G Y K I C L H F R D W V P G E M I S T Q I V T S
ATTGCAACGTCAAACGCACAATTTGGTACTTTTCGCAAATTTTCTTCAAAGTGTTTGGGCCAAAGAGAAATTCAAACA 2800
I A T S K R T I V V L S Q N F L Q S V W A K E E F K Q
GGCCCATGCTGAGGGAAATGAGTGAGGGTTCGAGTAAAAATTTATCATGATTTTGGCTTGGAGAAATCGATATTGAGGACTGG 2880
A H A E G M S E G R V K I I M I L L G E I D I E G L
ATCAGGAGCTGAGACTGTATCTCAGGACGAATACCTACCTCAAAATGGGGTGAATTCACCTTCTGGGAGAGCTTCAATAT 2960
D Q E L R L Y L R T N T Y L K W G D S H F W E K L Q Y
GCGTTACCTCATCGGAAACTGGACGATAGACTTTATGTAATATTTTTTTGTAATATAAACTTTGTATTGTTAAAAA 3040
A L P H R K L D V .
AAAAAAAAAA 3051

Zusammenfassung:

Die dorsoventrale Musterbildung wird beim Langkeim-Insekt *Drosophila melanogaster* durch lokalisierte Toll-Rezeptor Aktivierung induziert, was zur Ausbildung eines Kernkonzentrationsgradienten des rel/NF- κ B Proteins Dorsal führt. Zwei Zielgene von Dorsal sind *twist* und *snail*. Sie werden auf der ventralen Seite des Embryos aktiviert, wo die Kernkonzentration von Dorsal am höchsten ist. Um herauszufinden, ob beim Kurzkeim-Insekt *Tribolium castaneum* ein ähnlicher Mechanismus in der dorsoventralen Achsenbildung verwendet wird, wurden die Gene *Toll*, *twist* und *snail* studiert. Puppale RNA-interference (RNAi) mit *Toll* verursachte den Verlust der dorsoventralen Polarität, da die Embryonen für *zen* und *dpp* symmetrische Expressionsmuster zeigten. Zudem exprimierten die *Toll*-RNAi Embryonen kein *twist* im Rumpfbereich. Ein wichtiger Unterschied zu *Drosophila* zeigt sich im Expressionsmuster von *TcToll*: in späten Oozyten und Präblastoderm Embryonen sind keine *Toll*-Transkripte detektierbar. Allerdings wird *Toll* während der Keimstreifaustreckung sehr stark in den Kopflappen exprimiert, was vermuten lässt, dass es in *Tribolium* anders reguliert wird als in *Drosophila*. RNAi mit *twist*, einem wichtigen mesodermalen Gen, verursacht den Verlust der Ventralfuchenausbildung und der Expression von *snail*. Anders als bei *Drosophila* führt der Verlust von *twist* nicht zu einer gravierenden Störung der larvalen Kutikula. Die *snail*-RNAi Phänotypen zeigten keine Unterschiede zu den *twist* RNAi Phänotypen, da *snail* von *twist* reguliert wird. Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass grundlegende Schritte in der dorsoventralen Musterbildung zwischen *Drosophila* und *Tribolium* konserviert sind.

Summary:

In the long-germ insect *Drosophila melanogaster* dorsoventral polarity is induced by localized Toll-receptor activation which leads to the formation of the nuclear gradient of the rel/NF- κ B protein Dorsal. Two targets of Dorsal are *twist* and *snail*, that are activated at most ventral regions where the highest concentrations of the nuclear Dorsal protein are found. To investigate whether the short-germ insect *Tribolium castaneum* uses a similar mechanism of axis formation as *Drosophila*, we were studying the *Toll*, *twist* and *snail* genes from *Tribolium*. Pupal RNA-interference (RNAi) with *Toll* causes the loss of the dorsoventral polarity resulting in dorsalized embryos which show symmetrical patterns of *zen* and *dpp* expression and lack *twist* expression in the trunk region. A major difference to *Drosophila* is observed in the expression pattern of *TcToll*: no transcripts are detectable in late oocytes and preblastodermal embryos. However, a *Toll* expression-domain in the headlobe detectable until late germband-extension stages suggests differences in the regulation in *Tribolium*. RNAi with *twist*, an important mesodermal gene in *Drosophila*, abolishes ventral furrow formation and *snail* expression. There are only minor cuticular defects, but most of the larvae are not able to hatch probably because of muscle defects. The phenotypes observed with *snail* dsRNA injections differ not from the *twist* dsRNAi phenotypes, since *snail* is a target gene of *twist*. These observations indicate that fundamental steps in the formation of the dorsoventral axis are conserved between the long germ *Drosophila* and the short germ *Tribolium* embryos.

Erklärung

Ich versichere hiermit, 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 Entlehnungen kenntlich gemacht habe; dass diese Dissertation keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; dass sie noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, dass ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluss des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde.

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

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

Köln, den 16.12.2003

Abidin Basal

Lebenslauf

Abidin Basal	Staatsangehörigkeit: Deutsch
16. 12.1971	geboren in Yozgat/Türkei Eltern: Celal Basal und Necla Basal, geb. Murat
1977-1978	Besuch der Caglayan Grundschule in Yozgat
1978-1979	Besuch der Vorbereitungsstufe für Deutsch an der Martin Luther Grundschule in Bremerhaven
1979-1982	Besuch der Martin Luther Grundschule in Bremerhaven
1979-1983	Besuch der Orientierungsstufe an der Pestalozzi Schule in Bremerhaven
1984-1990	Besuch der Ankara Anatolische Gymnasium in Ankara/Türkei
1991-1992	Vorbereitungsjahr für englische Sprache an der Mittel-Östlichen Technischen Universität in Ankara
1992-1997	Studium der Biologie an der Mittel-Östlichen Technischen Universität in Ankara
Februar 1997	Erlangung des Bachelor Grades
Ab Oktober 1997	Studium der Biologie an der Universität zu Köln
September 1999	Abschluss der mündlichen Diplomprüfung Prüfungsfächer: Entwicklungsbiologie, Biochemie, Genetik
Oktober 1999-November 2000	Diplomarbeit bei Herrn Prof. Dr. Siegfried Roth am Institut für Entwicklungsbiologie Titel: Untersuchungen zu einem Toll-Homo- logen und zum Ursprung der dorsoventral- Achse in <i>Tribolium castaneum</i>
seit Januar 2001	Doktorarbeit bei Herrn Prof. Dr. Siegfried Roth am Institut für Entwicklungsbiologie der Universität zu Köln