

**Vergleichende und funktionelle Studien
zur Evolution der dorsoventralen Musterbildung
bei Insekten**

I n a u g u r a l – D i s s e r t a t i o n

zur

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

vorgelegt von

Patrick Kalscheuer

aus Köln

(Köln, 2004)

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Siegfried Roth
 2. Berichterstatter: Prof. Dr. Diethard Tautz
- Datum der mündlichen Prüfung: 16.02.2005

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Entwicklungsbiologie der Universität zu Köln unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. Siegfried Roth durchgeführt. Ihm möchte ich besonders für die Bereitstellung dieses Projektes, die Betreuung und die ständige Diskussionsbereitschaft danken.

Bei Herrn Prof. Dr. Diethard Tautz bedanke ich mich für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Claudia Wunderlich danke ich für die kritische Durchsicht des Manuskripts, mehrere gute Cocktailrezepte und Brownies, sowie dem ein oder anderen Beitrag zu meinem Insektenkasten.

Thanks also to Sajith Dass for the lessons on the origin of human life and culture (“Once, back in India...”), lots of discussions and many tough football matches.

Den weiteren Gruppenmitgliedern Conny Mikulski, Bhupendra Shrivage, Martin Technau und Maurijn van der Zee möchte ich für die ständige Diskussionsbereitschaft, mehrere „Happy Hours“ und die stets nette Laboratmosphäre danken. Ellen Veit, Maria Langen und Oliver Karst sei zudem gedankt für die technische Unterstützung.

Den ehemaligen Mitgliedern des Labors, insbesondere den „Kellerkindern“ Abidin Basal und Oliver Stockhammer, ein Dankeschön für die angenehme und oft witzige Laboratmosphäre und für den harten Snood-Wettkampf.

Mein besonderer Dank gilt Heike, nicht nur fürs Korrekturlesen, sondern auch für Ihre Geduld und ihr Verständnis, sowie ihre Ruhe und Unterstützung, besonders in den letzten Monaten.

Besonders möchte ich mich bei meinen Eltern für ihre ständige Unterstützung bedanken.

1	EINLEITUNG	1
1.1	Das Langkeim- und Kurzkeim-Konzept	2
1.2	Spezifizierung der dorsoventralen Achse bei <i>Drosophila melanogaster</i>	4
1.2.1	<i>Initialisierung der dorsoventralen Achse bei Drosophila</i>	4
1.2.2	<i>Etablierung der dorsoventralen Achse des Drosophila-Embryos</i>	7
1.3	Die Zielgene des Dorsal-Gradienten.....	9
1.4	Die Funktion der Toll-Dorsal Kaskade in der Immunabwehr.....	11
1.5	Sequenzvergleich der Proteine der Dorsal-Gruppe in verschiedenen Insektenarten	14
1.6	Zielsetzung der Arbeit.....	18
2	MATERIAL UND METHODEN.....	20
2.1	Haltung und Aufzucht von <i>Tribolium castaneum</i>	20
2.2	Präparation von <i>Anopheles</i> - und <i>Tribolium</i> -Ovarien	20
2.3	Molekularbiologische Arbeiten	21
2.3.1	<i>Bakterienstämme und Vektoren</i>	21
2.3.2	<i>Häufig verwendete Chemikalien</i>	21
2.3.3	<i>Oligonukleotide</i>	23
2.3.4	<i>Enzyme</i>	23
2.3.5	<i>Verwendete Antikörper</i>	24
2.3.6	<i>DNA-Präparationen</i>	24
2.3.6.1	Plasmid-Minipräparation	24
2.3.6.2	Plasmid-Midipräparation	24
2.3.7	<i>Schneiden von DNA mit Restriktionsendonukleasen</i>	25
2.3.7.1	Schneiden von DNA zur Isolierung von DNA-Fragmenten.....	25
2.3.8	<i>Größenseparation von DNA-Fragmenten durch Auftrennung in Agarosegelen</i>	25
2.3.9	<i>Isolierung von DNA-Fragmenten</i>	26
2.3.9.1	Präparative Gelelektrophorese.....	26
2.3.10	<i>Phenol/Chloroform-Extraktion</i>	26
2.3.11	<i>Ethanol-fällung</i>	27
2.3.12	<i>Dephosphorylierung von 5'-Enden</i>	27
2.3.13	<i>Ligation</i>	27
2.3.14	<i>Konzentrationsbestimmung von DNA</i>	28
2.3.15	<i>Polymerase-Kettenreaktion (PCR)</i>	28
2.3.15.1	PCR-Reaktion.....	29
2.3.16	<i>Herstellung von Digoxigenin-markierten RNA-Sonden</i>	30
2.3.17	<i>Synthese doppelsträngiger RNA (dsRNA)</i>	31
2.3.18	<i>Herstellung transformationskompetenter E.coli Bakterien</i>	31

2.3.19	<i>Bakterientransformation</i>	32
2.4	Sequenzierung und Verarbeitung der Sequenzdaten	33
2.5	RNA Interferenz	34
2.5.1	<i>dsRNA Injektionen</i>	34
2.5.2	<i>Aufzucht injizierter Tribolium Puppen</i>	34
2.5.3	<i>Kutikulapräparation von Tribolium-Larven</i>	34
2.6	Histologische Methoden.....	35
2.6.1	<i>Dechorionisierung</i>	35
2.6.2	<i>Fixierung von Embryonen</i>	35
2.6.3	<i>Fixierung von Ovarien</i>	36
2.6.4	<i>in situ Hybridisierung</i>	36
2.6.4.1	<i>in situ Hybridisierung an Ovarien</i>	37
2.6.4.2	<i>Detektion hybridisierter RNA-Sonden</i>	37
2.6.5	<i>Antikörperfärbung an Embryonen</i>	37
2.6.5.1	<i>Erster Antikörper</i>	38
2.6.5.2	<i>Zweiter Antikörper</i>	38
2.6.5.3	<i>ABC Reaktion</i>	39
2.6.5.4	<i>Färbung</i>	39
2.6.6	<i>Färbung von F-Actin mittels Phalloidin</i>	39
2.6.7	<i>DNA-Färbungen</i>	39
2.7	Mikroskopie.....	40
3	ERGEBNISSE	41
3.1	Oogenese	41
3.1.1	<i>Lokalisierung des Oozytenkerns während der Oogenese</i>	41
3.1.2	<i>Isolierung von Pipe Homologen aus Anopheles gambiae und Tribolium castaneum</i> 44	
3.1.3	<i>Expression von Agpipe während der Oogenese</i>	48
3.1.4	<i>Expression von Tcpipe während der Oogenese</i>	50
3.2	<i>Isolierung eines cactus-Gens aus Tribolium castaneum</i>	51
3.3	Die Expression von <i>Tccactus</i>	53
3.3.1	<i>Expression während des Blastodermstadiums</i>	53
3.3.2	<i>Expression während der Invagination des Keimstreifs</i>	55
3.3.3	<i>Expression während der Keimstreifausstreckung</i>	56
3.3.4	<i>Maternale Expression von Tccactus</i>	59
3.3.5	<i>RNAi mit Tccactus</i>	60
3.4	Funktionelle Analyse von <i>Tcdorsal</i>	61
3.4.1	<i>Defekte in der Morphologie von Tcdl RNAi Embryonen</i>	61
3.4.2	<i>Die Wachstumszone in dorsalisierten Embryonen</i>	64
3.4.3	<i>Expression mesodermaler Gene</i>	66

3.4.4	<i>Expression von lateralen Markergenen</i>	68
3.4.5	<i>dpp und zen als Marker für extraembryonales Gewebe</i>	70
3.4.6	<i>Klärung des Zellschicksals in Tcdl RNAi Embryonen</i>	71
3.4.7	<i>Früh exprimierte Marker: Tc006A12 und hairy</i>	73
3.4.8	<i>Schwache Phänotypen</i>	75
4	DISKUSSION	79
4.1	Frühe Schritte zur Achsenbildung während der Oogenese	79
4.2	Die Etablierung der Dorsoventral-Achse im frühen <i>Tribolium</i> Embryo	82
4.3	Späte Prozesse der dorsoventralen Musterbildung	85
4.4	Potentielle Zielgene von TcDorsal und deren Regulierung	86
4.5	Zur möglichen Funktion von <i>Tccactus</i>	89
4.6	Die Toll-Dorsal Kaskade in <i>Tribolium</i>	93
5	ZUSAMMENFASSUNG	96
6	ANHANG	98
6.1	Allgemeine Abkürzungen.....	98
6.2	Partielle cDNA Sequenz von <i>Tcpipe</i> und abgeleitete Proteinsequenz.....	99
6.3	Phylogenetischer Stammbaum der Pipe Proteine aus Insekten	100
6.4	Partielle cDNA Sequenz von <i>Tccactus</i> und abgeleitete Proteinsequenz	101
7	LITERATUR	102
	ERKLÄRUNG	115
	LEBENS LAUF	116

1 Einleitung

Die Entwicklungsbiologie liefert wichtige Beiträge zum Verständnis evolutionärer Vorgänge. Hierbei kann der Vergleich von Entwicklungsprozessen zwischen verschiedenen Arten Rückschlüsse auf grundlegende Mechanismen dieser Abläufe liefern. Des Weiteren hilft ein solcher Vergleich bei der Klärung der Frage nach den molekularen Grundlagen von Veränderungen, die im Laufe der Evolution zwischen den Bauplänen oder Entwicklungsprozessen zweier Arten entstehen.

Einen der best untersuchten Modellorganismen der Entwicklungsbiologie stellt *Drosophila melanogaster* dar. Von der Etablierung der Körperachsen über die Morphogenese verschiedenster Organe bis zu späten Entwicklungsprozessen sind diese Vorgänge bei der höheren Diptere eingehend analysiert worden. Der Vergleich mit anderen Insektenfamilien hat jedoch ergeben, dass viele der beschriebenen Prozesse bei *Drosophila* abgeleitete Merkmale aufweisen (French, 1993; Tautz *et al.*, 1994, Liu und Friedrich, 2004). Dies wirft die Frage auf, ob und wie diese Prozesse von niederen, ursprünglicheren Insekten realisiert werden und welche der Prozesse und deren molekulare und genetische Grundlagen im Laufe der Evolution weitgehend konserviert geblieben sind oder weitreichende Änderungen erfahren haben.

Der Mehlkäfer *Tribolium castaneum* eignet sich besonders zur vergleichenden Analyse der embryonalen Entwicklung, da er als Mitglied der Coleopteren nicht nur morphologisch weniger spezialisierte Merkmale aufweist, sondern auch im Vergleich zu den Dipteren einen abweichenden Modus der Embryonalentwicklung, als „Kurzkeimmodus“ bezeichnet, verfolgt (vgl. 1.1).

Da dieser Kurzkeimmodus offenbar unter niederen Insekten den vorherrschende Typus der Entwicklung darstellt und vermutlich die ursprüngliche Form der Entwicklung repräsentiert, eignet sich *Tribolium* als Mitglied der Coleopteren, in deren Arten sich sowohl Vertreter für Kurz- als auch für den Langkeimmodus finden sind, um nach grundlegenden Mechanismen der Entwicklung zu suchen, insbesondere, ob der von *Drosophila* abweichende Modus der Embryonalentwicklung Konsequenzen für die Spezifizierungsprozesse der Körperachsen hat. Im Laufe der letzten Jahre sind zudem wichtige molekulare und genetische Methoden etabliert worden, die es ermöglichen, die Entwicklung von *Tribolium* eingehend zu analysieren. Dazu gehören neben *in situ* Hybridisierung (Sommer und Tautz, 1993) die Erzeugung und Identifizierung transgener Tiere (Berghammer *et al.*, 1999a, Lorenzen *et al.*, 2003) und die Ausschaltung zygotischer wie maternaler Gene durch Injektion doppelsträngiger RNA (RNAi) in embryonalen, larvalen oder puppalen Stadien (Brown *et al.*, 1999; Bucher *et al.*

2002; Tomoyasu und Denell, 2004). Dies ermöglicht die Analyse von Genfunktionen in praktisch allen Stadien des Lebenszyklus von *Tribolium*. Die vollständige Sequenzierung des Genoms von *Tribolium* wird in naher Zukunft eine weitere umfassende Datenquelle liefern, mit deren Hilfe die Untersuchung der Entwicklung und Morphogenese des *Tribolium* Embryos noch umfangreicher und eingehender gestaltet werden kann (Brown *et al.*, 2003).

1.1 Das Langkeim- und Kurzkeim-Konzept

In *Drosophila* werden sämtliche Segmente bereits während des Blastodermstadiums festgelegt. Zu diesem Zeitpunkt ist der Embryo noch nicht zellularisiert, er befindet sich in einem syncytiellen Stadium, welches für die Etablierung der Körperachsen von entscheidender Bedeutung ist, da hierfür Faktoren benötigt werden, die frei im Embryo diffundieren können (Ephrussi und St. Johnston, 2004).

Im Gegensatz hierzu werden die meisten Segmente von vielen basalen Insekten nicht während dieses frühen Blastodermstadiums angelegt, sondern erst in späteren Stadien (Davies und Patel, 2002). Während der syncytiellen Phase wird im Gegensatz zum Langkeimmodus zunächst nur eine Keimanlage angelegt, die einige wenige anteriore Segmente umfasst. Die posterioren Segmente werden dagegen im Laufe der Embryonalentwicklung einzeln in einer zellulären Umgebung von einer Wachstumszone hervorgebracht, die sich im posterioren Bereich der Keimanlage bildet (Patel *et al.* 1994). Dies impliziert, dass zygotischen Genen bei der Achsenbildung in niederen Insekten wie *Tribolium* eine größere Funktion zukommt als in höheren Dipteren, wo die Hauptaspekte der Achsenspezifizierung aufgrund der syncytiellen Umgebung noch von diffusiblen maternalen Faktoren bewerkstelligt werden.

Bislang war es nicht möglich, ein Homolog des in *Drosophila* essentiellen anterioren Morphogens Bicoid außerhalb der Gruppe der Cyclorrapha, einer Untergruppe der höheren Dipteren, zu isolieren (Stauber *et al.*, 1999; Brown *et al.*, 2001). Die Entwicklung und Nutzung eines solchen, früh wirkenden anterioren Morphogens lässt sich auch nicht grundsätzlich voraussetzen, da in Kurzkeimembryonen die eigentliche Keimanlage zu Beginn der Embryogenese nur den posterioren Bereich des Gesamteies ausmacht und im Extremfall – wie z.B. bei *Schistocerca* – anfänglich nur die posteriore Kappe des Eies einnimmt (Ho *et al.*, 1997). Dies lässt die Steuerung der Achsenbildung über einen vergleichbaren anterioren Morphogen-Gradienten weniger wirkungsvoll erscheinen, wahrscheinlich ist daher die Bedeutung eines posterioren Gradienten des Caudal-Proteins in diesen ursprünglichen Systemen ausgeprägter (Sander, 1976; Wolff *et al.*, 1998, Lynch und Desplan, 2003).

Hierzu wurde postuliert, dass in basalen Insekten möglicherweise der Anteil von Hunchback (Hb) an der Musterbildung entlang der anteriorposterioren Achse höher ist als in *Drosophila* (Lynch und Desplan, 2003). So scheint auch in *Drosophila* die Hauptaufgabe von Bicoid neben der Spezifizierung der Kopfsegmente die zygotische Aktivierung von *hb* zu sein, die wiederum benötigt wird zur Spezifizierung der T2 und T3 Segmente (neben der Erzeugung einiger abdominaler Segmente durch die Expression eines posterioren Hb Streifens) durch eine Autoaktivierung, wohingegen sämtliche weiteren Funktionen von hunchback - zumindest in artifiziell herbeigeführten Situationen – auch von maternal abgelegter *hunchback* mRNA bewerkstelligt werden können, die ebenfalls bedingt durch Translationshemmung durch Nanos am posterioren Pol, einen AP-Gradienten aufweist (Wimmer *et al.*, 2000; Lynch und Desplan, 2003).

Die *hb* Regulierung via Bcd stellt somit wahrscheinlich eine phylogenetisch späte Errungenschaft dar, wohingegen die Regulierung der thorakalen Segmente in basalen Insekten ohne Bicoid, jedoch über Hb geregelt wird. Hierzu konnte für *Tribolium* gezeigt werden, dass die Funktion der Festlegung von Kopfsegmenten durch *orthodenticle* (*otd*) gesteuert wird, das wie Bicoid ein Homöodomänen-Protein kodiert und an identische DNA-Regionen binden und somit evtl. die selben Zielgene regulieren kann, die in *Drosophila* von Bcd gesteuert werden (Schröder, 2003). Des weiteren wird *otd* in *Tribolium* maternal wie zygotisch exprimiert, während es in *Drosophila* nur zygotisch, *bcd* jedoch maternal exprimiert wird. Somit könnte die Spezifizierung anteriorer Strukturen in *Tribolium* durch die synergistischen Funktionen der Gene *otd* und *hb* gewährleistet werden (Lynch und Desplan, 2003).

Wie sich die unterschiedliche Zellularisierung während der Generation der Körpersegmente in Kurzkeimern im Vergleich zu Langkeim-Insekten im Laufe der Evolution auf die Ausbildung einer korrekten dorsoventralen Achse auswirkt, ist vergleichsweise wenig untersucht. Jedoch zeigt die Morphologie der Eier von Arten verschiedener Ordnungen bereits deutliche Anzeichen einer Asymmetrie auf, anhand derer bereits die Orientierung der Körperachsen des sich entwickelnden Embryos vorhersagbar sind (Roth, 2004). Dies impliziert zum einen, dass auch in diesen Arten bereits wesentliche Aspekte der Achsenspezifizierung des Embryos während der Oogenese ablaufen, zum anderen, dass somit auch hier maternale Faktoren an der Ausbildung der Achsen mitwirken müssten. Des weiteren geht dieser Übergang zum Langkeimmodus einher mit einer Reduktion und Verschiebung der extraembryonalen Membranen in Richtung der DV-Achse (Stauber *et al.*, 1999; Schmidt-Ott, 2000). Auch dies könnte in einer Veränderung der Expression von *hunchback* und eventuell auch seiner Funktion in der Spezifizierung von anterioren Regionen des Embryos begründet sein (Patel *et al.*, 2001).

1.2 Spezifizierung der dorsoventralen Achse bei *Drosophila melanogaster*

Entscheidende Schritte zur Ausbildung einer dorsoventralen Achse des Embryos werden bereits während der Entwicklung der Eizelle realisiert (vgl. 1.2.1). Die hier erzeugte, generelle DV-Information wird in frühen Stadien der Embryonalentwicklung in eine genaue Unterteilung des Embryos anhand eines auf dieser Information basierenden Kerngradienten des Transkriptionsfaktors Dorsal in diskrete Regionen umgesetzt (siehe 1.2.2).

1.2.1 Initialisierung der dorsoventralen Achse bei *Drosophila*

Die dorsoventrale Achse des *Drosophila* Embryos wird wie die anteriorposteriore Achse auch bereits während der Oogenese festgelegt (Übersicht: St. Johnston und Nüsslein-Volhard, 1992, van Eeden und St. Johnston, 1999). Für beide Achsen werden hierzu zunächst in zwei sowohl zeitlich als auch räumlich getrennten Signalprozessen Signale aus der sich entwickelnden Oozyte an das umliegende somatische Gewebe, das Follikelepithel, abgegeben. Das eigentliche Signal in Form des TGF α -ähnlichen Proteins Gurken (Neumann-Silberberg und Schüpbach, 1993) wird hierbei für beide Prozesse verwendet. *gurken* mRNA wird wie auch das Gurken Protein am Oozytenkern lokalisiert und in beiden Prozessen von der Oozyte sekretiert.

Zuerst wird mittels des Gurken-Signals eine Population von terminalen Follikelzellen der Eikammer als posteriore Follikelzellen festgelegt und somit die Eikammer entlang der anteriorposterioren Achse polarisiert (Roth *et al.*, 1995). Dies hat eine Repolarisierung von Komponenten des Zytoskeletts zur Folge, welche wiederum die Translokation des Oozytenkerns von posterior nach anterior nach sich zieht. Die anterior dorsale Position, die der Oozytenkern in Folge dieser Wanderung einnimmt, legt über ein zweites Gurken abhängiges Signal die dorsale Seite des Follikelepithels wie auch nachfolgend des Embryos fest (Neumann-Silberberg und Schüpbach, 1993). Die Wichtigkeit der Oozytenkern-Position bei der Definition der dorsalen Seite lässt sich in artifiziellen Situationen zeigen, in denen die Oozyte zwei statt eines Kernes besitzt. Diese beiden Kerne wandern zu voneinander unabhängigen Positionen entlang der anterioren Grenze der Oozyte und sind dort in der Lage, zwei von einander unabhängige dorsale Regionen festzulegen (Roth *et al.*, 1996).

Für beide Gurken-abhängige Signalprozesse ist die Bindung von Gurken an seinen Rezeptor, Torpedo/DER (*Drosophila* EGF Rezeptor), und die hieraus resultierende Aktivierung der nachgeschalteten intrazellulären Kaskade notwendig (Roth *et al.*, 1995; Ray und Schüpbach, 1996, Peri *et al.*, 1999). Diese Kaskade führt ebenfalls zur Modulierung des EGF-Signals, sowohl durch negative als auch positive Rückkopplungsmechanismen (Peri *et al.*, 1999).

Entscheidend für die Etablierung der dorsoventralen Achse des Embryos ist nun, die durch Aktivierung des EGF Rezeptors und der nachfolgenden Signalkaskade in den dorsalen Follikelzellen festgelegten Positionsinformationen an den sich entwickelnden Embryo weiterzugeben. Dies ist nicht trivial, da zum Zeitpunkt der Eiablage die Follikelzellen bereits degeneriert sind und somit keine direkte Übermittlung der DV-Information an den Embryo zu diesem späten Zeitpunkt möglich ist.

Die Repression der Transkription des *pipe* Gens in dorsalen Follikelzellen durch Komponenten des EGFR-Signalwegs ist hierbei entscheidend. Die Beschränkung dieser Expression ist abhängig von Gurken, da eine Reduktion der Aktivität von Gurken zu einer Ausweitung, uniformes Gurken Signal jedoch zu einer Repression der *pipe* Transkription führen. Dies hat zur Folge, dass sich die Expression von *pipe* auf die ventralen 30-40% des Follikelepithels beschränkt (Sen *et al.*, 1998).

Drei der 12 Gene, die für die Ausbildung der dorsoventralen Achse essentiell sind, werden im Follikelepithel der Eikammer exprimiert. Während *pipe* nur auf der ventralen Seite des Follikelepithels exprimiert wird, finden sich Transkripte der beiden Gene *windbeutel* und *nudel* in allen Follikelzellen (Sen *et al.*, 1998). Das Nudel Protein kann frei im Perivitellinspalt zwischen der Vitellinmembran und der Oozyte diffundieren (LeMosy *et al.*, 1998). Klone, in denen große Areale ventraler Follikelzellen mutant für *nudel* sind, zeigten, dass Nudel in diesen Zellen nicht benötigt wird, sondern auch von weiter dorsal gelegenen Zellen bereit gestellt werden kann (Nilson und Schüpbach, 1998). Im Gegensatz dazu wird die Aktivität von *windbeutel* (Konsolaki und Schüpbach, 1998) und *pipe* (Sen *et al.*, 1998) speziell in den ventralen Follikelzellen benötigt. Windbeutel, ein Protein mit Ähnlichkeit zum Protein Erp29 aus Hefe, wird vermutlich zur Überführung des Pipe Proteins aus dem endoplasmatischen Reticulum in den Golgi Apparat speziell in den ventralen Follikelzellen benötigt (Sen *et al.*, 2000).

Pipe zeigt eine Sequenz-Ähnlichkeit zu Glucosaminoglycan modifizierenden Enzymen der Familie der Heparansulfat-2-O-Sulfotransferasen. Deshalb ist es wahrscheinlich, dass die Funktion von Pipe in der Modifikation von einem oder mehreren Bestandteilen der extrazellulären Matrix besteht. Das von Pipe modifizierte Molekül ist jedoch bislang nicht identifiziert worden. Es wird vermutet, dass die Modifizierung dieser unbekanntes Komponente der extrazellulären Matrix die Bildung eines Komplexes an der Oberfläche des jungen Embryos initiiert, zu dem neben der aktivierten Protease Nudel unter anderem das Zymogen der Serinprotease Gastrulation defective (Gd) rekrutiert wird, das im Zuge dieser Komplexbildung durch einen nicht identifizierten Faktor aktiviert wird (Han *et al.*, 2000). Dies stellt einen entscheidenden Schritt zur Festlegung der dorsoventralen Asymmetrie des Embryos dar, da

die Aktivität von Gd die ventrale Seite des Embryos definiert (DeLotto, 2001). Da Nudel wie erwähnt nicht notwendigerweise in den ventralen Follikelzellen benötigt wird, erscheint es wenig wahrscheinlich, dass Pipe Nudel selbst modifiziert (Nilson und Schüpbach, 1998). Ebenso können sowohl Nudel als auch Gd in Abwesenheit von *pipe* aktiviert werden, was vermuten lässt, dass das Pipe Substrat einen nachgeschalteten Bestandteil der Proteasekaskade reguliert bzw. aktiviert (LeMosy *et al.*, 1998; LeMosy *et al.*, 2001)

Die Bildung des Komplexes wiederum führt durch die Aktivierung von Gd zur Initialisierung einer Proteasekaskade ausschließlich auf der ventralen Seite, an deren Beginn die aktivierte Gd Protease das Zymogen der Snake Protease spaltet, welche wiederum die Easter Protease aktiviert (Übersicht: Hecht und Anderson, 1992; DeLotto, 2001; Dissing *et al.*, 2001). Diese Kaskade zeigt Ähnlichkeiten zur Protease Kaskade, die für die Blutgerinnung in Säugern verantwortlich ist. Beide Kaskaden bestehen aus Serin-Proteasen der Trypsin-Familie, die als inaktive Zymogene in den extrazellulären Raum sekretiert werden und dort von der jeweils vorgeschalteten Protease aktiviert werden (Kremm und di Cera, 2002).

Die Aktivierung der Proteasekaskade erfolgt unmittelbar nach der Befruchtung des Eies (Morisato und Anderson, 1994). Die Kaskade, zumindest aber Gd und Snake, unterliegt dabei auch einer Regulierung über einen Rückkopplungsmechanismus, der dazu dient, das Signal in ventralen Regionen zu amplifizieren (LeMosy *et al.*, 2001).

Easter als Endglied dieser Kaskade spaltet das Pro-Spätzle Protein und führt somit zur Produktion des aktiven Spätzle-Liganden in unmittelbarer Umgebung seines Rezeptors Toll (Morisato und Anderson, 1994). Spätzle wird als inaktiver Vorläufer sekretiert und bildet erst in seiner aktiven Form eine sog. „Cystein-Knot“ Struktur aus (Morisato und Anderson, 1994; Mizuguchi *et al.*, 1998). Die räumliche Nähe zwischen aktivem Ligand und Rezeptor könnte für die Errichtung eines stabilen, fehlerfreien Gradienten des extrazellulären Morphogens erforderlich sein, da somit eine mögliche Diffusion des Liganden unterdrückt wird (Roth, 1998). Somit wird die Produktion des aktiven Liganden eng mit der Präsentation des Liganden an seinen Rezeptor gekoppelt.

Der Zusammenhang zwischen der Expression und der Aktivität von Pipe und der Gradienten-Ausbildung von Dorsal ist jedoch nicht linear: Die Expressionsdomäne von *pipe* im ventralen Follikel epithel umfasst wie erwähnt etwa ein Drittel der gesamten Follikelzellen, während die höchsten Kernkonzentrationen von Dorsal nur in einem Streifen in den am weitesten ventral gelegenen etwa 16 Blastodermkernen erreicht werden. Des Weiteren ist die Region des ventralen Follikel epithels, in dem die Aktivität von Pipe benötigt wird, deutlich kleiner als die Expressionsdomäne des Gens (Sen *et al.*, 1998). Diese Feinregulierung des Dorsal-Gradienten

wird auf mindestens 2 Ebenen realisiert: Zum einen wird die Aktivität der extrazellulären Protease-Kaskade über die Funktion des Serpins 27A, eines Serin-Protease Inhibitors, vermutlich über die Regulierung der Aktivität der Easter Protease (Lygoxigakis *et al.*, 2003) reguliert. Freies, aktives Easter findet sich nur in sehr geringen Mengen und wird sehr schnell in einen hoch molekularen Komplex umgesetzt, der einen Protease-Inhibitor enthält (Misra *et al.*, 1998). Das Serpin 27A könnte dazu benötigt werden, die Aktivierung der Toll-Kaskade wirkungsvoll auf die ventrale Seite der Oozyte zu beschränken, wo die der Proteasekaskade durch die Funktion von Pipe verstärkt aktiviert wird. Dies führt zu einem positiven Aktivierungszyklus der Proteasen und einer Überwindung der inhibitorischen Wirkung von Serpin 27A (Lygoxigakis *et al.*, 2003). So kann erst die Aktivität von Pipe die Aktivität der Proteasekaskade über einen Schwellenwert anheben, was notwendig ist um die Erzeugung des aktiven Spätzle Liganden auf ventrale Regionen zu beschränken.

Des Weiteren existiert auch innerhalb des Embryos ein Rückkopplungsmechanismus, der die Aktivität der intrazellulären Pelle Kinase im Embryo reguliert (Towb *et al.*, 2001, vgl. 1.2.2).

1.2.2 Etablierung der dorsoventralen Achse des *Drosophila*-Embryos

Die Aktivierung des uniform auf der Oberfläche des Embryos verteilten Toll Rezeptors spezifisch auf der ventralen Seite des Embryos, bedingt durch die lokale Produktion des zugehörigen Liganden Spätzle, führt zur Weiterleitung des durch Pipe initiierten ventralen Signals ins Innere des Embryos. Hieran sind neben Toll unter anderem die vier Gene *tube*, *pelle*, *cactus* und *dorsal* beteiligt. Wird Toll nicht aktiviert, so entwickeln sich Embryonen deren Zellen sämtlich einem dorsalen Schicksal folgen (Hashimoto *et al.*, 1991).

Der *Drosophila* Toll-Rezeptor ist das namensgebende Mitglied einer ganzen Familie von Transmembran-Rezeptoren, die eine recht hoch konservierte, intrazelluläre, zu Toll homologe Domäne (TH) vereint (Hashimoto *et al.*, 1991, Rock *et al.*, 1998). In Vertebraten wie in *Drosophila* wurden in der Zwischenzeit jeweils mindestens 9 verschiedene Formen von Rezeptoren der Toll Familie gefunden (Silverman und Maniatis, 2001).

Die Aktivierung des Toll-Rezeptors führt zur Rekrutierung der beiden Faktoren Tube und Pelle zur Zellmembran, vermittelt durch das Adapterprotein Myd88, welches sowohl direkt an den aktivierten Toll-Rezeptor als auch an Tube bindet und so zur Bildung eines membranständigen Komplexes führt (Towb *et al.*, 1998, Sun *et al.*, 2002; Kambris *et al.*, 2003). Tube fungiert ebenfalls als Adapterprotein, das über seine N-terminale sog. „death domain“ mit Myd88, Toll und Pelle interagieren kann und das außerhalb der Insekten keinen direkten Gegenpart in Vertebraten zu besitzen scheint (Letsou *et al.*, 1991; Govind 1999). Dagegen besitzt Pelle neben seiner ebenfalls N-terminal lokalisierten „death domain“ eine C-terminale

Kinase Domäne, über die Pelle im Anschluss an die, durch Toll Rezeptor Aktivierung vermittelte Bildung des membranständigen Toll-Tube-Pelle Proteinkomplexes, das ventralisierende Signal in der Zelle weiterleiten kann (Großhans *et al.*, 1994; Edwards *et al.*, 1997; Sun *et al.*, 2002). Da Dorsal, Tube und Pelle direkt interagieren können, lässt sich vermuten, dass in Folge der Aktivierung Tube und Pelle das intrazelluläre Cactus-Dorsal Dimer ihrerseits zur Bildung eines Multi-Proteinkomplexes rekrutieren (Edwards *et al.*, 1997; Towb *et al.*, 1998). Im Anschluss an die Signal Weiterleitung führt die Phosphorylierung von Tube durch Pelle zu einer Ablösung von Pelle und zur Auflösung des membranständigen Komplexes (Towb *et al.*, 1998, 2001). Dieser Prozess ist in Mutationen für Pelle, die die Kinase Domäne betreffen, beeinträchtigt.

In Abwesenheit des ventralisierenden Signals bindet das I κ B-Protein Cactus über seine Ankyrin-Repeat Domäne an den Nf- κ B ähnlichen Faktor Dorsal. Dieser Cactus-Dorsal Komplex wird im Cytoplasma gehalten, vermutlich, weil Cactus die Kernlokalisierungssequenz von Dorsal maskiert (Kidd, 1992). Embryonen mit fehlender Cactus-Funktion zeigen daher einen ventralisierten Phänotyp, der einher geht mit einer verstärkten Einwanderung von Dorsal in die Zellkerne (Roth *et al.*, 1991).

Die Aktivierung der Pelle Kinase führt letztlich zur signalabhängigen Phosphorylierung von Cactus und zum Abbau des Cactus Proteins auf der ventralen Seite, da Cactus im Anschluss an die Phosphorylierung nicht mehr an Dorsal bindet (Belvin *et al.*, 1995, Bergmann *et al.*, 1996; Reach *et al.*, 1996), und führt so zur Freisetzung des Dorsal Proteins, das im Anschluss seinerseits modifiziert wird und aufgrund seines Kernlokalisierungssignals in den Kern gelangen kann und dort diverse Zielgene reguliert (Roth *et al.*, 1989; Steward, 1989; Drier *et al.*, 1999, siehe auch 1.3). Die Auflösung des Toll/Tube/Pelle Komplexes ist vermutlich notwendig, um ein Andauern des Signals an den Cactus/Dorsal Komplex zu unterbinden und somit in sämtlichen Regionen des Embryos eine stabile Kernkonzentration von Dorsal zu gewährleisten (Towb *et al.*, 2001).

Es scheint jedoch wenig wahrscheinlich, dass die Phosphorylierung von Cactus durch Pelle direkt erfolgt, da weder Pelle *in vitro* in der Lage ist, Cactus zu phosphorylieren, noch die aus Vertebraten bekannten I κ B-Kinasen eine Ähnlichkeit zu Pelle aufweisen (Großhans *et al.*, 1994; Karin, 1999). Andererseits jedoch konnte gezeigt werden, dass der *Drosophila* I κ B-Kinase Komplex für die dorsoventrale Musterbildung nicht essentiell ist und statt dessen eine Funktion in der Immunabwehr ausübt (Silverman *et al.*, 2000).

Neben der Phosphorylierung von Cactus zur Freisetzung des Dorsal Proteins wird auch Dorsal selbst in Folge des ventralisierenden Signals modifiziert: Drier *et al.* (1999) konnten

zeigen, dass auch Dorsal im Anschluss an das Toll Signal phosphoryliert wird und dass diese Phosphorylierung unabhängig von einem Abbau von Cactus erfolgt. Es scheint, dass diese Modifikation an einem oder mehreren Serin-Resten in der rel-Homologie Domäne (RHD) notwendig ist, um einen effizienten Transport von Dorsal in den Zellkern zu gewährleisten. Während eine Modifikation von Cactus offensichtlich ausreichend ist, um niedrige Kernkonzentrationen von Dorsal in lateralen Bereichen des Embryos zu realisieren, benötigen die hohen Konzentrationen, die sich in den am weitesten ventral gelegenen Kernen finden, die zusätzliche Phosphorylierung des Dorsal Faktors (Drier *et al.*, 1999). Welche Kinase für diesen Prozess verantwortlich ist, ist bislang nicht bekannt.

Somit bildet sich in Antwort auf das ventralisierende Signal im frühen *Drosophila*-Embryo ein Gradient aus, mit maximalen Kernkonzentrationen in den am weitesten ventral gelegenen Blastodermkernen, abnehmender Kernkonzentration in lateralen Bereichen des Embryos, während Dorsal auf der dorsalen Seite als Folge seiner Komplexierung mit Cactus weiterhin im Cytoplasma gehalten wird.

1.3 Die Zielgene des Dorsal-Gradienten

Der ausgebildete Dorsal Kerngradient ist Grundlage einer Unterteilung des Embryos entlang seiner dorsoventralen Achse in wenigstens drei verschiedene, nicht-überlappende Regionen (Roth *et al.*, 1989). Dies liegt in der Fähigkeit des Dorsal Transkriptionsfaktors begründet, verschiedene Kombinationen von zygotischen Genen zu regulieren (Übersicht: Stathopoulos und Levine, 2002a). Dabei kann Dorsal je nach Kontext der Dorsal-Bindestellen zu den Bindestellen für verschiedene Co-Faktoren in den cis-regulatorischen Sequenzen seiner Zielgene entweder als Aktivator oder Repressor für die Transkription des jeweiligen Zielgens wirken (Flores-Saaib *et al.*, 2001).

Die unterschiedlichen Klassen von Zielgenen liegen in Sequenzmotiven in den cis-regulatorischen Sequenzen der jeweiligen Zielgene begründet, an die Dorsal mit unterschiedlicher Affinität binden kann und somit in Kombination mit anderen Transkriptionsfaktoren zu verschiedenen Antworten in Abhängigkeit von der jeweiligen Dorsal Kernkonzentration führt (Markstein *et al.*, 2002; Stathopoulos und Levine, 2002a): Eine hohe Konzentration führt zur Aktivierung von *twist* (Thisse *et al.*, 1991, Jiang *et al.*, 1991) und *snail* (Ip *et al.*, 1992b) in einem Streifen von 16-18, im Blastoderm am weitesten ventral gelegenen Kernen, die für die Spezifizierung des Mesoderms verantwortlich sind. Gelangt in artifiziellen Situationen Dorsal

in alle Kerne des Embryos, so erstreckt sich auch die *twist* Expression in laterale und dorsale Bereiche (Roth *et al.*, 1989).

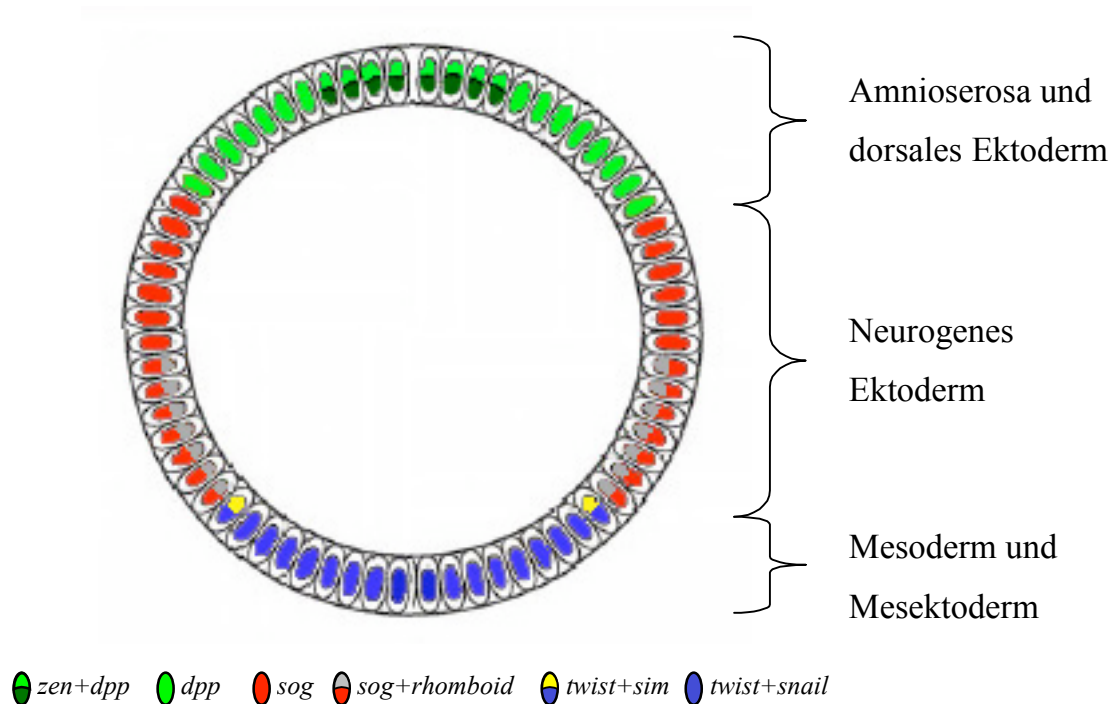


Abb.1.1: Expression der Zielgene von Dorsal. Gezeigt ist ein schematischer Querschnitt durch einen wild-typischen *Drosophila*-Embryo im zellulären Blastodermstadium mit 72 Zellkernen an der Peripherie. Expression verschiedener Kombinationen von Zielgenen wird durch unterschiedliche Farbcodes dargestellt.

Beide Gene, *twist* und *snail*, kodieren für Transkriptionsfaktoren und zeigen in ihren cis-regulatorischen Bereichen Motive, die als nieder affine Bindestellen für Dorsal identifiziert worden sind (Thisse *et al.*, 1991; Ip *et al.*, 1992b). Für eine Besetzung sämtlicher Bindestellen sind daher hohe Konzentrationen von Dorsal nötig, wie sie nur in den am weitesten ventral gelegenen Kernen vorliegen.

Es konnte gezeigt werden, dass im Anschluss an die Aktivierung durch Dorsal Twist die Transkription seines eigenen Gens hoch reguliert, während die *snail* Expression durch eine synergistische Regulierung von Dorsal und Twist, für das ebenfalls Bindestellen im *snail* Promoter identifiziert werden konnten, gesteuert wird und somit zu einer scharfen Abgrenzung zwischen Mesoderm und Neuroektoderm führen (Leptin 1991, Ip *et al.*, 1992b). Obwohl Twist notwendig und ausreichend zur selbstständigen Spezifizierung einiger Schwellenwerte des Dorsal Gradienten ist (z.B. für *sim* und *vnd*), ist es jedoch nicht in der Lage, einen Ausfall von Dorsal komplett zu kompensieren (Stathopoulos und Levine, 2002a).

Benachbart zum Mesoderm werden weiter lateral gelegene Kerne auf ein neuroektodermales Schicksal festgelegt. In dieser Region ist die Kernkonzentration von Dorsal geringer, was zur Expression von Zielgenen wie *rhomboid*, *brinker* und *short gastrulation* in breiten Streifen in diesen Zellen führt. Dazu passend lassen sich in der Promoterregion des *rhomboid* Gens Bindestellen mit hoher Affinität für Dorsal finden (Ip *et al.*, 1992a). Dass die Expression dieser Gene nicht in die Region des prospektiven Mesoderms hinein reicht, ist vor allem in der Funktion des Snail Proteins begründet, das zur Familie der Zinkfinger Transkriptionsfaktoren gehört und in den ventralen Zellen als Repressor für neuroektodermale Gene wirkt (Ip *et al.*, 1992a; Stathopoulos und Levine, 2002a). Somit wird durch die abnehmende Konzentration von Dorsal in den lateralen Kernen das neurogene Ektoderm in Richtung der DV-Achse weiter unterteilt. Dies lässt sich am besten verdeutlichen in der geschachtelten Expression der Gene *vnd*, *ind* und *msh*, die allesamt von ventral nach dorsal definierte Reihen an Neuroblasten spezifizieren (Cowden und Levine, 2003).

Gleichzeitig wird in ventralen wie lateralen Regionen durch Dorsal die Expression der Gene *zerknüllt* (*zen*), *decapentaplegic* (*dpp*) und *twisted gastrulation* reprimiert. Auf diese Weise wird die Expression dieser Gene auf die am weitesten dorsal gelegenen Kerne des Blastoderms eingeschränkt, die letztlich die Zellen des dorsalen, nicht-neurogenen Ektoderms und der Amnioserosa hervorbringen. Insbesondere konnte für den *zen*-Promoter gezeigt werden, dass er hochaffine Dorsal-Bindestellen enthält, die in weiten Bereichen des Embryos zur Reprimierung von *zen* auch durch niedrige Dorsal Kernkonzentrationen führen und die Expression auf die am weitesten dorsal gelegenen Regionen des Embryos eingrenzen (Cai *et al.*, 1996). Für diese Reprimierung ist im Gegensatz zur Aktivierung lateraler und ventraler Gene die Funktion von Groucho als Co-Repressor notwendig (Stathopoulos und Levine, 2002a).

1.4 Die Funktion der Toll-Dorsal Kaskade in der Immunabwehr

Insekten besitzen zur Immunabwehr im Gegensatz zu Chordaten kein adaptives, sondern nur ein angeborenes Immunsystem, welches sowohl zu zellulären als auch humoralen Antworten befähigt. Neben epithelialen Abwehrmechanismen existieren auch systemische Antworten, welche die Hämolymphe als Transportsystem verwenden. Ein Beispiel hierfür ist der Transport von Hämocyten, die die zelluläre Abwehr bewerkstelligen (Übersicht: Brennan und Anderson, 2004).

In *Drosophila* führt eine bakterielle oder eine Pilzinfektion neben einer zellulären Abwehrreaktion zur Produktion einer Reihe antibakterieller oder antifungaler Peptide im

Fettkörper, dem funktionellen Analog zur Säugerleber (Übersicht: Anderson 2000, Brennan und Anderson, 2004). Diese Peptide übernehmen eine entscheidende Funktion in der Abwehr dieser Infektionsherde, da sie spezifisch gegen Pilzinfektionen (Drosomycin, Metchnikowin, Cecropin), gram-negative (Attacin, Cecropin, Drosocin, Diptericin) oder gram-positive Bakterien (Defensin, Metchnikowin) wirken (Meister *et al.*, 1997).

Die Produktion einzelner Peptide wird bei einer Infektion größtenteils spezifisch, jedoch nicht ausschließlich induziert. So führt eine Pilzinfektion spezifisch zur Induktion von Metchnikowin und Drosomycin, eine Hefeinfektion dagegen führt zur Expression sowohl antifungaler als auch antibakterieller Peptide (Lemaitre *et al.*, 1997). Es wurde nachgewiesen, dass in Mutanten für Faktoren der Toll/Dorsal Kaskade die Produktion von einigen dieser antimikrobiellen Peptide - insbesondere Drosomycin, aber auch von Peptiden gegen gram-positive Bakterien - nicht stattfinden kann (Lemaitre *et al.*, 1996). Daher wurde postuliert, dass Teile des Toll/Dorsal Signalweges an der spezifischen Genaktivierung von zumindest einigen dieser Peptide beteiligt sind. Tatsächlich führen Infektionen zum differentiellen Transport $\text{Nf-}\kappa\text{B}$ ähnlicher Faktoren (Dorsal, Dif oder Relish) in den Zellkern von Fettkörperzellen und zur transkriptionellen Induktion der antimikrobiellen Peptide (Dushay *et al.*, 1994; Ip *et al.*, 1995; Lemaitre *et al.*, 1995; Wu und Anderson, 1998). Die Aktivierung von Toll1 führt spezifisch zum Kerntransport von Dif und zur Expression von Drosomycin und Defensin und in *dif*-Mutanten wird die Induktion antifungaler sowie anti-gram-positiver Peptide verhindert (Meng *et al.*, 1999). In *relish* Mutanten unterbleibt dagegen die Induzierung von Peptiden gegen gram-negative Pathogene wie CecropinA und Diptericin und die Expression der anderen antimikrobiellen Peptide kann nicht voll erfolgen (Hedengren *et al.*, 1999).

In Folge einer Infektion lässt sich die Produktion des aktiven Toll-Liganden Spätzle nachweisen. Hierfür werden jedoch die Proteasen der Dorsoventral-Kaskade nicht benötigt, die Regulation der Spätzle-Produktion zeigt jedoch, dass auch hier Spätzle von Proteasen aktiviert wird (Williams *et al.*, 1998; Levashina *et al.*, 1999).

Analog zur Signalkaskade der dorsoventralen Musterbildung führt die Bindung von Spätzle an den Toll-Rezeptor zu dessen Aktivierung und zur Bildung eines intrazellulären Proteinkomplexes in der Umgebung des aktivierten Rezeptors, an dem neben Toll auch Tube, Pelle (bei Vertebraten IRAK), sowie das Adapterprotein dMyd88 beteiligt sind, was wiederum zur Weiterleitung des Signals über das Molekül dTRAF (*Drosophila* TNF-receptor-associated factor; Liu *et al.*, 1999) an den $\text{I}\kappa\text{B}$ -Kinase Komplex IKK führt (Chariot *et al.*, 2002). Dieser Komplex besteht aus mehreren Untereinheiten ($\text{IKK}\alpha$, β , γ sowie der $\text{Nf-}\kappa\text{B}$ induzierenden Kinase NIK) und phosphoryliert das in inaktiven Komplexen mit den $\text{Nf-}\kappa\text{B}$

ähnlichen Proteinen Dorsal bzw. Dif befindliche I κ B ähnliche Protein Cactus, was zur Ubiquitinylierung und nachfolgend zum Abbau des Cactus Proteins und zur Freisetzung von Dorsal und Dif führt (Ip *et al.*, 1993; Lemaitre *et al.*, 1995; Wu und Anderson, 1998; Imler und Hoffmann, 2000). Diese Cactus/Dorsal und Cactus/Dif Komplexe haben ihre Entsprechung in den Nf- κ B/I κ B Komplexen bei Vertebraten (Belvin und Anderson, 1996).

Im Gegensatz zu Vertebraten, in denen Toll-ähnliche Rezeptoren (TLRs) direkt an der Erkennung von eingedrungenen Pathogenen beteiligt sind, scheint *Drosophila* Toll nicht direkt an mikrobielle Bestandteile zu binden (Girardin *et al.*, 2002). Ob einige der weiteren gefundenen Toll ähnlichen Rezeptoren an der Immunabwehr in *Drosophila* beteiligt sind, scheint ebenfalls nicht restlos geklärt (Brennan und Anderson, 2004). Für einige der Vertebraten Homologe der Toll Rezeptoren wurde gezeigt, dass sie vor allem in ihren extrazellulären, Leucin-repeat reichen Domänen einen hohen Grad an Diversität aufweisen - so sind die extrazellulären Domänen der menschlichen TLR2 und TLR4 nur zu 24% identisch - und verschiedene, spezifische Pathogen-Bestandteile erkennen können, so genannte PAMPs (pathogen associated molecular patterns). Beispiele hierfür sind Lipopolysaccharide (LPS) von gram-negativen Bakterien oder Mannane in Pilzen, die von allen Tieren als körperfremd erkannt werden (Anderson, 2000). So wird die Erkennung von LPS beim Menschen spezifisch vom TLR2 durchgeführt, wofür jedoch noch zusätzliche Proteine benötigt werden, die die Bindungsaffinität der LPS für die TLRs erhöhen (Yang *et al.*, 1998). Jedoch besteht bei TLR2 die Immunantwort nicht in der Produktion antimikrobieller Peptide, sondern im Falle von LPS in der Erzeugung spezifischer Antikörper und der Aktivierung von Makrophagen, die entsprechende Partikel phagozytieren und die Produktion von Cytokinen stimulieren.

Zur vollen Aktivierung der Transkription antimikrobieller Peptide sind in *Drosophila* neben den jeweiligen Nf- κ B Proteinen weitere zusätzliche Transkriptionsfaktoren erforderlich, so z.B. der GATA-Transkriptionsfaktor Serpent. In *serpent*-Mutanten werden diese antimikrobiellen Peptid-Gene nur partiell aktiviert und die Mutation einer GATA-Faktor Bindestelle in der cis-regulatorischen Region des Cecropin A1 Gens verhindert dessen Expression (Anderson 2000; Petersen *et al.*, 1999).

Auch die extrazelluläre Proteinkaskade über Gd, Snake und Easter, die in *Drosophila* ausschließlich für die dorsoventrale Musterbildung, nicht aber für die Immunantwort benötigt wird (Lemaitre *et al.*, 1996), besitzt einen entsprechenden Widerpart in Vertebraten, deren Komponenten indirekt an der Immunabwehr beteiligt sind. Homologe Enzyme sind hier in der Blutgerinnung und dem Komplement-System maßgeblich involviert (Übersicht: Kremm und Di Cera, 2002). Auch die Organisation der Kaskaden über drei Trypsin-ähnliche

Serinproteasen, die als Zymogene sezerniert werden und sich sequentiell proteolytisch aktivieren, ist konserviert.

1.5 Sequenzvergleich der Proteine der Dorsal-Gruppe in verschiedenen Insektenarten

Um Hinweise zu erhalten, in wie weit die Vorgänge, die in *Drosophila melanogaster* zur Ausbildung einer dorsoventralen Achse führen (vgl. 1.2.1 und 1.2.2), auch eine Rolle in der Spezifikation der Achsen niederer Insekten haben können, wurde auf Basis der Proteinkodierenden Aminosäuresequenzen ein Vergleich der 11 Gene der Dorsal Gruppe sowie des IκB-ähnlichen Proteins Cactus mit den jeweiligen Homologen aus vier Insektenarten verschiedener Familien durchgeführt: Diese Arten sind *Apis mellifera* (Hymenoptera), *Bombyx mori* (Lepidoptera), *Anopheles gambiae* (Nematocera, Diptera) und *Drosophila pseudoobscura* (Brachycera, Diptera). Die Nematocera repräsentieren eine niedrigere Untergruppe der Dipteren, Lepidoptera werden nach morphologischen wie auch molekularen Kriterien als Schwestergruppe zu den Dipteren angesehen, Hymenopteren wiederum bilden eine Gruppierung außerhalb dieser Gruppe um Lepidopteren und Dipteren (Adoutte *et al.*, 2000; Cranston und Gullan, 2002). Die Coleopteren, zu denen *Tribolium* gehört, werden im allgemeinen als Schwestergruppe zu den anderen holometabolen Insekten angesehen und dies wird auch durch molekulare Untersuchungen unterstützt (Whiting *et al.*, 1997; Cranston und Gullan, 2002), jedoch ist die genaue Positionierung der Coleopteren und ihrer Untergruppen zueinander noch nicht genau geklärt (Whiting *et al.*, 1997; Caterino *et al.*, 2002).

Die Sequenzierung der Genome der oben genannten Arten sind teilweise oder komplett durchgeführt worden und die zugehörigen Sequenzen sind über das Internet verfügbar (vgl. 2.4). Für den Vergleich der Proteine, die an der dorsoventralen Achsenbildung in *Drosophila* beteiligt sind, wurden nur eindeutig identifizierte Orthologe berücksichtigt. Das heißt, dass für die in der jeweiligen Genomsequenz der einzelnen Arten identifizierten, homologen Proteine ihrerseits in der Gesamtsequenz von *Drosophila melanogaster* nach dem nächst verwandten Homolog gesucht wurde; konnte hierbei das Ausgangsprotein nicht als dasjenige mit der höchsten Identität isoliert werden, wurde der Treffer verworfen („best reciprocal hit“, Zdobnov *et al.*, 2002).

Da die Annotation der genomischen DNA-Sequenzen aus *Bombyx mori* bislang nur unvollständig durchgeführt wurde und daher einige der gesuchten Homologe nicht eindeutig oder

ihre Sequenz nicht vollständig identifiziert werden konnten, eignen sich die ermittelten Werte für *Bombyx* nur eingeschränkt für einen Vergleich und sind daher von der weiteren Betrachtung teilweise ausgenommen.

Protein	<i>Bombyx mori</i>	<i>Apis mellifera</i>	<i>Anopheles gambiae</i>	<i>D. pseudoobscura</i>
Windbeutel aa39-98	39,3 a)	32,8	31,9	69,3
	41,7	45,8	53,3	81,7
Pipe 10 ST-Box 10	66,6 (1)	63,9 (1)	64,6 (1)	90,3 (10)
	68,4	66,2	72,0	94,2
Nudel PD1+2	26,9	n.d.	25,7	57,2
	31,1	34,8	43,9	83,7
Gd PD aa243-	--	--	n.d.	71,1
			21,1	77,8
Snake PD aa186-	24,4 b)	29,4	22,1	78,8
	28,8	35,8	42,4	87,8
Easter PD aa128-	41,7	46,5	49,9	87,1
	45,4	44,7	54,9	90,5
Spätzle 1	--	(56,9) b)	-- c)	75,7
Toll TIR	48,7	33,7	29,7 (5)	71,2 (10)
	54,7	62,6	58,8	92,6
Tube	n.d.	n.d.	n.d.	49,0
	22,0	18,8	19,0	53,9
Pelle Kinase Domäne	n.d.	n.d.	n.d.	79,7
	41,8	41,3	41,3	81,6
Cactus (I ^K B)	--	22,8	32,7	68,4
		35,0	47,6	91,7
Dorsal (Nf- ^K B) RHD aa47-324	56,5	68,1	71,7	73,2
	56,0	71,1	69,7	98,9

Tabelle 1.1: Vergleich der hergeleiteten Proteinsequenzen von Homologen der Dorsal Gruppe und Cactus im Vergleich. Anteil identischer Aminosäuren zu *Drosophila melanogaster* in %. Zeile 1 zeigt jeweils den Vergleich der gesamten identifizierten Sequenz, Zeile 2 zeigt den Vergleich konservierter Domänen. Zahlen in Klammern geben die Anzahl der insgesamt gefundenen homologen Sequenzen an. Bemerkungen: --) kein Homolog identifizierbar; a) aa85-98 konnten in *Bombyx* nicht identifiziert werden; b) kein eindeutiges Ortholog; c) es existieren Homologe zu DmSpz2 und 4-6, jedoch nicht zu DmSpz1 und Spz3; n.d.: Wert nicht ermittelt. Abkürzungen: PD = Protease Domäne; TIR = Toll intrazelluläre Domäne; RHD = Rel homologe Domäne aa = Aminosäurepositionen der jeweiligen *Drosophila melanogaster* Sequenz

Ein Vergleich der kompletten Proteinsequenzen – soweit möglich – ergibt in vielen Fällen eine Abweichung von den erwarteten phylogenetischen Verwandtschaftsverhältnissen. So sollte z.B. die Sequenz des Orthologs zu DmPipe Sulfotransferasebox 10 (ST-Box 10) aus *Anopheles* dem *Drosophila* Protein ähnlicher sein, als das *Bombyx* Ortholog, jedoch wurde das Umgekehrte beobachtet. Eine Reduktion auf die eigentliche Sulfotransferasebox zeigt jedoch wie erwartet eine höhere Ähnlichkeit von DmPipe ST10 zu AgPipe als zu BmPipe. Dies lässt sich auch für einige der weiteren Proteine beobachten. Daher wird im folgenden nur auf konservierte Domänen innerhalb der jeweiligen Proteinfamilie eingegangen.

Die am stärksten konservierten Proteine sind offensichtlich Pipe, Toll und Dorsal. Dies lässt sich damit begründen, dass diese Proteine bei der Etablierung der DV-Achse nicht nur Schlüsselpositionen einnehmen, sondern auch in anderen Prozessen benötigt werden – so werden alle 10 ST-Boxen in *D.melanogaster* in den Speicheldrüsen exprimiert (Sergeev *et al.*, 2001), was auf eine ancestrale Rolle in der Funktion dieses Organs nahe legt.

Das primäre *pipe* Transkript in *D.melanogaster* enthält sämtliche 10 ST-Boxen und wird differentiell gesplittet, was zur Produktion von 10 verschiedenen reifen Transkripten führt, welche alle eine solche ST-Box enthalten (Sergeev *et al.*, 2001). Die Konservierung gilt unter den 10 in *Drosophila melanogaster* gefundenen alternativen Spliceprodukten jedoch nur für die oben erwähnte Sulfotransferasebox 10 (ST10). Während auch in *Drosophila pseudoobscura* 10 mögliche Varianten gefunden werden konnten, findet sich in sämtlichen weiteren betrachteten Arten nur jeweils eine ST-Box, die allesamt die höchste Aminosäureidentität mit DmPipe ST10 aufweisen (vgl. 3.1.2). Somit scheinen die 9 weiteren ST-Boxen erst nach Abspaltung der Nematocera von der Linie der Brachycera entstanden zu sein. In Übereinstimmung dazu konnten aus *Musca domestica* 2 verschiedene ST-Boxen isoliert werden, die keine Orthologe zu DmPipe ST10 darstellen (eigene Beobachtung), so dass bereits in basalen Brachyceren zumindest eine Duplikation der ST-Box Exons erfolgt sein muss.

Da in *D.melanogaster* zwischen den ST-Boxen 7 und 10 partielle Redundanz zu bestehen scheint und beide im Follikel epithel exprimiert werden, erscheint eine Funktion der Pipe Proteine aus nicht-Drosophiliden in der Ausbildung der Dorsoventralachse durchaus vorstellbar (Sen *et al.*, 1998; Sergeev *et al.*, 2001).

Auch Toll und Dorsal sind an anderen Prozessen beteiligt – so in der Hämatopoiese (Govind, 1999) und in der Immunabwehr (Anderson, 2000). Es wurde bereits vermutet, dass die Immunabwehr die ancestrale Funktion des Toll-Dorsal Signalweges war und dieser für die Achsenbildung übernommen wurde, diese Funktion an sich also ein abgeleitetes Merkmal darstellt (Lall und Patel, 2001). Diese Annahme wird unterstützt durch die Feststellung, dass die Faktoren, die intrazellulär im frühen Embryo für die Weiterleitung des ventralen Signals benötigt werden (Toll, Pelle, Cactus und Dorsal) – mit Ausnahme von Tube – innerhalb der gesamten holometabolen Insekten deutlich höher konserviert sind, als die Faktoren, die für die Produktion aktiven Spätzles benötigt werden. Dass Tube eine Ausnahme darstellt, lässt sich damit erklären, dass Tube offensichtlich eine Insekten spezifische Errungenschaft darstellt, denn Homologe von Tube konnten außerhalb der Insekten nicht isoliert werden. Statt dessen existieren in der Toll Immunkaskade der Säuger drei andere, zu Myd88 ähnliche Adapter-

proteine (O'Neill, 2003). Dies lässt auf eine vergleichsweise hohe Geschwindigkeit der Sequenzevolution von Tube schließen.

Aus *Anopheles* lässt sich im Gegensatz zu *Drosophila* kein Homolog des zweiten Rel-Faktors Dif isolieren (Christophides *et al.*, 2002). Dies deutet darauf hin, dass hier Dorsal einen größeren Anteil an der Immunantwort hat, als dies in *Drosophila* der Fall ist, wo Dif, nicht aber Dorsal für die Abwehr von Pilzen und gram-positiven Bakterien benötigt wird (Lemaitre *et al.*, 1995). Dem gegenüber ist Dif in *Drosophila* in der Lage, in Abwesenheit von Dorsal Elemente des dorsoventralen Musters in Abhängigkeit von der Aktivität der Toll-Signalkaskade zu spezifizieren (Stein *et al.*, 1998). Dies deutet auf eine Duplikation des Dorsal-Gens nach Abspaltung der Nematocera von den Brachycera und die Entstehung des dritten $\text{Nf-}\kappa\text{B}$ ähnlichen Proteins Dif, neben Relish und Dorsal, hin.

Für Toll hingegen wurden in *Drosophila melanogaster* mittlerweile insgesamt 9 verschiedene Proteine gefunden, in *Anopheles* dagegen 11, von denen nur vier in *Drosophila* ein eindeutiges Ortholog besitzen (Christophides *et al.* 2002). So findet sich für DmToll2, -3 und -4 kein Homolog in *Anopheles*, während Toll-1 und -5 in *Anopheles* jeweils dupliziert vorliegen. Da jedoch für die weiteren an der Immunantwort beteiligten Komponenten des Toll-Signalweges (Tube, Pelle, Cactus, Dorsal) nur je ein Homolog vorhanden ist (Christophides *et al.*, 2002 und eigene Beobachtung) lässt sich vermuten, dass die zusätzlichen Toll-Rezeptoren entstanden sind in Antwort auf die im Vergleich zu *Drosophila* veränderten ökologischen Bedingungen, die auch in einer veränderten Pathogen Herausforderung münden, da von *Anopheles* andere Pathogene erkannt werden müssen als von *Drosophila* und um die Immunantwort auf diese Pathogene auszudehnen. Andererseits ist eine tatsächliche Rolle dieser Proteinfamilie in der Immunabwehr bislang ausschließlich für Toll1 in *Drosophila* mit Sicherheit nachgewiesen worden (Lemaitre *et al.*, 1996; 1997).

Erstaunlicherweise lässt sich das Ortholog zu DmSpätzle1 nur in der Sequenz von *Drosophila pseudoobscura* identifizieren, während bereits in den niederen Dipteren (*Anopheles*) ein direktes Ortholog nicht zu finden ist. Jedoch finden sich in *D. melanogaster* eine Familie von insgesamt wenigstens 6 verschiedenen Spätzle-ähnlichen Proteinen (Parker *et al.*, 2001). Da sich in *Anopheles* noch für vier dieser sechs Spätzles Orthologe finden lassen, in *Apis* jedoch noch maximal 2 (die Beziehung von einem dieser beiden möglichen Spätzles zu den *Drosophila* Homologen konnte nicht eindeutig geklärt werden), zeigt sich, dass diese Familie der Spätzle Proteine offensichtlich in Dipteren eine beschleunigte Evolutionsrate erfahren hat. Somit erscheint es möglich, dass in den niederen Insekten wie Hymenopteren und niederen Dipteren die Funktion von DmSpätzle1 als ventralisierender Ligand des Toll-Rezeptors in der

Ausbildung der embryonalen DV-Achse noch von einem anderen Mitglied der Spätzle Familie ausgeübt wurde und in Folge einer Duplikation eines Spätzle-Gens vor der Trennung von *Drosophila pseudoobscura* und *D. melanogaster* eine neue Isoform die ventralisierende Funktion übernommen hat. Jedoch muss gesagt werden, dass für keines der Spätzle-ähnlichen Faktoren mit Ausnahme von DmSpätzle1 eine ventralisierende Funktion gezeigt wurde.

Nicht in diesem Vergleich enthalten ist eine Gegenüberstellung der regulatorischen Sequenzen der betreffenden Genloci, da dies mit den zur Verfügung stehenden Methoden nur unzureichende Schlüsse erlaubt, auch wenn postuliert wurde, dass in der Evolution der Regulation von Genen und somit der Evolution der cis-regulatorischen Sequenzen bei der Entwicklung neuer Baupläne besondere Bedeutung zukommt (Tautz, 2000).

1.6 Zielsetzung der Arbeit

Im Gegensatz zur AP-Achse sind die Grundlagen der Etablierung der dorsoventralen Achse bei niederen Insekten weitgehend unverstanden. Es existieren jedoch Hinweise für die Beteiligung der für *Drosophila* beschriebenen Toll-Dorsal Signalwege in der Achsenpolarisierung während der frühen Embryonalentwicklung in *Tribolium*: So wurde ein Ortholog des Toll-Rezeptor aus *Tribolium* identifiziert (Maxton-Küchenmeister *et al.*, 1999), das passend zur räumlich begrenzten Aktivierung von Toll in *Drosophila* eine räumlich begrenzte Expression aufweist. Funktionelle Studien haben ergeben, dass dieser Toll-Rezeptor tatsächlich zur Etablierung einer korrekten DV-Achse in *Tribolium* benötigt wird (Basal, 2004).

Gleichfalls wurde ein Homolog des Nf- κ B Faktors Dorsal in *Tribolium* (TcDorsal) isoliert, der wie sein *Drosophila*-Homolog einen Kerngradienten entlang der dorsoventralen Achse im Blastodermstadium des *Tribolium* Embryos mit den höchsten Konzentrationen auf der prospektiven ventralen Seite des Embryos ausbildet (Chen *et al.*, 2000, Abb 1.1). Die Region der höchsten Kernkonzentrationen überlappt mit den Expressionsdomänen von *Tctwist* und *Tcsnail*, beides potentielle Zielgene des TcDorsal-Gradienten (Sommer und Tautz, 1994; Chen *et al.*, 2000).



Abb 1.2: Expression von TcDorsal in frühen Embryonen, sichtbar gemacht durch anti-TcDorsal Antikörperfärbung. Aufeinanderfolgende Stadien zeigen eine Verfeinerung des anfänglich breiten Kerngradienten in einen schmalen Gradienten von ca. 4-6 Kernen zwischen höchsten und niedrigen Kernkonzentrationen von TcDorsal. Abb. nach Chen *et al.*, 2000; modifiziert.

In dieser Arbeit sollte mittels parentaler RNAi-Technik (Bucher *et al.*, 2002) untersucht werden, in wie weit TcDorsal an der Etablierung der DV-Achse des *Tribolium* Embryos beteiligt ist. Hierzu sollte der Phänotyp von Embryonen von *Tcdorsal* dsRNA injizierten weiblichen Puppen in Bezug auf Morphologie und Veränderungen verschiedener Zellschicksale anhand geeigneter Marker analysiert werden. Auch die Expression potentieller Zielgene von TcDorsal sollte eingehend untersucht werden. Kandidaten solcher Zielgene sind neben den oben erwähnten ventral exprimierten Gene *twist* und *snail*, unter anderen die aus *Tribolium* identifizierten und klonierten Homologe der in *Drosophila* dorsal exprimierten *dpp* und *zen* (Sanchez-Salazar, 1996; Falciani *et al.*, 1996) sowie das in *Drosophila* in lateralen Streifen exprimierte, für ein Chordin-ähnliches Protein kodierende, Gen *short gastrulation* (Stockhammer, 2003). Daneben wurde ein Homolog des cytoplasmatischen Inhibitors von Dorsal, Cactus, aus *Tribolium* isoliert und dessen Expression mittels *in situ* Hybridisierung analysiert. Des weiteren wurde durch Analyse der Oogenese in *Tribolium* sowie der niederen Diptere *Anopheles gambiae* nach Hinweisen gesucht, ob die Etablierung der DV-Achse in diesen Organismen ebenfalls während der Oogenese bereits initialisiert wird. Hierzu wurde die Lokalisation des Oozytenkerns im Verlauf der Oogenese untersucht. Aus *Anopheles* und *Tribolium* wurde jeweils ein Homolog des *Drosophila* Gens *pipe* isoliert, deren Sequenz und Verteilung der Transkripte während der Oogenese untersucht wurde.

2 Material und Methoden

2.1 Haltung und Aufzucht von *Tribolium castaneum*

Die Haltung von *Tribolium castaneum* (Tenebrionidae, Coleoptera) erfolgte im wesentlichen wie bei Berghammer *et al.* (1999b) beschrieben. Käfer wurden in Plastikgefäßen auf Weizenmehl (Type 405), versetzt mit 5 % Bäckerhefe gehalten. Die Temperatur betrug je nach Versuch 25°C bis 30°C. Zur Gewinnung von Nachkommen bzw. Wildtyp-Embryonen wurden die Käfer auf Instant-Mehl (Type 405) übertragen und für 8-48 Stunden bei 30°C belassen. Zur Vermeidung von Krankheiten wurde das Mehl vor Verwendung mit *Fumidil B* (*Sanoti, Frankreich*) versetzt (500mg/kg).

2.2 Präparation von *Anopheles*- und *Tribolium*-Ovarien

Weibchen von *Anopheles gambiae* wurden freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Stephanie Blandin aus der Arbeitsgruppe von Fotis Kafatos am EMBL in Heidelberg. Diesen Weibchen wurde zur Induktion der Vitellogenese erlaubt, für 45 min. Blut einer narkotisierten Maus zu saugen. Anschließend wurden die Weibchen für 48 h in einem Pappbecher bei 28°C und einer Luftfeuchtigkeit von 70% inkubiert.

Nach jeweils 150-180 min wurden 6-8 Weibchen entnommen, in eine Petrischale auf Eis überführt und mit Pinzetten die Ovarien samt Ovidukten aus den Weibchen herausgezogen und von umliegendem Gewebe frei präpariert. Die frei präparierten Ovarien wurden direkt in PBST überführt und anschließend fixiert (2.6.3).

Um Ovarien aus *Tribolium* Weibchen zu isolieren, wurden aus einer Wildtyp-Kolonie zufällig Käfer ausgewählt und in eine Petrischale auf Eis überführt. Anschließend wurde das restliche Mehl abgewaschen und die Weibchen durch die Abwesenheit der Borstenbüschel am ersten Beinpaar identifiziert. Diese Weibchen wurden in eine neue, mit 4% Paraformaldehyd (PFA) in PBST gefüllte Schale auf Eis überführt und dort zunächst die Flügel abgezogen, die dorsale Kutikula geöffnet und die Ovarien samt Ovidukten frei präpariert und in einem Reaktionsgefäß, gefüllt mit 4% PFA in PBST gesammelt und anschließend weiter fixiert (2.6.3).

2.3 Molekularbiologische Arbeiten

2.3.1 Bakterienstämme und Vektoren

DH10B: (*GIBCO, BRL*) Dieser Stamm wurde für die Klonierung von pBluescript Konstrukten verwendet.

Genotyp: F⁻, *mcrA* Δ(*mrr-hsdRMS-mcrBC*), Φ80*lacZ*ΔM15, Δ*lacX74*, *endA1*, *recA1*, *deoR* Δ(*ara,leu*)₇₆₉₇, *araD139*, *galU*, λ⁻, *galK*, *nupG*, *rpsL*

TOP 10: Dieser Bakterienstamm wurde primär zur Klonierung von PCR-Fragmenten in den pCR2.1 Vektor verwendet.

Genotyp: F⁻ *mcrA* Δ(*mrr-hsdRMS-mcrBC*) Φ80*lacZ*ΔM15 Δ*lacX74* *recA1* *deoR* *araD139* Δ(*ara-leu*)₇₆₉₇ *galU* *galK* *rpsL* (Str^R) *endA1nupG*

pBluescript® II KS [SK]: Für allgemeine Klonierungen, insbesondere als Vektor für die Klonierung von DNA-Fragmenten zur Synthese von Hybridisierungssonden und dsRNA, wurden die KS+- oder SK+-Variante des pBluescript II Vektors (*Stratagene*) eingesetzt.

Genotyp: *ampR*, ColE1-ori, *lacI*, *lacZ'*, T3-Promotor - *multi cloning site* ([*SacI*...*KpnI*] [*KpnI*...*SacI*]) - T7-Promotor

pCR 2.1-TOPO: Der Vektor wurde verwendet um amplifizierte PCR-Produkte zu klonieren. Er ist Teil des *TOPO TA Cloning® Kits* der Firma *Invitrogen* (Kalifornien, USA)

Genotyp: *lacZ'*, f1 ori, *kanR*, *ampR*, *lacI*, *puc* ori Plac, M13-reverse Promotor - *multi cloning site* (*Hind3-ApaI*), T7-Promotor - M13-forward Promotor

2.3.2 Häufig verwendete Chemikalien

DEPC-H ₂ O	0,1% DEPC (Diethylpyrocarbonat) in H ₂ O	über Nacht bei 37°C inkubieren, anschließend autoklavieren
tRNA	20mg/ml tRNA aus Bäckerhefe (<i>Roche, Mannheim</i>)	
Chlorix	Chlorbleiche (Natriumhypochlorid) 1:1 in Wasser	
PEMS	0,1M Pipes 2mM MgSO ₄ 1mM EDTA	pH mit NaOH auf 6,9 einstellen
Proteinase K	50µg/ml (Vorratslösung 5mg/ml, 1:100 in PBST)	
SSC 20-fach	150mM NaCl 15mM Natriumcitrat	pH7, autoklavieren

Hybridisierungslösung (Hyb I)	5x SSC 50% Formamid 1µl/ml Heparin 0,2% Tween20	in DEPC-H ₂ O
Hybridisierungslösung / DNA (Hyb II)	Hybridisierungslösung mit 100µg/ml Lachsspermien DNA	
RNA-AP-Puffer	100mM NaCl 50mM MgCl ₂ 100mM Tris, pH9,5 0,2% Tween20	Immer direkt vor Verwendung ansetzen
NBT	75mg/ml in 70% DMF	
X-Phosphat	50mg/ml 5-Brom-4-chloro-3-indolyl-phosphat in DMF	
AP-Färbelösung	2,2 µl NBT 1,7 µl X-Phosphat in 500µl RNA-AP Puffer	
LB-Medium:	1 % (w/v) Bactotrypton 0.5 % Hefeextrakt 0.5 % NaCl	pH 7.5, autoklavieren
LB-Agar:	LB-Medium mit 1,5-2 % (w/v) Bactoagar	autoklavieren
LB-Platten [amp/X-gal]	LB-Agar mit 400µl Ampicillin (50mg/ml) 256µl X-gal (10%)	Ampicillin + X-gal erst zugeben, nachdem LB-Medium auf max. 50°C abgekühlt ist.
Ampicillin:	Stocklösung 25 mg/ml	steril filtrieren
10 x TBE:	890mM Tris 890mM Borsäure 25mM EDTA	pH8,0
Gel-Ladepuffer	0,25% Bromphenol 0,25% Xylan 15% Ficoll	
TE:	10 mM Tris/HCl, pH 8.0 1 mM EDTA	autoklavieren
1x PBS:	130 mM NaCl 7 mM Na ₂ HPO ₄ 3 mM NaH ₂ PO ₄	In DEPC-H ₂ O pH7,4 mit HCl einstellen
1x PBT:	0,1% Triton in 1x PBS	
1x PBST	0,2% Tween 20 in 1x PBS	
Phenol/Chlorofom:	1:1 (v/v) mischen	4 min bei 4000Upm zentrifugieren

Alle Lösungen und Medien wurden in dest. H₂O (*Milli-Q Water Purification System, Millipore, Eschborn*) angesetzt.

2.3.3 Oligonukleotide

Alle verwendeten Oligonukleotide wurden von den Firmen *Sigma* oder *Eurogentec* bezogen, mit Ausnahme der M13 reverse und M13 forward Primer, welche aus dem TOPO TA Cloning Kit von *Invitrogen* stammen.

Tab. 2.1: Verwendete Oligonukleotide

Bezeichnung	Verwendung	Sequenz (5'-3')	Bemerkung
M13 reverse	Sequenzierung	CAGGAAACAGCTATGAC	TOPO Kit, Invitrogen
M13 forward	Sequenzierung	GTAAAAACGACGGCCAG	TOPO Kit, Invitrogen
pBS-E primer	PCR	TGACCCTTTTGGGACCGCAAT	f. pBluescript Vektor
pBS-A primer	PCR	CTATGACCATGATTACGCCAAG	f. pBluescript Vektor
T7-T3 primer	PCR	TAATACGACTCACTATAGGAATTAACC CTCACTAAAGGG	f. dsRNA Transkription
T7-Sp6 primer	PCR	TAATACGACTCACTATAGGATTTAGGT GACACTATAGA	f. dsRNA Transkription
T3 primer	PCR	ATTAACCCTCACTAAAGGGA	
T7 primer	PCR	TAATACGACTCACTATAGGG	
Anopip5	PCR	GCGACGGAGCTGAACAACACG	<i>Agpipe</i>
Anopip3	PCR	CAGCGGCAGATCGGGGAAGG	<i>Agpipe</i>
AnoEGF5	PCR	CAAGAAATGCCCGTAATA	<i>AgEGF</i>
AnoEGF3	PCR	GTAAAGCGAACGACCACCAG	<i>AgEGF</i>
Tccazyg-fw	PCR	CGACCCACGCGTCCGGACTCTATGC	<i>Tccactus</i>
Tccterm-rev	PCR	TGGAGGGCGCTGTTTCCACCGT	<i>Tccactus</i>
Tcpipew	PCR	CAAGTAAATAACACCCTGAAAGCACA	<i>Tcpipe</i>
Tcpipere	PCR	TGGCCACAGAAAAACATAGATTGAC	<i>Tcpipe</i>

2.3.4 Enzyme

Alle verwendeten Enzyme stammen von der Firma *Roche* (Mannheim) oder der Firma *Invitrogen* (Karlsruhe). Der Gebrauch erfolgte nach den Angaben des Herstellers unter Verwendung der angebotenen 10x Puffer.

2.3.5 Verwendete Antikörper

Für Antikörperfärbungen sowie zur Detektion Digoxigenin-markierter RNA-Sonden wurden folgende Antikörper verwendet:

Tab 2.2: Verwendete Antikörper

Mouse-anti-en 4D9	1:1	Patel <i>et al.</i> , 1989
Rabbit-anti-eve 2B8	1:10	Patel <i>et al.</i> , 1994
Mouse-anti-phosphoTyrosin	1:400	
Mouse-anti-acetyliertes Tubulin	1 :500	<i>Cell Signalling</i>
Mouse-anti-Digoxigenin, AP konjugiert, Fab Fragmente	1 :500	<i>Dianova, Hamburg</i>
Horse-anti-mouse, Biotin konjugiert	1 :600	<i>Vector Laboratories</i>
Goat-anti-rabbit, Biotin konjugiert	1 :1000	<i>Vector Laboratories</i>
Rabbit-anti-mouse, Alexa488 konjugiert	1 :400	
Goat-anti-mouse, Alexa 488 konjugiert	1 :400	

2.3.6 DNA-Präparationen

Zur Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterienkulturen wurde je nach der gewünschten DNA-Menge unterschiedliche Verfahren angewendet:

2.3.6.1 Plasmid-Minipräparation

Zur Isolierung geringer Mengen von Plasmid-DNA wurde das *QIAprep[®] Spin Miniprep* Säulen-Kit der Firma *Qiagen (Hilden)* verwendet. Eingesetzt wurden jeweils 1,5ml einer 3ml Übernachts-Bakterienkultur. Das Protokoll des Herstellers wurde befolgt. Die DNA wurde anschließend in 50µl Elutionspuffer aufgenommen und die Konzentration der DNA-Lösung bestimmt.

2.3.6.2 Plasmid-Midipräparation

Zur Isolierung größerer Plasmidmengen wurden 50ml Kulturen über Nacht angesetzt. Am nächsten Tag wurde die Plasmidpräparation mit der gesamten Kultur unter Verwendung des *Qiagen Plasmid[®] Midiprep Kit (Qiagen)* oder zur Elution einer höheren DNA-Menge mit dem *Genelute HP Midiprep Kit (Sigma)* nach den Anweisungen des Herstellers durchgeführt.

2.3.7 Schneiden von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen (*Invitrogen, Roche*) ermöglichen es, aufgrund spezifischer Erkennungssequenzen, DNA an definierten Stellen zu spalten. Für analytische Zwecke wurde folgender Standard-Ansatz verwendet:

- 1-2µg DNA
- 2µl 10x Puffer
- 3-4 U (Units) Restriktionsenzym pro µg DNA
- Mit H₂O auf ein geeignetes Volumen auffüllen (Standard: 20µl)
- 1-2 h bei 37°C inkubieren (in Ausnahmefällen bei einer abweichenden, vom Hersteller vorgegebenen Temperatur)
- Analyse der DNA durch Auftrennen in Agarosegelen

2.3.7.1 Schneiden von DNA zur Isolierung von DNA-Fragmenten

Das Volumen des Restriktionsansatzes richtet sich nach der Konzentration, in der die DNA in der Lösung vorliegt. Das Volumen des Restriktionsenzym sollte 1/10 des Gesamtansatzes nicht überschreiten.

- 5-30µg DNA
- 1/10 Volumen 10x Puffer
- 3-4 U Restriktionsenzym pro µg DNA
- Mit TE auf gewünschtes Volumen auffüllen
- 1 h bei 37°C inkubieren, nach 30 min Zugabe von weiteren 2-3 U Restriktionsenzym / µg DNA
- Auftrennen der DNA in Agarosegelen und Isolierung der Fragmente
- Reinigung der DNA durch Phenolisierung (2.3.10)

2.3.8 Größenseparation von DNA-Fragmenten durch Auftrennung in Agarosegelen

Das Auftrennen von DNA-Fragmenten erfolgte in Agarosegelen. Je nach Länge der aufzutrennenden Fragmente wurden horizontale Gele mit 0.7-1.5% (w/v) Agarose in 1x TBE-Laufpuffer aufgekocht und nach Zugabe von 0.1µg/ml Ethidiumbromid gegossen. Die Auftrennung erfolgte bei 3-10 V/cm in 1x TBE-Puffer. Zur Größenbestimmung diente der Vergleich mit definierten Größenstandards (λ /*HindIII* oder *1kb Leiter, Invitrogen*). Die DNA-Proben wurden vor dem Auftragen mit 10x Auftragspuffer versetzt.

2.3.9 Isolierung von DNA-Fragmenten

Für das Auftrennen von DNA-Fragmenten aus Restriktionsanalysen wurde grundsätzlich die präparative Gelelektrophorese verwendet. Diese erlaubt eine Isolierung kleiner DNA-Mengen, ermöglicht aber eine relativ kurze Versuchsdauer bei einer hohen Genauigkeit der Größenauftrennung der DNA-Fragmente.

Zur Abtrennung nicht inkorporierter Nukleotide aus PCR-Ansätzen wurden die PCR-Produkte direkt mit Hilfe des *GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (Amersham Biosciences) aufgereinigt.

2.3.9.1 Präparative Gelelektrophorese

Die DNA-Fragmente wurden in einem 1.0-1.2% Agarosegel aufgetrennt, die gesuchte Bande unter UV-Licht ausgeschnitten und das Gelstück in ein Reaktionsgefäß überführt. Die Isolierung und Reinigung der DNA erfolgte mit Hilfe des *GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (Amersham Biosciences). Die Angaben des Herstellers wurden befolgt. Die gereinigte DNA wurde anschließend in einem geeigneten Volumen TE-Puffer oder H₂O aufgenommen.

2.3.10 Phenol/Chloroform-Extraktion

Diese Methode beruht auf dem unterschiedlichen Lösungsverhalten von Proteinen und Nukleinsäuren in wässrigen bzw. organischen Lösungsmitteln. Phenol denaturiert durch hydrophobe Wechselwirkungen die in Lösung befindlichen Proteine, während die DNA sich in der wässrigen Phase sammelt. Zu einer DNA Lösung gibt man 1 Vol. Phenol/Chloroform Gemisch und mischt leicht. Der Ansatz wird zur Phasentrennung 5 min bei 14.000 Upm zentrifugiert. Die obere Phase wird in ein neues Reaktionsgefäß überführt und 1 Vol. Phenol/Chloroform (1:1) addiert und durch Schütteln gemischt. Zur erneuten Phasentrennung wird 5 min bei 14.000 Upm zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wird in ein neues Reaktionsgefäß überführt, 1 Vol. Chloroform zugegeben und 2 min bei 14.000 Upm zentrifugiert. Die obere Phase wird wiederum in ein neues Reaktionsgefäß überführt und anschließend wie unter **2.3.11** beschrieben präzipitiert.

2.3.11 Ethanolfällung

- Zugabe von 1/10 Vol. 3 M NaAc und 2.5 Vol. EtOH_{abs.}, gut vortexen
- ggf. für 30 min bei -20°C inkubieren
- 30 min bei 13.000 Upm zentrifugieren (*Zentrifuge 5417C, Eppendorf*).
- Überstand absaugen und ein Vol. 70% EtOH hinzugeben
- 10 min zentrifugieren bei 13.000 rpm
- Überstand absaugen, Pellet trocknen (Waschschritte gegebenenfalls wiederholen)
- DNA in geeigneter Menge TE oder H₂O aufnehmen

In Fällen, in denen das Volumen der Ausgangslösung zu groß war, wurde statt mit EtOH mit ein Volumen 2-Propanol und 1/10 Vol. 8M KAc gefällt.

2.3.12 Dephosphorylierung von 5'-Enden

Bei symmetrischen Ligationen von kohäsiven, überstehenden Enden (*sticky end*-Ligationen) oder Ligationen von Fragmenten mit glatten Enden (*blunt end*-Ligationen) kann es zu einem Ringschluss des geschnittenen Vektors kommen, ohne dass ein Fragment eingebaut wird. Da die verwendete Ligase als Substrat freie 5'-Phosphatgruppen braucht, werden diese bei den oben genannten Ligationstypen durch eine Behandlung mit alkalischer Phosphatase (CIP: *calf intestine alkaline phosphatase; Roche*) entfernt. Die für die Ligation benötigte Phosphatgruppe wird dann von dem Insertionsfragment zur Verfügung gestellt.

Dephosphorylierung von überhängenden Enden:

- 0.1 U CIP pro pMol 5'-Enden und 30 min bei 37 °C inkubieren
- Zugabe von 0.1 U CIP pro pMol 5'-Enden und weitere 30 min bei 37 °C inkubieren

Das Enzym wird nach der Reaktion durch Phenolisierung (2.3.10) von der DNA entfernt.

2.3.13 Ligation

Für Ligationen wurden gewöhnlich 100ng geschnittener Vektor und ein 3-facher molarer Überschuss des Fragments, das ligiert werden soll, eingesetzt.

- 100ng Vektor
- Insertionsfragment
- 6µl 5x Ligationspuffer (*Roche*)
- 1 U T4-Ligase (*Roche*)
- ad 30µl TE
- Inkubation bei RT über Nacht

2.3.14 Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Konzentration von DNA kann mittels Gelelektrophorese durch Vergleich der Bandenintensität mit der von Fragmenten bekannter Menge abgeschätzt werden (λ /*HindIII*, *Ikb Leiter*). Als zweite Methode zur Konzentrationsbestimmung wird die Tatsache genutzt, dass Nukleinsäuren eine starke Absorption im UV-Spektrum bei einer Wellenlänge von 260 nm aufweisen. Die Konzentration wird photometrisch bestimmt, wobei eine geeignete Verdünnung der DNA hergestellt und die Extinktion bei $\lambda = 260$ nm gemessen wird.

Es gilt:

- doppelsträngige DNA: 1 E₂₆₀ = 50 µg/ml
- einzelsträngige DNA: 1 E₂₆₀ = 40 µg/ml
- freie Nukleotide: 1 E₂₆₀ = 30 µg/ml

2.3.15 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR diente in dieser Arbeit für verschiedene Versuche. Zum einen wurden aus *Anopheles gambiae* PCR-Fragmente von Homologen der *Drosophila* Gene *pipe* und *gurken* bzw. *spitz*, sowie aus *Tribolium castaneum* die Homolog zu *Dmcaactus* und *Dmpipe* amplifiziert, deren Sequenz aus Datenbanksuchen isoliert wurde. Genomische wie auch Gesamt-cDNA von *Anopheles gambiae* wurde hierfür als Matrize freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Fotis Kafatos (EMBL, Heidelberg). Gesamt-cDNA von *Tribolium castaneum* wurde mit Hilfe des *Cloned AMV First-Strand Synthesis Kit* der Firma *Invitrogen* hergestellt. Das Protokoll des Herstellers wurde befolgt.

Zur Herstellung von DNA-Matrizen zur *in vitro* Transkription von einzel- (ssRNA) oder doppelsträngiger (dsRNA) RNA wurden die gewünschten Inserts bzw. Gen-Bereiche aus dem jeweiligen pBluescript oder pCR2.1 Konstrukt amplifiziert. Um aus diesem Vektor in einem Schritt RNA Transkripte beider Orientierung synthetisieren zu können, wurde für die dsRNA Transkription ein spezifischer Primer für die Region des T7-RNA Polymerase Promoters verwendet, sowie ein Primer, der spezifisch an die Sequenz des T3- oder SP6-RNA Polymerase Promoters bindet und an diese eine weitere Bindestellen-Sequenz für die T7-RNA Polymerase anhängt (vgl. 2.3.17).

2.3.15.1 PCR-Reaktion

Für die PCR wurde je 0,5µl präparierter Plasmid-DNA bzw. der genomischen oder cDNA aus *Anopheles gambiae* bzw. *Tribolium castaneum* eingesetzt. Die Ansätze umfassten ein Volumen von insgesamt 25µl. Die Reaktionsansätze setzten sich aus folgenden Komponenten zusammen:

- 1x Reaktionspuffer
- 0,5µM je Primer
- 0,2mM dNTPs
- 100-300ng Matrizen-DNA
- 2 U Red Taq-Polymerase oder 1x Adv 2 Polymerase
- ad 25µl H₂O

Das Reaktionsgemisch wurde auf Eis jeweils in 0,2ml Reaktionsgefäße vorgelegt, anschließend wurde die Matrizen-DNA hinzu pipettiert.

Für Standard-PCR Reaktionen wurde die *REDTaqTM Taq-Polymerase* und der zugehörige *REDTaqTM ReadyMixTM PCR Reaction Mix (Sigma)* verwendet. In diesem liegen sowohl die Polymerase, als auch die dNTPs bereits in geeigneter Konzentration in einem 2x Reaktionspuffer vor.

Zur Amplifikation geeigneter Templates zur *in vitro* Transkription wurde die *Advantage 2 Polymerase* der Firma *BDM Biosciences* benutzt. Die Angaben des Hersteller wurden jeweils befolgt. Die Reaktionen wurden in einem *Mastercycler Gradient* der Firma *Eppendorf* (Hamburg) durchgeführt. Die verwendeten Primer sind unter (2.3.4) aufgeführt.

Es wurden folgende PCR-Programme verwendet:

Für die Amplifikation von Transkriptionsmatrizen:

Initiale Denaturierung:	95°C für 2 min
Zyklus (34x):	
Denaturierung:	94°C für 50 sec
Hybridisierung:	58°C für 55 sec
Extension:	72°C für 1:20 min
Finale Verlängerung:	72°C für 8 min
	4°C

Für die Isolierung von *Agpipe*, *AgEGF*, *Tcpipe* und *Tccactus*:

Initiale Denaturierung: 95°C für 2 min

1. Zyklus (3x):

Denaturierung: 95°C für 50 sec

Hybridisierung: 53°C für 45 sec

Extension: 72°C für 1 min

2. Zyklus (33x):

Denaturierung: 95°C für 50 sec

Hybridisierung: 60°C für 1 min

Extension: 72°C für 1 min

Finale Verlängerung: 72°C für 5 min
4°C

Bei diesem Programm wurden die Länge und die Temperatur der Hybridisierungsschritte den jeweils verwendeten Primern (siehe **2.3.3**) angepasst.

2.3.16 Herstellung von Digoxigenin-markierten RNA-Sonden

Zur Herstellung von Sonden zur *in situ* Hybridisierung wurde im ersten Schritt das Plasmid mit entsprechendem DNA-Fragment linearisiert und gefällt. Alternativ wurde das entsprechende Fragment mittels PCR-Reaktion amplifiziert und anschließend aufgereinigt (**2.3.9**). Für die anschließende *in vitro* Transkription wurde folgender Reaktionsmix angesetzt:

4µl 5x RNA-Polymerase-Puffer (*Roche, Mannheim*)

2µl Digoxigenin NTP Mix (*Roche, Mannheim*)

1µl RNase Inhibitor (*Roche, Mannheim*)

500ng-1µg linearisiertes Plasmid

2µl T3 oder T7 Polymerase (*Roche, Mannheim*)

Das Reaktionsgemisch wurde mit DEPC behandeltem Wasser auf 20µl aufgefüllt und 2 h bei 37°C inkubiert. Danach wurde die Lösung zum Abbau des Templates 10 min mit RNase freier DNase behandelt. Die eine Hälfte der RNA wurde anschließend mit 190µl H₂O (DEPC), 5µl tRNA (20µg/ml) und 45µl LiCl gemischt und bei -20°C gelagert. Die restliche RNA wurde hydrolysiert. Hierzu gibt man zu 10µl RNA 40µl H₂O sowie 50µl 2x Carbonat-

Puffer und inkubiert für 40 min bei 70°C. Die Reaktion wird mit 100µl Stopplösung, 5µl tRNA und 45µl 0,4M LiCl abgestoppt. Die beiden RNA-Sonden werden dann mit 500µl 100% EtOH für 10 min bei -20°C präzipitiert und anschließend 10min bei 14.000 Upm zentrifugiert. Das Pellet wird 2x mit je 500µl 70% EtOH gewaschen und erneut für je 10 min bei 14.000 Upm zentrifugiert. Danach wird die RNA-Sonde in 50µl Hybridisierungslösung II aufgenommen.

2.3.17 Synthese doppelsträngiger RNA (dsRNA)

Als Ausgangspunkt zur Synthese von *Tcdorsal* dsRNA diente ein 2.1kb großes PCR-Fragment, welches aus dem Insert des pblueTcdl2.2 Konstruktes (Chen *et al.*, 2000) amplifiziert wurde. Für die Synthese von *Tccactus* dsRNA wurde als Ausgangskonstrukt die isolierte, partielle cDNA von *Tccactus* verwendet (Sequenz siehe Anhang, 6.4). Dieses Fragment wurde mittels Standard-PCR unter der Verwendung der Primer pBSE und T7-T3 amplifiziert. Auf diese Weise erhält man für die anschließende *in vitro* Transkription eine DNA Template mit T7-Promoter-Sequenzen an den 5' Enden beider Stränge.

Tcdorsal dsRNA wurde anschließend mit dem *MEGAscriptTM RNAi Kit* von *Ambion* synthetisiert. Die Dauer der Transkription betrug 2h 30min. Des weiteren wurden die Angaben des Herstellers befolgt.

Im Anschluss an die Elution wurden Konzentration und die Gesamtmenge an dsRNA bestimmt und diese mit 3 Vol. 100% EtOH und 1/2 Vol. 7,8M NH₄Cl für 90 min bei -20°C gefällt. Sodann wurde der Ansatz für 30 min bei 14.000 rpm in der Kühlzentrifuge (5417R, Eppendorf, 4°C) zentrifugiert, anschließend einmal mit 70% EtOH gewaschen und nach erneuter Zentrifugation in einem geeigneten Volumen Injektionspuffer aufgenommen und bei -20°C gelagert.

- dsRNA Injektionspuffer: 200mM KH₂PO₄, 30mM NaCitrat in DEPC-H₂O, mit KOH auf pH 7.5 einstellen (nach Montgomery *et al.*, 1998)

2.3.18 Herstellung transformationskompetenter *E.coli* Bakterien

- Ca. 1 l LB-Medium mit einer kleinen Menge Bakterien animpfen, über Nacht bei 37° C unter Schütteln hochwachsen lassen, bis die OD₆₀₀ 0.5 erreicht
- Kolben 15-30 min in Eiswasser kühlen, dabei Kolben mehrmals schwenken
- Pelletieren der Zellen durch 15 min Zentrifugieren bei 4.000 rpm in vorgekühlter Zentrifuge
- Zell-Pellet in 1l eiskaltem, sterilem H₂O resuspendieren
- Zellen durch 15 min Zentrifugieren bei 4.000 rpm pelletieren

- Pellet in 500ml kaltem H₂O resuspendieren
- Zentrifugation wie oben
- Zell-Pellet in 20ml eiskaltem, sterilem 10% Glycerin resuspendieren
- Zentrifugation wie oben
- Zell-Pellet in 2ml eiskaltem, sterilem 10% Glycerin resuspendieren
- 40µl-Aliquots in Mikrozentrifugengefäße vorlegen, in flüssigem Stickstoff einfrieren, Zellen bei -70° C lagern
- Die Transformationseffizienz wird durch Transformation mit 1ng pBS DNA getestet und sollte eine Transformationsrate von 10⁸-10⁹ Transformanten pro µg DNA ergeben.

2.3.19 Bakterientransformation

Für die meisten Subklonierungen wurden *E.coli*-Zellen nach dem unter 2.3.18 angegebenen Protokoll kompetent gemacht und die Plasmide oder Ligationsansätze standardmäßig per Elektrotransformation in die Zellen transformiert.

- 30 min Auftauen der kompetenten Zellen auf Eis
- Standardmäßig wurden 4µl eines Ligationsansatzes oder 1µl einer gegebenenfalls verdünnten Plasmid-DNA zu 40µl kompetenten Bakterien pipettiert
- Elektro-Impuls wie unten beschrieben
- mit 1ml 37 °C warmem SOC-Medium überschichten, mischen, zur Induktion des Antibiotika-Resistenzgens für ca. 50 min bei 37 °C auf einem Drehrad inkubieren
- Verschiedene Verdünnungen des Ansatzes zur Selektion auf Ampicilin-haltige LB-Platten (100µg/ml) ausplattieren und ü.N. bei 37 °C inkubieren
- SOC-Medium: 2% Baktotrypton, 0,5% Hefeextrakt, 0,0 % NaCl, auf pH 7 einstellen; autoklavieren, 10mM MgCl₂ und 2mM Glucose zugeben

Für die Elektrotransformation wurde das Protokoll der Firma *Gibco BRL* (Karlsruhe) verwendet. Die Transformationen wurden mit einem *Gene Pulser* Elektroporator (*Bio-Rad*) nach Herstellerangaben bei einer Spannung von 1.8kV, einer Kapazität von 25µF und einem Widerstand von 200 Ohm in 0,2cm breiten Küvetten durchgeführt.

2.4 Sequenzierung und Verarbeitung der Sequenzdaten

Für die Sequenzreaktionen wurde das *Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction-Kit* der Firma *Perkin Elmer Corporation* verwendet. Das Modell ABI 3.77 der Firma *Perkin Elmer Corporation* wurde als automatischer Sequenzierer verwendet. Die DNA zur Sequenzierung wurde zuvor mit dem *GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (*Amersham Biosciences*) aufgereinigt.

Sequenzdaten über kodierende Sequenzen und genomische Regionen von *Drosophila melanogaster*-Genen wurden über das Internet bezogen (<http://www.fruitfly.net>; The Flybase Consortium, 1999).

Genomische DNA-Sequenzen von *Drosophila pseudoobscura*, *Anopheles gambiae*, *Apis mellifera* und *Bombyx mori* wurden über die Internetseite des NCBI (www.ncbi.nih.org/blast/Genome/Insects.html) oder über die Seite des jeweiligen Genomprojektes bezogen (www.ensembl.org/Anopheles_gambiae bzw. http://pre.ensembl.org/Apis_mellifera oder www.hgsc.bcm.tmc.edu/projects/honeybee). Nukleotidsequenzen von *Tribolium castaneum* wurden über die Webseite der Beetlebase (<http://www.bioinformatics.ksu.edu/beetlebase/>) bezogen.

Die resultierenden Sequenzdaten wurden mit Hilfe des *Lasergene/DNASTAR-Biocomputing* Software-Paketes der Firma *DNASTAR Inc.* (Madison, Wisconsin) ausgewertet. Alignments wurden mit dem Programm *MEGALIGN* des oben genannten Paketes erstellt.

Zur eingehenden Analyse der verschiedenen Pipe- und Cactus-Homologe wurden die entsprechenden Aminosäuresequenzen mit Hilfe des Programms *ClustalW* analysiert (www.ebi.ac.uk/clustalW; Higgins *et al.*, 1994) und aus den resultierenden Alignments mit dem Programm *Mega, Version 3.0* (Kumar *et al.*, 2004) ein phylogenetischer Stammbaum auf Grundlage der Neighbour-Joining Methode (NJ) erstellt.

2.5 RNA Interferenz

2.5.1 dsRNA Injektionen

Für die dsRNA Injektion werden möglichst alte weibliche Puppen (erkennbar an einer fortgeschrittenen Pigmentierung der Augen) gesammelt, zu je 15-20 Puppen auf einem Objektträger aufgereiht und an der Spitze des Abdomens mit Alleskleber (*Fixogum, Marabu*) am Objektträger befestigt. Die verwendeten Injektionsnadeln werden durch das Ausziehen von Mikrokapillaren mit Innenfilament am Nadelzieher (*Modell P-97, Sutter*) hergestellt. Die Spitze der Kapillare wird mit einer Rasierklinge geöffnet. Die wie in 2.3.17 beschrieben synthetisierte *Tcdorsal* dsRNA wird mit 1/10 Vol. 2% Phenol Rot (*Sigma P-0290*) versetzt und 0,5µl mit der Nadel aufgezogen. Danach wird die Nadel in einen Mikromanipulator eingespannt. Die Injektion erfolgt durch Druckluft, die über eine Spritze mit der Hand reguliert wird. Für die Injektion werden die mit den Puppen bestückten Objektträger auf den Objektstisch gelegt und ca. 0,1µl dsRNA mit der Injektionsnadel zwischen die Abdominalsegmente 3 und 4 injiziert. Nach erfolgter Injektion werden die Objektträger in eine mit Instant Mehl gefüllte Petrischale gelegt und in einem 30°C warmen Brutschrank inkubiert (Bucher *et al.*, 2002).

2.5.2 Aufzucht injizierter *Tribolium* Puppen

Die injizierten Puppen wurden täglich kontrolliert und geschlüpfte Weibchen gegebenenfalls mit einem weichen Pinsel vom Kleber befreit. Nach 3 Tagen wurden eventuell nicht geschlüpfte Puppen entfernt und die geschlüpften Weibchen mit einer geeigneten Anzahl an Wildtyp-Männchen gekreuzt. In den folgenden 2 Tagen werden die Käfer in Weizenmehl mit Hefe gehalten. Danach wurden die Käfer zur Eiablage bei 30°C auf Instantmehl überführt. Die im Instantmehl gelegten Eier werden gesammelt und entweder für Kutikulapräparationen oder für *in situ* Hybridisierungen und Antikörperfärbungen fixiert (2.6.2).

2.5.3 Kutikulapräparation von *Tribolium*-Larven

Die gesammelten Eier von wildtypischen oder dsRNA-injizierten Weibchen wurden für einen Zeitraum von mindestens 4 Tagen in sogenannten maturing sieves (Berghammer *et al.*, 1999b) bei 30°C inkubiert. Larven die innerhalb dieses Zeitraums schlüpfen, fallen durch das Sieb und werden so von den mutanten Embryonen getrennt. Zur Präparation der Kutikula wurden die nicht geschlüpften Embryonen zuerst dechorionisiert (2.6.1), anschließend mit einem Pinsel in Klärblocks überführt und nach Überschichtung mit einem 9:1 Milch-

säure/Ethanol Gemisch über Nacht bei 60°C geklärt. Am nächsten Tag wurden die Larven aus der Vitellinmembran frei präpariert, auf Objektträger gebracht und mit einem Tropfen Hoyers-Medium überschichtet. Die Analyse der Kutikulas erfolgte mit Hilfe eines Stereomikroskops mit Dunkelfeldfunktion (Nikon SMZ 1500).

- Hoyers Medium: 20g Glycerin, 30g Gummi arabicum, 200g Chloralhydrat, ad 50ml H₂O dest.

2.6 Histologische Methoden

Um eine ausreichende Anzahl an Embryonen für nachfolgende Experimente zu erhalten, wird eine *Tribolium* Population auf Instant Mehl übertragen und die Embryonen in den nachfolgenden 2 Tagen gesammelt. Die Käfer werden zu diesem Zweck zuerst durch das Aussieben in einem 700µm Sieb (*Retsch*) vom Mehl getrennt. Daraufhin werden die im aufgefangenen Mehl befindlichen Embryonen durch erneutes Aussieben mit einem Sieb mit kleinerer Maschengröße (300µm) vom Mehl getrennt und im folgenden Schritt dechorionisiert.

2.6.1 Dechorionisierung

Für die Entfernung des Chorions werden die Embryonen in ein Sieb mit 0,1mm Maschenweite überführt und mit Leitungswasser von Mehlpartikeln gereinigt. Die im Sieb befindlichen Embryonen werden daraufhin für ca. 3 min in einer mit 50% Chlorix-Lösung gefüllten Petrischale (*Sarstedt*) belassen und in diesem Zeitraum mehrmals unter Verwendung einer Glaspipette mit der Lösung gespült. Durch mehrfaches Waschen mit Wasser wird das Chlorix anschließend vollständig entfernt. Die Embryonen können nachfolgend fixiert werden.

2.6.2 Fixierung von Embryonen

Die Embryonen wurden mit einem feinen Pinsel in ein vorbereitetes Heptan-Fix Gemisch (5ml Heptan, 4ml PEMS, 1ml 37% Paraformaldehyd) überführt und für 25 min auf einem Drehrad geschüttelt. Die untere, wässrige Phase wurde abgenommen und das doppelte Volumen an Methanol der verbliebenen oberen Phase zugegeben. Anschließend wurden die Embryonen für 1 min kräftig geschüttelt, um die Vitellinmembran zu entfernen. Sobald die devitellinisierten Embryonen auf den Grund des Gefäßes gesunken waren, wurden diese mit Hilfe einer abgeschnittenen Pipettenspitze in ein 1,5ml Reaktionsgefäß überführt. Da vor allem ältere Embryonen oftmals in der Vitellinhülle fest hängen, wurden anschließend die Embryonen in der Interphase 2x durch eine 10ml Spritze mit einer 0,9mm Kanüle gezogen. Auch hier wurden die anschließend zu Boden sinkenden Embryonen in ein neues Reaktions-

gefäß überführt und direkt 3x mit Methanol gewaschen. Nun wurde die obere Phase und ein Großteil der Methanolphase entfernt. Danach wurden die verbliebenen Embryonen 3x mit Methanol gewaschen und anschließend per Hand devitellinisiert und für weitere Methoden weiterverwendet oder für unbestimmte Zeit bei -20°C gelagert.

2.6.3 Fixierung von Ovarien

Da die Ovarien nicht wie die Embryonen von einer Membran umgeben sind, vereinfacht sich das Fixierungsprotokoll im Vergleich zu 2.6.2: Ovarien von *Tribolium* und *Anopheles* wurden nach dem Sammeln in PBST für 30 min (*Tc*) bzw. für 1h (*Ag*) in 4% PF in PBST fixiert. Anschließend wurde das Fixativ durch 3 kurze Waschschrte in PBST und nachfolgend 3x 10 min Waschschrte in PBST entfernt. Im Anschluss wurden die Ovarien direkt für die jeweilige Methode weiter verwendet.

2.6.4 *in situ* Hybridisierung

Anhand einer *in situ* Hybridisierung in Gesamtpräparaten ist es möglich, die mRNA Verteilung eines bestimmten Gens im Gewebe räumlich und zeitlich zu verfolgen. Hierfür wurde ein modifiziertes Protokoll nach Wolff *et al.* (1995) verwendet.

in situ Hybridisierung an *Tribolium*-Embryonen

Die fixierten und in Methanol aufbewahrten Embryonen werden in 1ml MeOH/PBST (1:1) für 5min, gefolgt von 10min in PBST rehydriert. Anschließend werden die Embryonen erneut für 20 min in 1ml 4% PF/PBST fixiert. Nach der Fixierung folgen erneute Waschschrte in PBST (2x kurz und 3x 5 min). Nun werden die Embryonen für 10 min in einer 50%-igen Hybridisierungslösung (Hyb I in PBST) und im Anschluss für 10 min in 100%-iger Hybridisierungslösung inkubiert. In diesem Zustand können die Embryonen bei -20°C gelagert werden. Hiernach folgt die Prähybridisierung der Embryonen für 1h bei 55°C in Hyb II. Der Überstand wird nach Ablauf der Zeit entfernt, die RNA-Sonde zugegeben und bei 55°C über Nacht inkubiert (Sondenmix: 50 μl Hybridisierungslösung/DNA + 1-2 μl RNA-Sonde).

Am darauffolgendem Tag wird der Sondenmix abgenommen und die Embryonen 3x kurz und 4x für je 30 min mit vorgewärmter (55°C) Hybridisierungslösung I gewaschen. Die Rehydratisierung erfolgt durch jeweils 10 min waschen in einer absteigenden Reihe von Hyb I in PBST (4:1, 3:2, 2:3 bei 55°C , 1:4 bei RT).

2.6.4.1 *in situ* Hybridisierung an Ovarien

Die *in situ* Hybridisierung an Ovarien erfolgte im wesentlichen wie unter 2.6.4.1 beschrieben. Da jedoch das Follikelepithel für die meisten RNA-Sonden undurchlässig ist, wurde im Anschluss an die Rehydratisierung zur Permeabilisierung ein Protease K Verdau eingefügt (Konz: 50µg/ml; Dauer: 6 min bei RT). Im Anschluss wurde die Reaktion mit Glycin abgestoppt (Konz: 2mg/ml; 1x kurz auf Eis, 1x für 2 min bei RT). Es folgten 3 kurze Waschschrte in PBST, sowie 2 Waschrte a 10min in PBST. Im Anschluss wurden die Ovarien für 20 min in 4% PFA in PBST refixiert und anschließend mehrmals in PBST gewaschen. Es wurde weiter verfahren wie unter 2.6.4.1 beschrieben.

2.6.4.2 Detektion hybridisierter RNA-Sonden

Im Anschluss an die oben beschriebene Rehydratisierung erfolgte die Detektion der hybridisierten RNA-Sonden mittels eines anti-Digoxigenin Antikörpers (vgl. 2.3.3). Hierzu folgten zwei Inkubationsschritte in 1%BSA in PBST für jeweils 20 min bei RT zur Absättigung der unspezifischen Antikörperbindestellen und ein anschließender kurzer Waschschrte in PBST. Als nächstes wird der Antikörpermix (Anti-Digoxigenin gekoppelt an alkalische Phosphatase, 1:5000 verdünnt in PBST). Die Inkubation erfolgt über Nacht bei 4°C auf dem Rad. Es folgen 3 kurze Waschschrte und 3 von 15 min in PBST. Danach werden die Embryonen 3x 5 min mit RNA-AP Puffer äquilibriert. Während des letzten Inkubationsschrittes wird die AP-Färbelösung vorbereitet. Für die Farbreaktion werden die Embryonen in Glasschälchen überführt, der AP-Puffer abgenommen und die Färbelösung zugegeben. Der Reaktionsansatz wird durch Abdecken vor Licht geschützt. Die Farbreaktion kann mehrere Stunden dauern und sollte in regelmäßigen Abständen unter einem Stereomikroskop kontrolliert werden. Zum Stoppen der Farbreaktion wird wiederholt mit PBST gewaschen und die Embryonen anschließend in ein sauberes Reaktionsgefäß in PBST überführt. Nach der Beendigung der Färbereaktion werden die Embryonen entweder mit einem Fluoreszenz-Farbstoff gegengefärbt (2.6.7.) oder direkt in Glycerin auf einem Objektträger eingebettet.

2.6.5 Antikörperfärbung an Embryonen

Antikörperfärbungen ermöglichen die Detektion von Genexpressionen auf Proteinebene. Hierfür wird ein spezifischer Antikörper verwendet, der die einzigartigen Epitope an dem gewünschten Protein erkennt und an sie bindet. Dieser Antikörper wird mit einer zusätzlichen Erkennungsstelle ausgestattet, die die Bindung eines zweiten Antikörpers ermöglicht, an den ein Enzym gekoppelt ist. Bei Verwendung eines Peroxidase gekoppelten Antikörpers wird

nach Zugabe eines geeigneten Substrats eine von diesem Enzym katalysierte Farbreaktion an den Bindungsstellen des ersten Antikörpers verfolgt. Für modernere Verfahren existieren zweite Antikörper mit einem fluorszierenden Marker, welcher ermöglicht, spezifische Färbungen mit Hilfe eines Fluoreszenz-Mikroskopes nachzuweisen. *Tribolium* wie auch *Drosophila* Embryonen des Stammes *gd⁷* wurden nach folgendem Protokoll gefärbt. Die in dieser Arbeit verwendeten Antikörper sind unter **2.3.5** aufgeführt.

2.6.5.1 Erster Antikörper

Für die Antikörperfärbung wurden ca. 100-200 Embryonen in ein Reaktionsgefäß überführt und in 3 Schritten mit geeigneten Mischungen von Methanol und PBST rehydriert.

- 1x waschen in 50% Methanol in PBST
- 1x kurz und 1x 10 min waschen in PBST
- 1x Fixierung: 20 min in 500µl 4% PFA / PBST

Das Fixativ wird anschließend entnommen und die Embryonen 3x in PBST für 5 min gewaschen. Anschließend werden die Embryonen zum Blockieren unspezifischer Bindungsstellen 2x in 1% BSA/PBST für je 30 min gewaschen. Die BSA-Lösung wird entnommen und der jeweilige Antikörper (verdünnt in 1% BSA/PBST) zugegeben. Die Inkubation erfolgt bei leichtem Schütteln ü.N. bei 4°C. Danach werden die Embryonen 2 x kurz in PBST gewaschen und 4 x in PBST für je 30 min inkubiert.

2.6.5.2 Zweiter Antikörper

Nach der Entnahme der letzten Waschlösung wird den Embryonen, für die klassische Färbung der biotinylierte und preabsorbierte Antikörper oder für eine Fluoreszenz Färbung der entsprechend markierte zweite Antikörper (Zugabe und weiterer Ablauf der Färbung geschieht im Dunkeln) zugegeben und 1-4 h bei RT oder ü.N bei 4°C bei leichtem Schütteln inkubiert. Anschließend wurde 2 x kurz und 3 x für 30 min mit PBST bei leichtem Schütteln gewaschen. Die Embryonen aus Fluoreszenz-Färbungen werden anschließend in *Vectashield* Medium eingebettet und analysiert. Für die klassische Variante folgt im Anschluss zur Verstärkung des Signals die Kopplung des zweiten Antikörpers über das gekoppelte Biotin an mit Avidin gekoppelter Peroxidase (ABC Reaktion).

2.6.5.3 ABC Reaktion

10µl 'A'(Avidin) und 10µl 'B'(biotinylierte Peroxidase) (*Vectastain Peroxidase Standard Kit, Vector Laboratories*) werden in 1 ml PBST gemischt und mindestens 30 min vorinkubiert. Dann werden die Embryos in dem ABC/PBST Gemisch für 2 h inkubiert und anschließend 3 x kurz und 3 x für 5-10 min mit PBST gewaschen.

2.6.5.4 Färbung

Nach der Entnahme des PBST werden die Embryonen in DAB Lösung kurz äquilibriert. Im nächsten Schritt werden die Embryonen zur Färbung in Glasschälchen überführt. Anschließend wird die DAB Lösung durch DAB/H₂O₂ Lösung ausgetauscht und die Farb-reaktion unter dem Mikroskop verfolgt. Nachdem die Färbung die gewünschte Stärke erreicht hat, wird durch Zugabe von PBST gestoppt. Anschließend werden die Embryonen 3 x mit PBST gewaschen, zurück in Reaktionsgefäße überführt und entweder gegengefärbt oder direkt eingebettet.

Verwendete Lösungen:

- DAB Lsg.: 2 ml PBST + 200µl 10x DAB
- DAB/H₂O₂: 1 ml DAB Lsg. + 2µl H₂O₂ (4% in PBST)

2.6.6 Färbung von F-Actin mittels Phalloidin

Für Phalloidin-Färbungen wurden je 10-12 Ovarien in ein Reaktionsgefäß überführt und anschließend 3 x mit PBS-0,1% Triton gewaschen. Nachfolgend wurden die Ovarien 3 x 15 min in PBS-0,1% Triton gewaschen und für 2 h in PBS-1% Triton inkubiert. Anschließend wurde unter Lichtabschluss Phalloidin (Rhodamin- oder FITC-konjugiert, *Molecular Probes*; Konz: 1/400 in PBS-0,1% Triton) zugegeben und 2 h bei RT inkubiert. Anschließend wurde 3 x mit PBS-0,1% Triton gewaschen. Nachfolgend wurden die Ovarien 3 x 15 min. mit PBS-0,1% Triton gewaschen, dann auf einem Objektträger in *Vectashield* Medium eingebettet und unter einem Fluoreszenz-Mikroskop analysiert.

2.6.7 DNA-Färbungen

Um die DNA der Zellkerne in *Tribolium*-Embryonen sichtbar zu machen, wurde der Farbstoff Hoechst 33258 (DAPI) verwendet. Dieser wurde entweder nach erfolgter Fixierung der Embryonen oder nach Abschluss der Farb-reaktion zur Detektion von Antikörpern oder hybridisierten RNA-Sonden für 15min in einer Verdünnung von 1:1500 in PBST zugegeben und unter leichtem Schütteln inkubiert und anschließend in mehreren Waschschritten a 5 bis

10 min in PBST der überschüssige Farbstoff wieder entfernt. Die Embryonen wurden anschließend bei 4°C gelagert oder direkt in *Vectashield* Medium eingebettet.

Da sich dieser Farbstoff sowohl in Oozytenkernen als auch in Follikelzellkernen von *Tribolium*- und *Anopheles*-Eikammern nicht adäquat sichtbar machen ließ, wurde für diese Gewebe der Fluoreszenz-Farbstoff *Toto-3 (Molecular Probes)* verwendet. Die Färbereaktion erfolgte analog der oben für DAPI beschriebenen.

2.7 Mikroskopie

Lichtmikroskopische, Durchlicht- und Fluoreszenz-Aufnahmen wurden mit Hilfe eines *Zeiss Axioplan 2 Mikroskops* gemacht, ausgestattet mit einer *Carl Zeiss AxioCam HR color* und Nomarski-Optik. Hierzu wurde die *Zeiss Axio Vision Software, Version 2.0.5 (Carl Zeiss Vision GmbH)* auf einem Standard-PC verwendet.

Konfokale Aufnahmen wurden mit einem *Leica TCS SP2* Mikroskop gemacht, unter Verwendung der *Leica Confocal Software, Version 2.5*.

Die Nachbearbeitung der Fotos erfolgte mit Hilfe des Programms *Photoshop, Version 6.0 und 7.0 (Adobe)*.

3 Ergebnisse

In *Drosophila* unterteilt sich die Spezifizierung der embryonalen Körperachsen in zwei Phasen: Während der Oogenese werden für beide Achsen polarisierende Informationen in der Oozyte bzw. im umliegenden Follikelepithel hinterlegt, die anschließend während früherer Stadien der Embryogenese an den sich entwickelnden Embryo übermittelt und dort umgesetzt werden. Daher wurden zunächst im Rahmen dieser Arbeit Aspekte der Oogenese in niederen Insekten untersucht. Des Weiteren wurde die Funktion des Nf- κ B ähnlichen Proteins TcDorsal während der frühen Embryogenese von *Tribolium* analysiert.

3.1 Oogenese

In *Drosophila melanogaster* werden sowohl die anterioposteriore als auch die dorsoventrale Achse des zukünftigen Embryos bereits während der Oogenese festgelegt. Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit sollte daher nach Hinweisen gesucht werden, ob für andere Insekten, in diesem Falle *Tribolium castaneum* und *Anopheles gambiae*, ebenfalls Hinweise dafür existieren, dass die Achsenbildung des Embryos bereits während der Oogenese initiiert wird.

3.1.1 Lokalisierung des Oozytenkerns während der Oogenese

Voraussetzung für die Etablierung der beiden Hauptkörperachsen des *Drosophila* Embryos ist die Wanderung des Oozytenkerns aus einer anfänglich ungefähr symmetrischen Position zunächst in Richtung des posterioren Endes der Oozyte, sowie seine anschließende Wanderung in eine anteriore kortikale Position, die die dorsale Seite der Oozyte bzw. des zukünftigen Embryos festlegt. Daher wurde mithilfe geeigneter Färbungen die Lokalisierung von Oozytenkernen aus Ovarien von *Tribolium castaneum* und *Anopheles gambiae* untersucht.

Moskito als Stellvertreter einer basalen Gruppe der Dipteren besitzen meroistische Ovarien, die aus jeweils etwa 50 Ovariolen bestehen, die strahlenförmig von einer zentralen Struktur (Calyx) abzweigen. Jede der Ovariolen setzt sich aus einem Germarium und zwei Eikammern zusammen, welche wiederum aus je einer Oozyte und 7 Nährzellen, umschlossen von einem einschichtigen Follikelepithel, bestehen (Sokolova, 1994, Abb.3.1). Die jeweils jüngere der beiden Eikammern bleibt dabei in einem frühen Stadium ruhend bis zum Blutmahl. Dies initiiert die Reifung der Eikammer (Abb.3.1, E2) innerhalb 48-50 Stunden bis zur Ablage

eines fertigen Eies, während sich gleichzeitig eine neue Eikammer hervor-gebracht wird (E1), die sich bis zu einem festgelegten Stadium weiterentwickelt, wo sie dann ihrerseits in einem Ruhezustand arretiert wird. Gleichzeitig wird vom Germarium (G) eine neue Eikammer hervorgebracht. Alle Eikammern eines Weibchens entwickeln sich simultan.

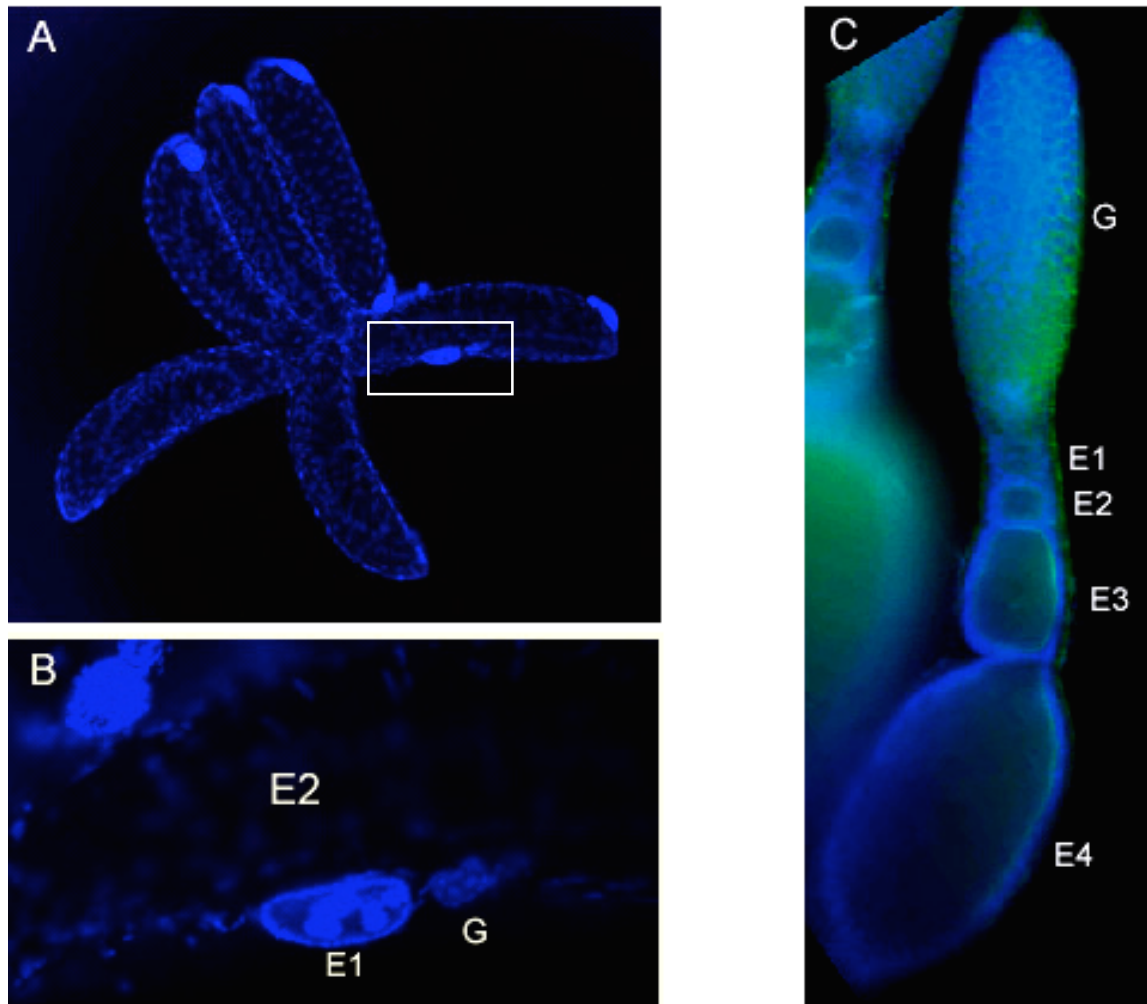


Abb.3.1: Übersicht von Ovarien aus *Anopheles gambiae* und *Tribolium castaneum* anhand von DAPI-Färbungen. A: Freipräparierte *Anopheles* Ovarien, 44hpi. 100fache Vergrößerung. B: Ausschnittvergrößerung aus A, weißer Kasten (400fach). Zu erkennen sind das Germarium (G) und eine arretierte, frühe Eikammer einer Ovariole (E1). C: Freipräparierte Ovariole aus *Tribolium*, gefärbt mit anti-acetyliertem Tubulin Antikörper (grün). 200 fache Vergrößerung. Man erkennt das Germarium (G) und vier Eikammern unterschiedlicher Stadien (E1-E4).

In *Tribolium* existieren dagegen telotrophe Ovarien. Dies bedeutet, dass hier die Oozyte zwar ebenfalls mit einer Reihe von Nährzellen verbunden ist, diese jedoch nicht wie bei Dipteren zusammen mit der Oozyte eine Eikammer bilden, sondern die Nährzellen im Bereich des Germariums verbleiben und mit der sich entwickelnden Oozyte ausschließlich über die sogenannten „Nährstränge“ verbunden bleiben. In einer Ovariole entwickeln sich bis zu vier Oozyten in unterschiedlichen Stadien (Ullmann, 1973; vgl. Abb.3.1, C).

Da die Oozytenkerne in beiden Spezies mit DAPI-Färbungen nicht in allen Stadien sichtbar gemacht werden konnten, wurden zur Analyse der Oozytenkernposition konfokale Aufnahmen von Toto-3, bzw. Phalloidin Färbungen verwendet (Abb3.2).

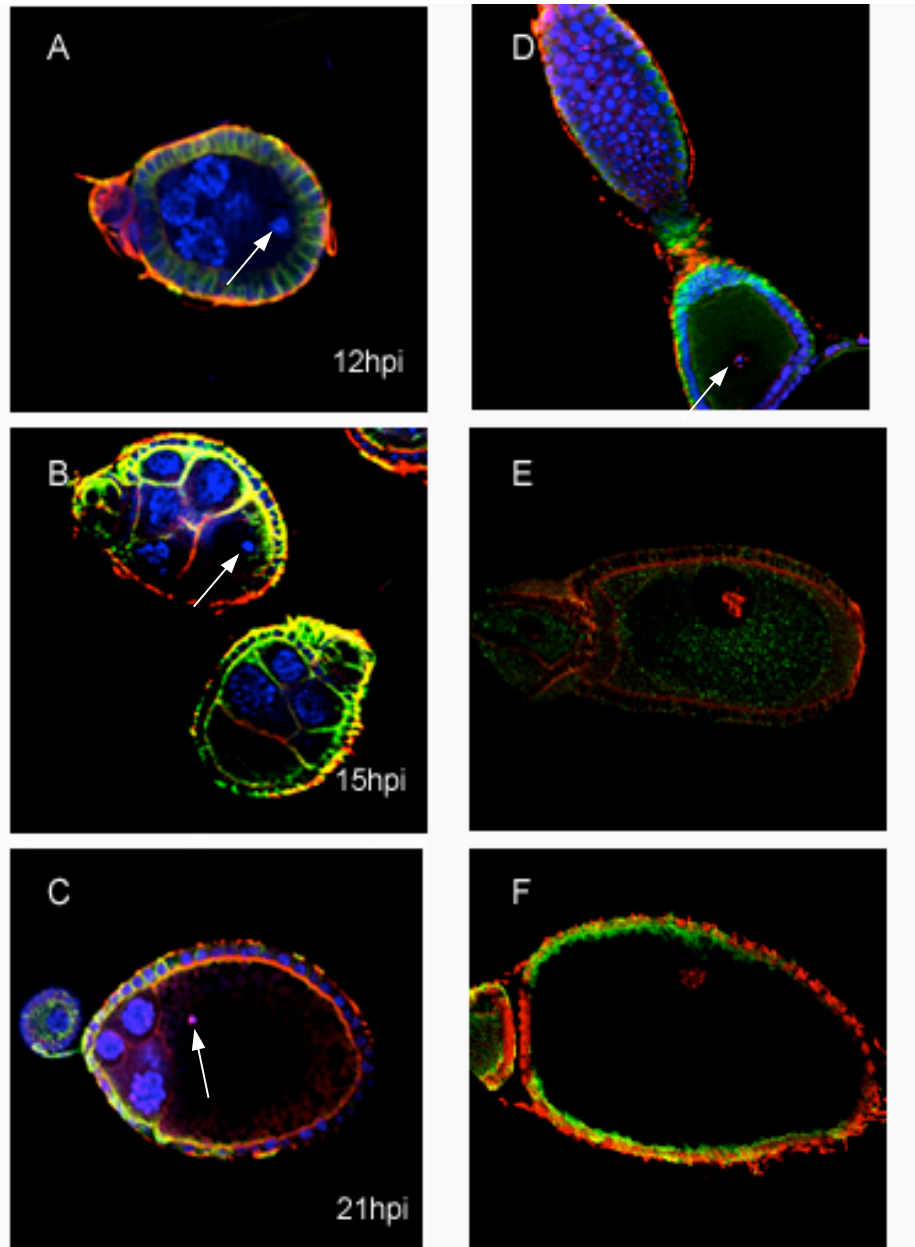


Abb.3.2: Kernwanderung in Oozyten von *Anopheles gambiae* (A, B, C) und *Tribolium castaneum* (D, E, F), sichtbar gemacht durch Färbungen gegen anti-acteyliertes Tubulin Antikörper (grün), f-Aktin (rot) und Toto-3 (blau). Toto-3 ist in späten Stadien in Oozytenkernen nicht detektierbar, daher erfolgte die Markierung in diesen Stadien ausschließlich durch f-Aktin, welches mit der Oozytenkern-DNA kolokalisiert (D). „hpi“ gibt die Stadien der Oogenese in *Anopheles* in Stunden nach Induktion an. Pfeile in A - D deuten auf den Oozytenkern.

In *Anopheles* ist der Oozytenkern in frühen Stadien der Oogenese in etwa zentral in der Oozyte lokalisiert (Abb.3.2 A). Von dort wandert er in den nächsten drei Stunden zunächst in eine posteriore Position (Abb.3.2 B). Nach 21hpi („hours past induction“; Stunden nach

Blutmahl) ist der Kern in einer in Bezug auf beide Achsen der Eikammer asymmetrischen Position zu finden, während die Oozyte selbst bereits durch Einlagerung von Dotterproteinen gewachsen ist (Abb.3.2 C). In dieser Position findet sicher Oozytenkern auch in späteren Stadien (vgl. Abb. 3.4).

Im Gegensatz hierzu bewegt sich der Oozytenkern in *Tribolium* nicht in Bezug auf die anteriorposteriore Achse der Ovariole. Während er auch hier in frühen Stadien in etwa zentral in der Oozyte liegt (3.2 D; Stadium 5 nach Ullmann, 1973), wandert er von dort in progressiv späteren Stadien in eine kortikale Position, während die Oozyte durch die Aufnahme von Dotterproteinen deutlich an Größe zunimmt (3.2 E und F, entsprechend den Stadien 7 und 8 nach Ullmann, 1973). Somit wird der Kern hier nur in Bezug auf die zukünftige dorsoventrale Achse asymmetrisch positioniert.

3.1.2 Isolierung von Pipe Homologen aus *Anopheles gambiae* und *Tribolium castaneum*

Mit der asymmetrischen Lokalisierung des Oozytenkerns in mittleren Stadien der Oogenese ist eine formale Voraussetzung für die Beteiligung des in *Drosophila* beschriebenen Signalweges an der Etablierung der dorsoventralen Achse in niederen Insekten wie *Anopheles* und *Tribolium* erfüllt. Um zu untersuchen, ob auch weitere Komponenten der Signalkaskade aus *Drosophila* konserviert sind, wurde nach Homologen des *Drosophila* Gens *pipe* gesucht, da dieses das einzige, asymmetrisch im Follikel epithel exprimierte Gen innerhalb der dorsoventralen Kaskade in *Drosophila* ist und diese Expression zudem direkt durch das Gurken abhängige Signal gesteuert wird (Sen *et al.*, 1998).

Hierzu wurden Datenbanksuchen in den genomischen Sequenzen verschiedener Insektenarten mit der Proteinsequenz von *Drosophila* Pipe ST10 durchgeführt (vgl. 1.5). Es wurden für *Apis*, *Bombyx*, *Anopheles* und *Tribolium* jeweils ein und für *Drosophila pseudoobscura* 10 verschiedene Homologe identifiziert. Die Homologen aus *Anopheles* und *Tribolium* wurden für diese Arbeit mit Hilfe von Primern, die auf Grund der in der Datenbank identifizierten Sequenzen ausgewählt wurden, per PCR isoliert und kloniert. Das entsprechende *Anopheles* Gen findet sich in der EnSEMBL Datenbank unter der Nummer ENSANGG00000004467. Die isolierte cDNA aus *Tribolium* und die daraus abgeleitete, partielle Sequenz des TcPipe Proteins sind im Anhang unter 6.2 wiedergegeben.

Auf Aminosäureebene besteht zwischen DmPipe ST10 und AgPipe eine Identität von 73,1% und zwischen DmPipeST10 und der isolierten TcPipe ST-Box von 67,2%. Zu anderen ST-

Boxen aus *Drosophila melanogaster* besteht für AgPipe und TcPipe eine Identität von maximal 49%.

pipe codiert für ein Enzym der Familie der Heparansulfat-Sulfotransferasen (HSSTs). In HSSTs existieren 2 Regionen innerhalb der katalytischen Domäne, die bei allen bislang untersuchten HSSTs konserviert sind: Dies sind zum einen eine 5'-Phosphosulfat Binde- stelle, die eine konservierte basische Aminosäure enthält, sowie eine 3'-Phosphat Binde- stelle, die in fast allen bekannten HSSTs ein konserviertes Arginin, sowie einen zusätzlich konservierten Serinrest enthalten. Desweiteren ist eine RDP-Sequenz in allen HSSTs vorhanden und auch essentiell, da diese Aminosäuren für die Aufrechterhaltung der 5'- Substratbindestelle verantwortlich sind (Ong *et al.*, 1999).

		*		
DmpipeST10	---	LNNTRKAQ	MELVFFNRV	P
DppipeST10	---	LNNTRKAQ	MELVFFNRV	P
Agpipe	---	LNNTRRAE	VPIIFFN	R
Bmpipe	---	LNNTARAG	REMLFFNRV	P
Åmpipe	---	LNNTKRADR	SVLFFNRV	P
Tcpipe	---	VNNTLKAQ	QNIIVFFNRV	P
DmpipeST3	---	LNNTKFFH	RDIIFFNRV	P
CG10234-PA	SSTTDD	DFEHLV	LVLYNRV	P
				*
DmpipeST10	QQEMAEVISELP--	EPSVF	IKHVCFTMFTKFNLP-RP	IYLN
DppipeST10	QQEMAEVISELP--	EPSVF	IKHVCFTMFTKFNLP-KP	IYLN
Agpipe	QQELAEMVMDLP--	VPSVYV	KHVCYTNFTRFGLP-MP	IYVNM
Bmpipe	QQLLVSLVSAHA--	PPASYI	KHVCYTNFTRFGFP-SP	IYVNV
Åmpipe	QQ-LATMVSSYS--	EPSVYI	KHVCFTMFTKFNLP-QP	IYIN
Tcpipe	QAVLSSLVSSYE--	PPGVYI	KHVCFTMFFRFGFP-EP	IYIN
DmpipeST3	QKQEATRILELQEEP	AFVYVEH	MNMYMIRPFHLP-QP	IYIN
CG10234-PA	QIQFVRNVSRWHEMKP	ALYHGMA	FLDFSKFQIAHKP	IYIN

				*
DmpipeST10	WYFVERKAAFPDLPLPHPAWLK	KDFETCVL	NGDQECTYTGQVTVEG-	IGD
DppipeST10	WYFVERKAAFPDLPLPHPAWLK	KDFETCVL	SGDQECTYTGQVTVEG-	IGD
Agpipe	WYYVERKQAFPDLPLPDRWLK	KDFETCVL	QGDPECTYSQNAVHEG-	IGD
Bmpipe	WYYVERKRAFPDLPLPDPAWL	KDFETCVL	SGDRECQYIEGETHEG-	IGD
Åmpipe	WYYVERKQIFPDLPDPNWLK	KDFESC	VLKADRECRYLEGEIHEG-	IGD
Tcpipe	WYYVERKIAFPDIPLDPKWLK	KDFEHC	VLSGDRECKYLTGETREG-	IGD
DmpipeST3	WNSVKMYKVTG--	KFQNR	THYTKNFEECVLTHDPE	CRYD
CG10234-PA	DNYRPN-----	LVRKK	A&NKITFDEC	VQKQ

Abb.3.3: Sequenzvergleich der ST-Boxen des aus *Anopheles* isolierten Pipe ähnlichen Proteins mit ST-Boxen ausgewählter Pipe ähnlicher Proteine aus *Drosophila melanogaster* (*Dm*), *Drosophila pseudoobscura* (*Dp*), *Bombyx mori* (*Bm*), *Tribolium castaneum* und *Apis mellifera* (*Am*) sowie der ST-Box der Heparansulfat-Sulfotransferase CG10234-PA aus *D.melanogaster*. Dargestellt ist der N-terminale Bereich der jeweiligen ST-Boxen. Die Motive der Substratbindestellen sind farbig unterlegt. Sterne markieren Aminosäuren, die für die Sulfotransferaseaktivität essentiell sind.

Ein Sequenzvergleich zeigt, dass beide Motive, die essentiell für die Funktion der Heparansulfat-Sulfotransferasen sind, auch in den isolierten Pipe Proteinen vollständig vorhanden sind (Abb.3.3, rot markierte Bereiche). In allen Fällen werden beide Bindestellen

offensichtlich von jeweils nur einem Exon kodiert, während die Intron-Exon Struktur der Pipe Proteine aus den verschiedenen Insektenarten außerhalb der ST-Box voneinander abweicht (eigene Beobachtung).

Auch finden sich sämtliche Aminosäurereste, für die in verwandten HSSTs aus dem chinesischen Hamster nachgewiesen wurde, dass sie für deren Aktivität essentiell sind, vollständig konserviert in allen zu PipeST10 ähnlichen Proteinen (Abb.3.3; mit * markierte As; Ong *et al.*, 1999). Dagegen zeigen PipeST3 und die Sulfotransferase CG10234 aus *Drosophila melanogaster* in der ersten Bindestelle jeweils 3 Aminosäureaustausche, während die zweite Bindestelle eine höhere Ähnlichkeit zu denen der Pipe-ST10 Proteine aufweist.

Des Weiteren zeigen sämtliche isolierten ST-Boxen Homologie zu Heparansulfat-2-Sulfotransferasen mit einer Type II-Transmembrantopologie, welche charakteristisch für Golgi Membran Proteine ist, im Gegensatz zu cytosolischen Sulfotransferasen (Kobayashi *et al.*, 1997). Dies zeigt sich neben den N-terminalen Transmembranregionen, die in allen Homologen außer dem *Tribolium* Protein auffindbar waren, auch in spezifischen Signaturen innerhalb der ST-Boxen, zum Beispiel im Vorhandensein der oben erwähnten Sequenz RDP, die sich in cytosolischen Sulfotransferasen nicht findet (Kobayashi *et al.*, 1997). Die Abwesenheit einer Transmembranregion für TcPipe in der *Tribolium* Datenbank lässt sich vermutlich auf die bislang unvollständige Sequenzierung des *Tribolium* Genoms zurückführen.

Zur weiteren Analyse der isolierten Pipe Homologen wurde auf Basis der Aminosäuresequenzen der identifizierten ST-Boxen ein phylogenetischer Stammbaum erzeugt (Abb 3.4).

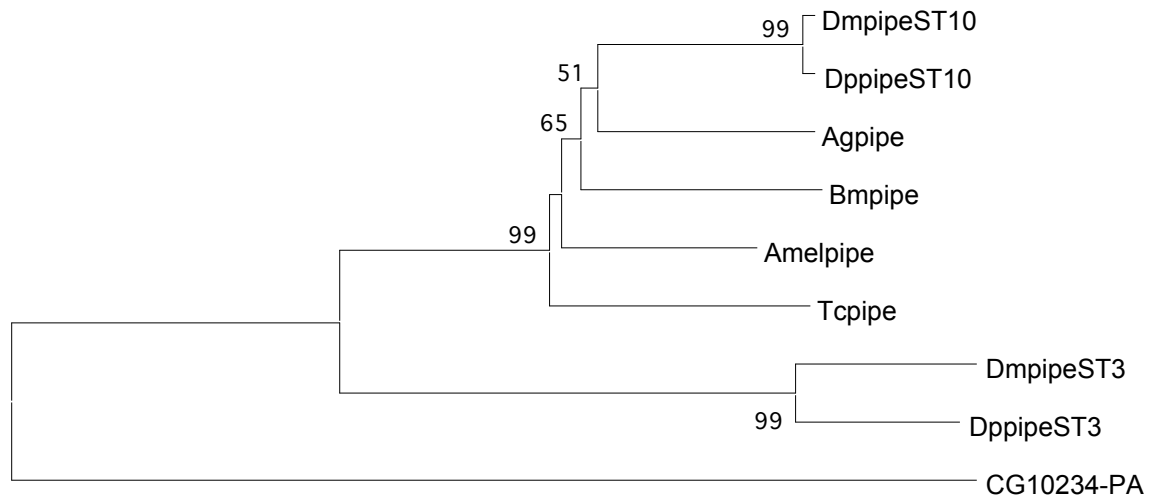


Abb.3.4: Phylogenetischer Vergleich Pipe ähnlicher Proteine aus *Tribolium*, *Bombyx*, *Apis* und *Anopheles* mit ausgewählten ST-Boxen der *pipe* Loci aus *Drosophila melanogaster* und *D. pseudoobscura*. Dargestellt ist der mit Hilfe der Neighbour-Joining Methode erzeugte, ungewurzelte Stammbaum, der aus 500 Zwischenbäumen errechnet wurde. Ein Stammbaum, der zusätzlich die Sequenzen sämtlicher ST-Boxen der *pipe* Loci aus beiden Drosophiliden berücksichtigt, findet sich im Anhang.

Die erwarteten phylogenetischen Verhältnisse werden von den errechneten bootstrap Werten im allgemeinen recht gut unterstützt. Die geringeren Werte für die Knotenpunkte zwischen AmPipe und BmPipe, sowie für BmPipe und den Proteinen aus Dipteren lässt sich vermutlich auf die unvollständige Annotation des *Bombyx* Genoms zurückführen, da hier die Pipe Sequenz aus mehreren, nicht zusammenhängenden DNA Fragmenten abgeleitet wurde und die Zugehörigkeit einiger Bereiche zum BmPipe Protein nicht sicher geklärt werden konnte. Verwendet wurde für diesen Stammbaum neben ST-Box 10 nur die ST-Box 3 aus *Drosophila melanogaster* und *D. pseudoobscura*, da diese von den übrigen ST-Boxen auf Aminosäurebasis die höchste Ähnlichkeit zu der jeweiligen ST-Box 10 besitzt (Daten nicht gezeigt) und die Berücksichtigung sämtlicher ST-Boxen aus beiden *Drosophila*-Arten diesen Bereich des Stammbaumes nicht wesentlich beeinflusst (vgl. vollständigen Stammbaum im Anhang, 6.3).

Somit lassen sich die isolierten AgPipe und TcPipe, wie auch die in *Bombyx* und *Apis* identifizierten Homologe jeweils eindeutig als Ortholog zu DmPipeST10 einordnen und zeigen auf Sequenzebene Ähnlichkeit zur Familie der im Golgi-Apparat lokalisierten Sulfotransferasen.

Im Verlaufe dieser Arbeit wurden ebenfalls zwei Pipe-ähnliche ST-Boxen aus *Musca domestica* isoliert. Diese zeigen jedoch im Vergleich zu *Drosophila* die höchste Ähnlichkeit zur ST-Box 2 bzw. ST-Box 5 und wurden daher nicht weiter analysiert.

3.1.3 Expression von *Agpipe* während der Oogenese

Während sämtliche Pipe Isoformen in *Drosophila melanogaster* während der Embryogenese in den sich entwickelnden Speicheldrüsen exprimiert werden, finden sich sowohl ST7 als auch ST10 Transkripte zusätzlich während der Oogenese ausschließlich in ventralen Follikelzellen. (Sen *et al.*, 1998; Sergeev *et al.*, 2001). Da jedoch in allen analysierten nicht-Brachyceren nur jeweils eine Pipe Isoform vorhanden ist, erscheint es möglich, dass diese sowohl Funktionen während der Embryogenese als auch in der DV-Achsenbildung während der Oogenese zeigen.

Aus diesem Grund wurde mittels *in situ* Hybridisierung die Verteilung von *Agpipe* Transkripten an Eikammern aus *Anopheles gambiae* untersucht (Abb.3.5). Die früheste detektierbare mRNA Expression findet sich in Eikammern ca. 21 hpi. Zu diesem Zeitpunkt erstreckt sich das *pipe* Signal auf eine Seite des Follikelepithels und umspannt ca. 50% des Umfangs der Eikammer. Dabei wird *Agpipe* sowohl in Follikelzellen exprimiert, die der Oozyte aufliegen, als auch von solchen, die über den Nährzellen liegen (Abb.3.5 A und C). Um die Expression von *Agpipe* mit der Position des jeweiligen Oozytenkerns vergleichen zu können, wurden die DNA der Zellkerne mit Toto-3 gefärbt. Hierbei zeigt sich, dass in allen Oozyten dieses Stadiums der Kern sich in einer kortikalen Position am anterioren Ende befindet, und zwar auf der Seite der Oozyte, der den *Agpipe* exprimierenden Follikelzellen abgewandt ist (Abb.3.5, B und D).

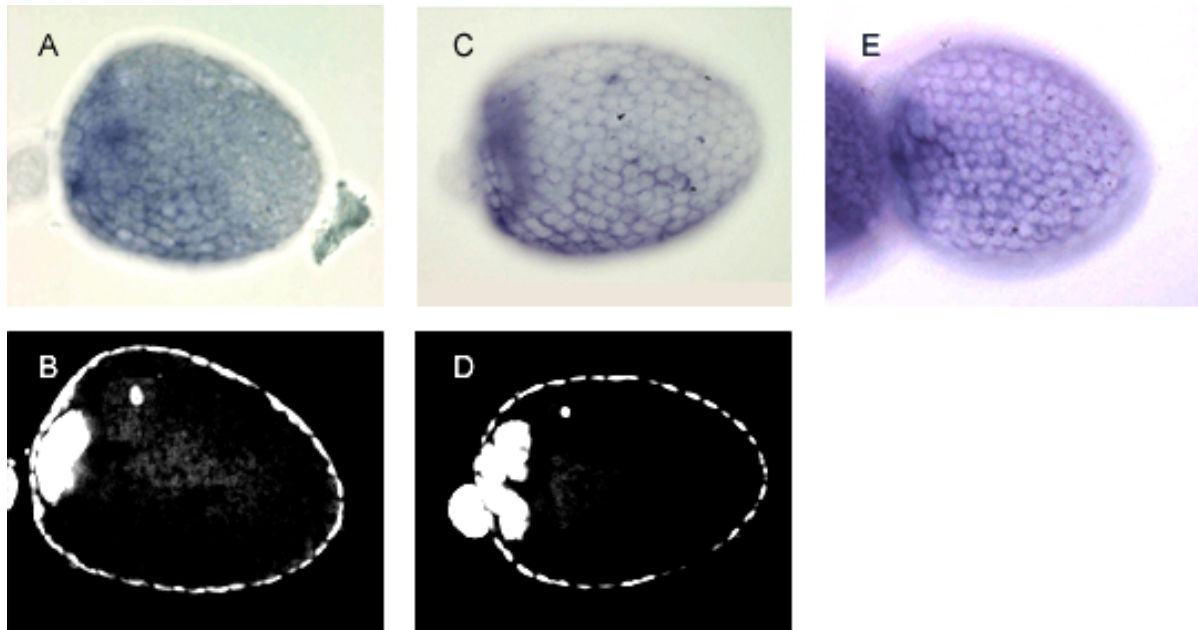


Abb.3.5: Expression der mRNA von *Agpipe*, sichtbar gemacht durch *in situ* Hybridisierung. Gezeigt ist jeweils eine Eikammer von *Anopheles gambiae* der Stadien 21 hpi (**A, C**) bzw. 27 hpi (**E**). Anterior befindet sich jeweils links. **B, D**: Konfokale Aufnahmen der Eikammern aus **A, C**. Zellkerne angefärbt durch Toto-3. Man erkennt die Lage des jeweiligen Oozytenkerns auf der gegenüberliegenden Seite zu den *pipe* exprimierenden Follikelzellen.

In späteren Stadien, ab ca. 27 hpi lässt sich *Agpipe* in allen Follikelzellen rund um die Oozyte detektieren und verschwindet ab ca. 32 hpi völlig (Abb3.5 E und Daten nicht gezeigt).

Weiterhin wurde versucht, ein Homolog zum *Drosophila melanogaster* Gen *gurken* aus *Anopheles* zu isolieren und dessen Expression zu analysieren. Es zeigt sich jedoch, dass offensichtlich im Genom von *Anopheles* nur ein EGF ähnliches Molekül kodiert ist (Zdobnov et al., 2002 und eigene Beobachtung), während es in *D.melanogaster* drei sind (Gurken, Spitz und Keren). Die mRNA Expression dieses AgEGF Gens während der Oogenese lässt sich ab 24 hpi fortlaufend nachweisen, ist jedoch in keinem der analysierten Stadien räumlich beschränkt, sondern erstreckt sich auf sämtliche Zellen des Follikelepithels (Daten nicht gezeigt). Innerhalb der Oozyte konnte keine Expression detektiert werden.

3.1.4 Expression von *Tcpipe* während der Oogenese

Da mit *Anopheles* auch in wenigstens einem Organismus außerhalb der Brachyceren eine asymmetrische Verteilung von *pipe* Transkripten im Follikelepithel während mittleren Stadien der Oogenese erfolgt, wurde die Expression von *Tcpipe* während der Oogenese von *Tribolium* mittels *in situ* Hybridisierung untersucht.

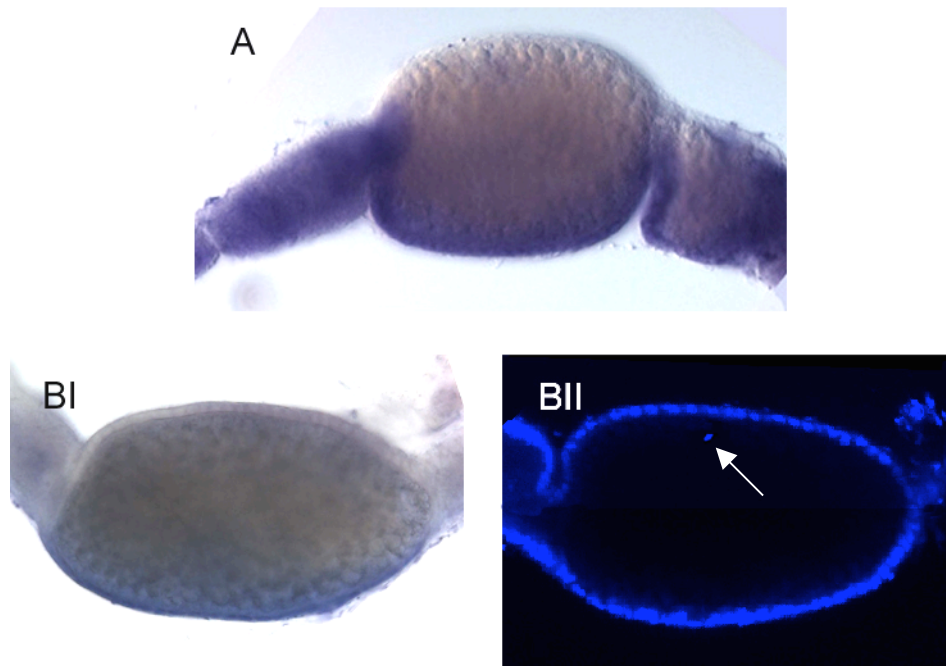


Abb.3.6: Expression von *Tcpipe* während der Oogenese. Gezeigt sind zwei verschiedene Oozyten mit *Tcpipe* Expression. In der Oozyte aus BI liegt der Oozytenkern der Expressionsdomäne von *Tcpipe* gegenüber (BII).

Tcpipe wird während der Oogenese in mittleren Stadien asymmetrisch im Follikelepithel exprimiert (Abb. 3.6). In früheren Stadien findet sich dagegen keine Expression. *Tcpipe* mRNA findet sich etwa in einer Hälfte des Follikelepithels, während die andere Hälfte von Transkripten frei bleibt. Eine eindeutige Aussage über die Kernlokalisierung in diesen Stadien ist bislang nicht möglich. So sind aufgrund der großen Mengen an Dotterproteinen in diesem Stadium die Oozytenkerne in DAPI- oder Toto-3 Färbungen zumeist nicht sichtbar. In Einzelfällen, in denen der Oozytenkern in diesem Stadium erkennbar war, lag er auf der Seite der Oozyte, der der Expressionsdomäne von *Tcpipe* abgewandt ist (Abb.3.6, BII). Eine Färbung mit Phalloidin wie in Abb.3.2 verwendet, ist im Anschluss an die *in situ*-Hybridisierung nicht möglich, da hierfür die Ovarien mit Methanol behandelt werden, welches zur Depolymerisierung von Aktin führt.

3.2 Isolierung eines *cactus*-Gens aus *Tribolium castaneum*

Zur Isolierung eines Homologs zum *Drosophila* Gen *cactus* wurde das Sequenzarchiv der *Tribolium*-Datenbank mit dem zuvor identifizierten, vollständigen Cactus Protein aus *Anopheles gambiae* mit Hilfe des Programmes TblastN 2.2.6 nach ähnlichen Sequenzen durchsucht. Zwei genomische DNA-Fragmente mit hoher Ähnlichkeit zu *Agcactus* wurden isoliert und die Homologie der abgeleiteten Proteinsequenz zu dem identifizierten Cactus aus *Drosophila melanogaster* verifiziert.

Aus einer embryonalen Gesamt-cDNA von *Tribolium castaneum* wurde mit Hilfe von geeigneten Primern (Primersequenz siehe 2.3.4) ein 619bp umfassender Bereich amplifiziert und kloniert, der beide identifizierten Sequenzblöcke umfasst. Die vollständige Sequenz dieser cDNA und der hieraus abgeleiteten Proteinsequenz des längsten offenen Leserasters ist im Anhang unter 6.4 wiedergegeben.

Die abgeleitete Proteinsequenz zu dieser cDNA umfasst die Aminosäurepositionen 220 bis 434 in DmCactus. Diese Region enthält fünf Ankyrin-Wiederholungen, die zur Bindung an das Dorsal Protein essentiell und ausreichend sind (Kidd, 1992). Da die abgeleitete Proteinsequenz jedoch nicht dem vollständigen Cactus Protein aus *Drosophila* entspricht und weder ein Start- noch ein Stopcodon identifiziert werden konnten, handelt es sich bei dem von der isolierten cDNA abgeleiteten Sequenz offensichtlich um ein unvollständiges Protein.

Die abgeleitete Proteinsequenz zeigt eine Aminosäureidentität von 45,8% zu der Sequenz von DmCactus und von 39,7 % zu AgCactus (Abb.3.7). Die Identität zu I κ B- α aus Maus beträgt 27,9 %. Dabei findet sich innerhalb der Ankyrin-Wiederholungen kein Bereich mit erhöhter Identität.

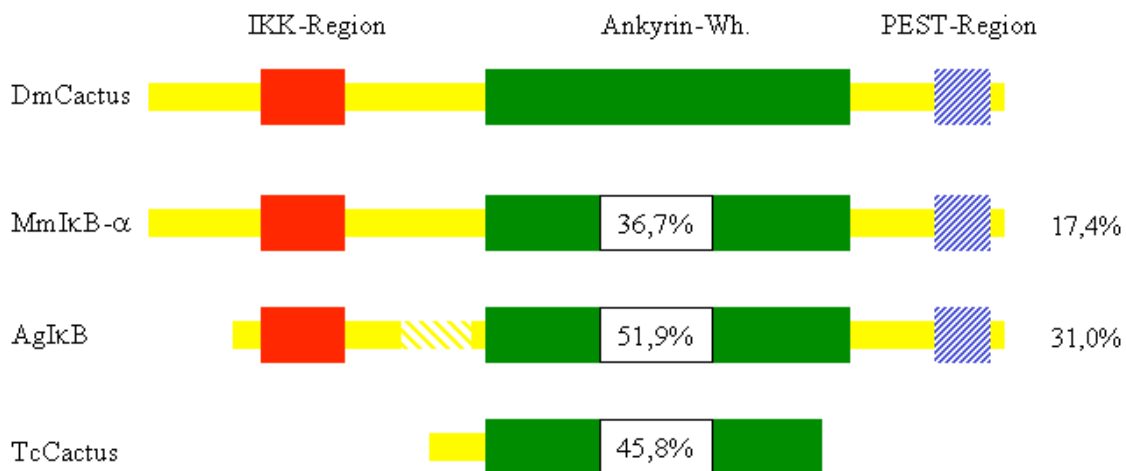


Abb.3.7: Vergleich der IκB-ähnlichen Proteine aus *Drosophila melanogaster*, Maus, *Anopheles* und *Tribolium*. Gezeigt sind ein Schema der jeweils isolierten Domänen, sowie die Ähnlichkeit der Ankyrin-Wiederholungen und der Gesamtsequenz des jeweiligen Proteins im Vergleich zu DmCactus. Die IKK-Region und die PEST-Region in DmCactus und MmIκB-α sind notwendig für den signalabhängigen, bzw. den signalunabhängigen Abbau des jeweiligen Proteins (Reach *et al.*, 1996; Aoki *et al.*, 1996). Ein 43 Aminosäuren langer Bereich N-terminal der Ankyrin-Wiederholungen ist in AgIκB nicht konserviert (gelb schraffierter Bereich).

Ein phylogenetischer Stammbaum, der auf Basis der Ankyrin-Regionen der in 1.5 identifizierten IκB-Homologen aus verschiedenen Insektenarten, sowie zweier IκB-Proteine aus Nicht-Insekten (Maus IκB-α und *C.elegans* IκB1) und dem abgeleiteten Protein aus *Tribolium* erstellt wurde, belegt die nahe Verwandtschaft des isolierten, partiellen Proteins aus *Tribolium* zu den verschiedenen IκB-Proteinen aus Insekten (siehe Abb.3.8). Insbesondere unterstützen die errechneten bootstrap Werte eine nahe Beziehung des *Tribolium* Proteins zu den IκB-ähnlichen Proteinen der Dipteren, während zwei in *Apis* identifizierte IκB-Proteine außerhalb dieser Familie liegen. Dies erscheint jedoch ausschließlich durch die Duplikation des IκB codierenden Gens in *Apis* bedingt. Nimmt man die Sequenz von AmIκB2 von dem Vergleich aus, so nimmt das verbleibende AmIκB1 eine Position zwischen den IκB-Proteinen aus Dipteren und dem Protein aus *Tribolium* ein (Daten nicht gezeigt). Aufgrund der hohen Verwandtschaft der abgeleiteten Proteinsequenz zu denen von IκB-Proteinen aus anderen Insektenarten, insbesondere zu *Drosophila Cactus* wird das isolierte *Tribolium* Protein im weiteren als *Tribolium castaneum Cactus* (TcCactus) bezeichnet. Eine erweiterte Datenbanksuche nach Regionen, die Ähnlichkeit zu den IKK-Regionen und PEST-ähnlichen Regionen aus Maus und *Drosophila* aufweisen, blieb erfolglos, jedoch stand

aufgrund der andauernden Sequenzierung für diese Suche nur ein Teil des Genoms von *Tribolium* zur Verfügung.

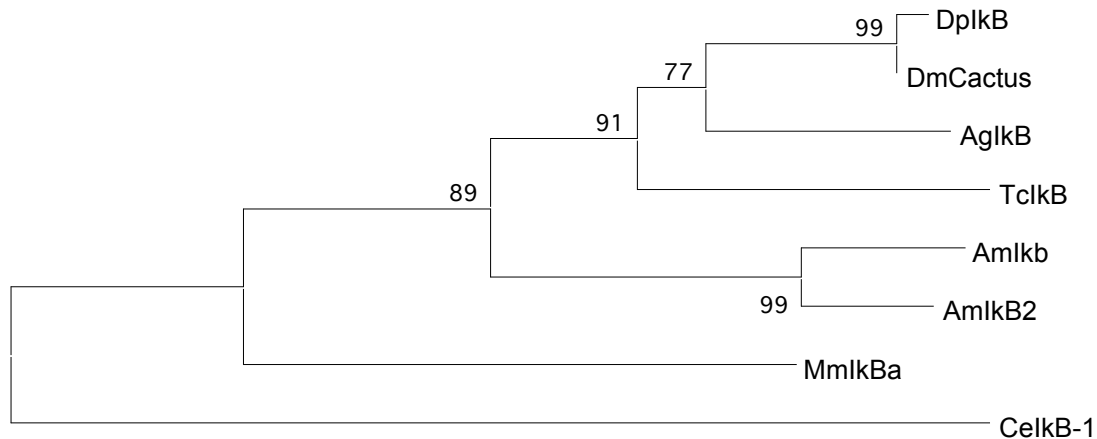


Abb.3.8: Phylogenetischer Vergleich der IκB-Proteine aus der Maus (IκB-α), *C.elegans* und verschiedenen Insektenarten. Dargestellt ist der mit Hilfe der Neighbour-Joining Methode erzeugte Konsensus-Stammbaum, der aus 500 Zwischenbäumen errechnet wurde. Die Zahlen an den Verzweigungspunkten geben die sog. „bootstrap values“ an. Abkürzungen der einzelnen Arten, siehe 6.1.

3.3 Die Expression von *Tccactus*

Zur Untersuchung der räumlichen Verteilung der mRNA des *Tccactus* Gens während der Embryogenese von *Tribolium* wurde aus dem isolierten cDNA Konstrukt eine Digoxigenin-markierte Sonde hergestellt und die Expression der *Tccactus* Transkripte mittels *in situ* Hybridisierung sichtbar gemacht.

3.3.1 Expression während des Blastodermstadiums

Nachfolgend wurde die Expression des *Tccactus* Gens mittels *in situ* Hybridisierung analysiert. Die Zuordnung der einzelnen untersuchten Stadien erfolgte aufgrund von DAPI-Färbungen nach der Beschreibung von Handel *et al.* (1999).

Erste *cactus* Transkripte finden sich während der Embryogenese in frühen Blastoderm-stadien in einem Streifen von Zellen auf der gesamten ventralen Seite des Embryos (Abb.3.9 A). Zu diesem Zeitpunkt wird erstmalig eine Differenzierung in die embryonale Zellen und die Serosazellen sichtbar (Abb.3.9 AII). Die *cactus* RNA Expression umfasst zu diesem

Zeitpunkt sowohl Zellen der eigentlichen embryonalen Anlage, wie auch Zellen der zukünftigen Serosa.

Dabei nimmt die Stärke der Expression von der ventralen Mittellinie zu weiter lateral gelegenen Zellen hin graduell ab (Abb.3.9 A). Dieser Aspekt der Expression ähnelt der Proteinlokalisierung von TcDorsal in denselben Stadien. Dorsal Protein bildet zu diesem Zeitpunkt einen Kerngradienten aus, der ebenfalls die höchsten Konzentrationen entlang der ventralen Mittellinie und nach lateral hin abnehmenden Konzentrationen aufweist (Chen *et al.*, 2000).

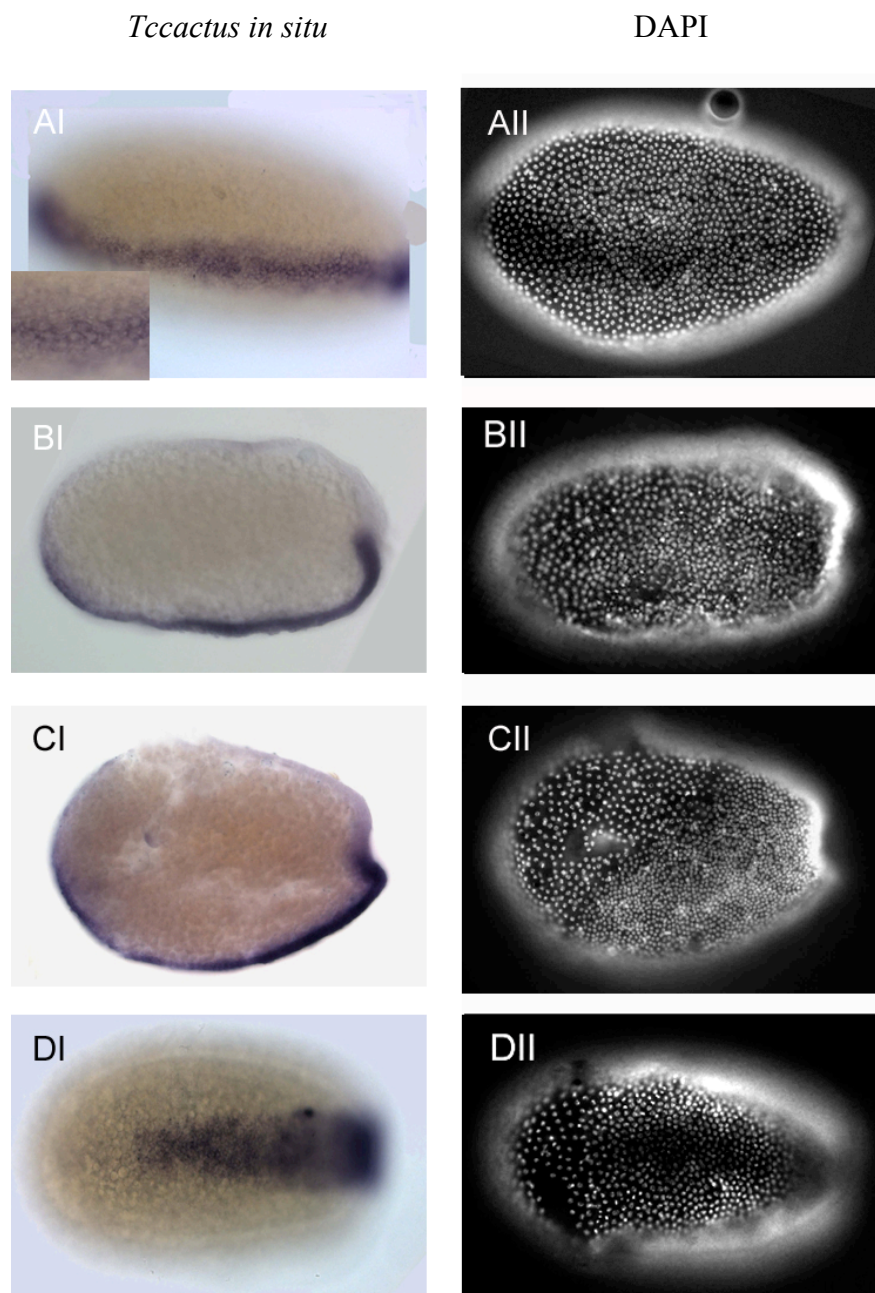


Abb3.9: Expression von *Tccactus* mRNA während früher Stadien der Embryogenese, sichtbar gemacht durch *in situ* Hybridisierung. Fotos der rechten Spalte zeigen DAPI-Färbungen der Embryonen in A bis D. A und D zeigen jeweils ventrale Ansichten, B und C zeigen laterale Ansichten; Der Kasten in AI zeigt eine Ausschnittvergrößerung der ventralen Mittellinie des Embryos; anterior ist jeweils links.

Diese ventrale Expressionsdomäne erstreckt sich entlang der gesamten anteriorposterioren Achse vom anterioren bis zum posterioren Pol des frühen Embryos (Abb.3.9 B).

Mit Beginn der Ausbildung der posterioren Primitivgrube beginnt sich die Expression in den anterioren Serosazellen abzuschwächen (Abb.3.9 C). Gleichzeitig verbreitert sich der Streifen der *cactus* exprimierenden Zellen im Bereich der embryonalen Anlage in weiter lateral gelegenen Zellen, während die Expression im anterioren Bereich vollständig eingestellt wird (Abb.3.9 D). Zu diesem Zeitpunkt ist die Abgrenzung der extraembryonalen Serosazellen von der Keimanlage abgeschlossen (Abb.3.9 CII und DII).

3.3.2 Expression während der Invagination des Keimstreifs

Zu Beginn der Invagination des Keimstreifs in das Innere des Embryos teilt sich die breite, ventrale Expressionsdomäne von *Tccactus* in zwei longitudinale Reihen von *cactus* exprimierenden Zellen (Abb.3.10 A). Zwischen diesen Zellen liegen die Zellen des Mesoderms, die zu diesem Zeitpunkt noch nicht eingewandert sind (Handel *et al.*, 1999; Handel *et al.*, 2004). Somit müsste es sich bei den *cactus* exprimierenden Zellgruppen um präsumptive ektodermale oder mesektodermale Zellen handeln. Die beiden longitudinalen Streifen münden am anterioren und posterioren Ende jeweils in eine weitere, terminale Expressionsdomäne zwischen den Kopflappen bzw. in der Wachstumszone.

Dabei beschränkt sich die Expression eindeutig auf die Zellen des eigentlichen Embryos, während die Zellen des den Embryo überwandernden Amnions frei von Expression bleiben (Abb.3.10 B).

Während das Amnion den Embryo überwandert, wird die *cactus* Expression entlang der anteriorposterioren Achse in einigen Gruppen von Zellen herunter reguliert (Abb. 3.10 C), während die terminalen Domänen die Expressionsstärke beibehalten.

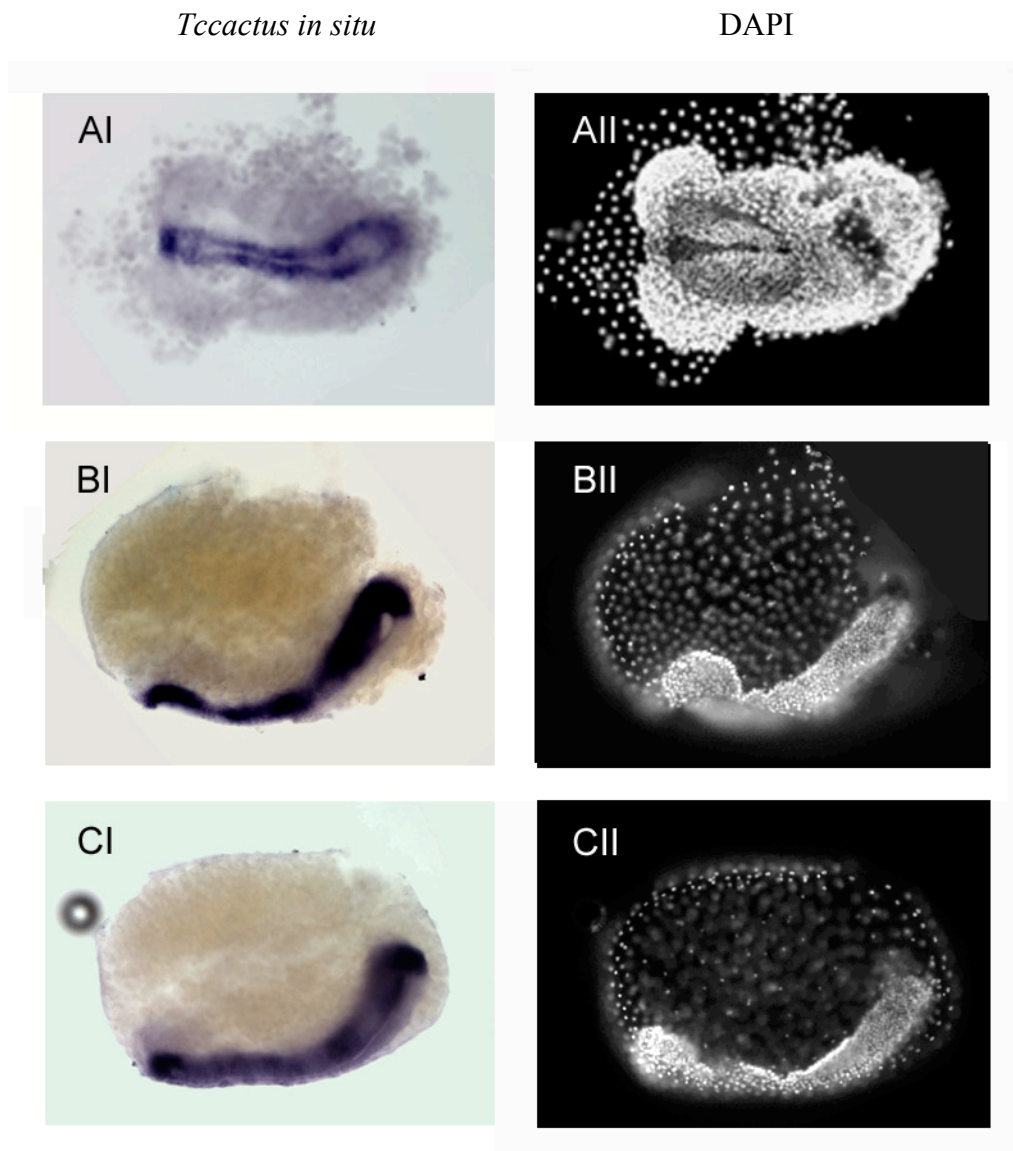


Abb3.10: Expression von *Tccactus* mRNA während der Einwanderung des Keimstreifs. A und B zeigen je einen Embryo während der Wanderung des Amnions über den Keimstreif, CI, CII zeigt einen Embryo kurz nach dem Schluss des Serosafensters. AII bis CII zeigen DAPI-Färbungen der Embryonen in AI bis CI. Gezeigt sind jeweils ventrale Ansicht (A) und laterale Ansichten (B und C), anterior ist links.

3.3.3 Expression während der Keimstreifausstreckung

Bereits kurz vor dem Schluss des Serosafensters lässt sich deutlich die Modulation der *cactus* Expression entlang der anteriorposterioren Achse erkennen (Abb.3.11 A, vgl. Abb.3.10 C): Zu diesem Zeitpunkt ist die *cactus* mRNA in zwei longitudinalen Streifen zu beiden Seiten des Mesoderms detektierbar. Hierbei lassen sich entlang der anterior-posterioren Achse vier Domänen deutlicher Expression unterscheiden, die von Regionen unterbrochen werden, in denen die Expression von *cactus* herunter reguliert worden ist (Abb.3.11 A und B). Die am weitesten anterior gelegene Expression starker *cactus* Expression findet sich in der medialen

Region zwischen den Kopflappen. Weiter posterior finden sich eine größere und eine kleinere Region mit *cactus* mRNA Expression. Die vierte, am weitesten posterior lokalisierte Domäne ist im Bereich der Wachstumszone lokalisiert.

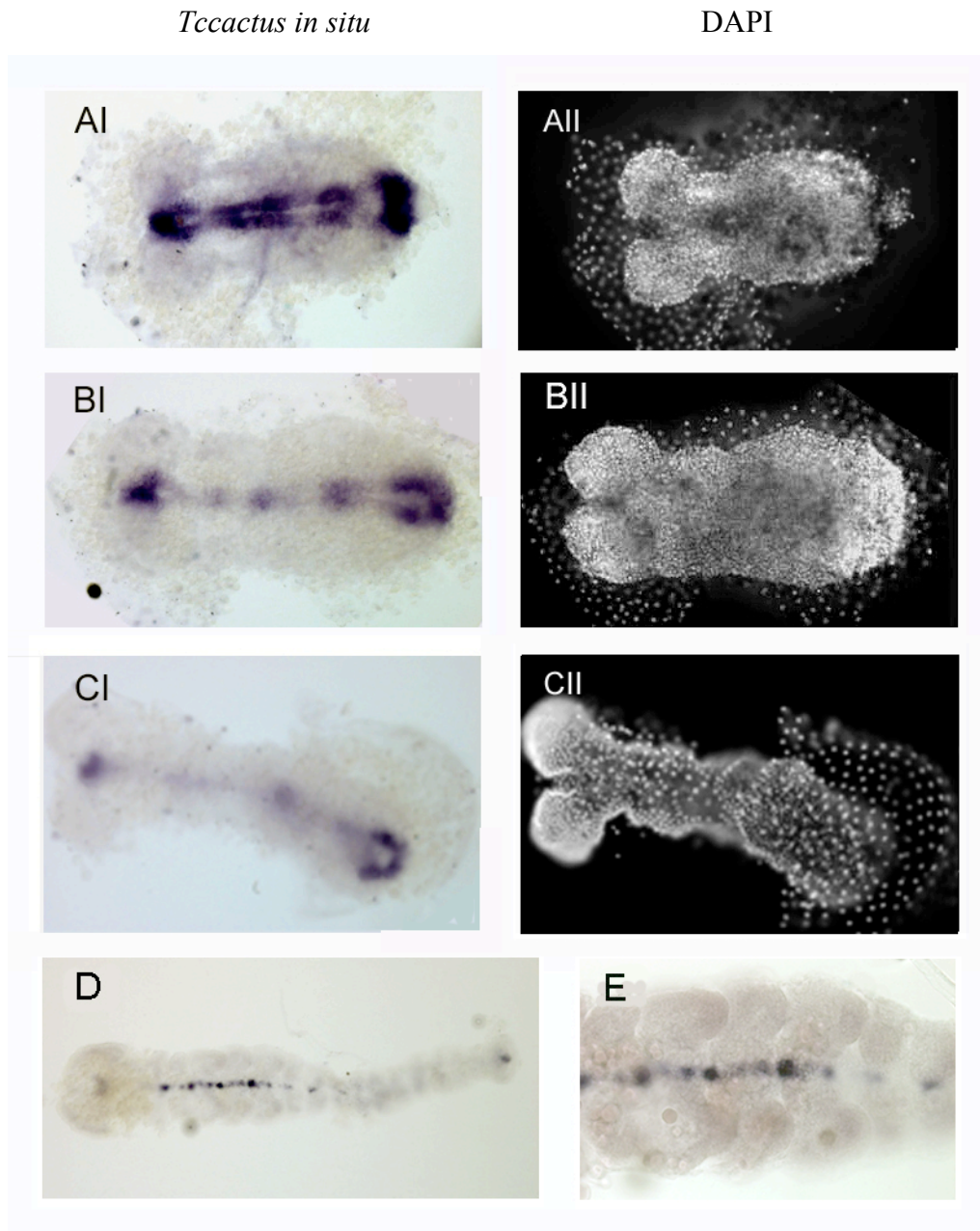


Abb3.11: Expression von *Tccactus* mRNA in Stadien der Keimstreifelongation. A zeigt einen Embryo kurz vor dem Schluss des Serosafensters, B,C zeigen wenig späteres Stadium. D zeigt einen Embryo mit maximal elogniertem Keimstreif. E stellt eine Ausschnittvergrößerung der thorakalen Region des Embryos in D dar. AII-CII zeigen DAPI Färbungen der Embryonen in AI-CI. Gezeigt sind jeweils Ventralansichten präparierter Embryonen, anterior ist jeweils links.

Zu Beginn der Keimstreifausstreckung wird diese Expression weiter verfeinert: Während die terminalen Domänen zwischen den Kopflappen und in der Wachstumszone beibehalten werden, wird die Expression von *Tccactus* in den mittleren Körperregionen allgemein herab reguliert; dabei trennt sich die anteriore der beiden Domänen im Bereich zwischen Kopf und Wachstumszone in zwei kleinere Regionen schwacher Expression auf, während die posteriore der beiden frühen Regionen *cactus* zunächst weiterhin exprimiert (Abb.3.11 B). In dieser Region ist die Einwanderung des Mesoderms noch nicht abgeschlossen. Daher finden sich hier noch teilweise zwei Reihen von *cactus* exprimierenden Zellen, während weiter anterior beide lateralen Domänen zu einer Zellgruppe zusammengeschmolzen sind.

In späteren Stadien verschwindet die Expression in den mittleren Körperregionen völlig, lediglich zwischen den Kopflappen und in der Nähe der Wachstumszone wird *cactus* weiterhin exprimiert, jedoch deutlich schwächer als zuvor (Abb.3.11 C). Die halbkreisförmige Domäne in der Region der Wachstumszone ähnelt in ihrer Form sehr der Expressionsdomäne von *Tcbrachyenteron* in der Anlage des Hinterdarms (Kispert *et al.*, 1994 und R. Schröder, persönliche Mitteilung). In Analogie hierzu könnte die für *Tccactus* gezeigte Domäne ebenfalls der Hinterdarmanlage entsprechen.

Ein weiterer Puls von *Tccactus* Expression zeigt sich in Embryonen mit maximal elongiertem Keimstreif: Hier wird *cactus* in einem schmalen Streifen von Zellen entlang der ventralen Mittellinie exprimiert (Abb.3.11 D). In diesem Stadium beschränkt sich die linienförmige Expression auf die Segmente des Kopfes und des Thorax. Hierbei findet sich in jedem Segment ein Fleck besonders starker Expression an der anterioren Grenze des jeweiligen Segmentes (Abb.3.11 E). In anterioren Abdominalsegmenten zeigt sich dagegen nur jeweils ein Fleck von *Tccactus* Expression (Abb.3.11 D; Pfeile). Die posteriore Expressionsdomäne in der terminalen Region des Embryos bleibt auch in diesen Stadien erhalten, während die anteriore Domäne nun verschwunden ist.

3.3.4 Maternale Expression von *Tccactus*

In *Drosophila* lassen sich neben zygotischen auch maternale Transkripte des *cactus* Gens in frühen Embryonen nachweisen (0-2 Stunden nach Eiablage; Geisler *et al.*, 1992). Da in frühen *Tribolium* Embryonen *cactus* offensichtlich ausschließlich zygotisch exprimiert wird, wurden präparierte Ovarien von *Tribolium castaneum* mit der *cactus* mRNA Sonde hybridisiert, um eine eventuelle Aktivierung des *Tccactus* Gens während der Oogenese nachzuweisen.

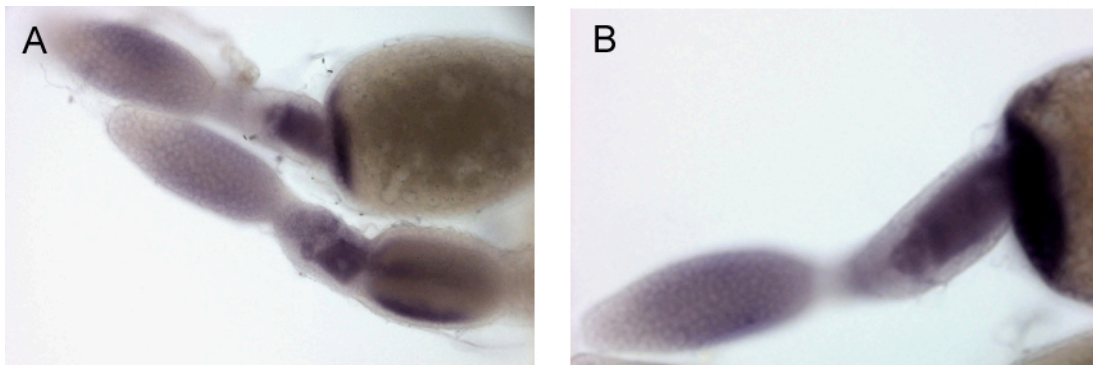


Abb3.12: Expression von *Tccactus* mRNA während der Oogenese. Fotos zeigen verschiedene Ovarien mit Oozyten in leicht unterschiedlichen Stadien. A zeigt 200fache, B 300fache Vergrößerung. Anterior ist jeweils links.

Tatsächlich lässt sich *Tccactus* Expression in Ovarien detektieren (siehe Abb.3.12): Während die jüngsten, proximalen Oozyten noch keine *Tccactus* Transkripte zeigen, findet sich die mRNA in den weiteren, älteren Oozyten jeder Ovariolen. Zudem wird der Bereich des Germariums schwach gefärbt, in dem sich die Nährzellen befinden (Ullmann, 1973). In den ältesten Oozyten der jeweiligen Ovariolen ist *cactus* mRNA nur im anterioren Bereich sichtbar. Jedoch zeigen diese Oozyten bereits eine starke Akkumulation von Dotter-proteinen. Daher ist es wahrscheinlich, dass hier nur die in die Oozyten einströmende RNA deutlich erkennbar detektiert wird und sich vom anterioren Bereich auf die gesamte Oozyte verteilt, wo sie aufgrund der geringeren lokalen Konzentration nicht nachweisbar ist.

Innerhalb des Follikelepithels konnte in keinem der analysierten Stadien eine Expression von *Tccactus* nachgewiesen werden.

3.3.5 RNAi mit *Tcactus*

Zur Klärung der Funktion von *TcCactus* wurde parentale RNAi mit einer 308bp großen dsRNA durchgeführt, die dem 5'-Bereich der isolierten cDNA entspricht. In drei unabhängigen Versuchsansätzen wurde *cactus* dsRNA in Konzentrationen von entweder 1,5 µg/µl, 0,7 µg/µl sowie 0,4 µg/µl in weibliche Puppen injiziert. Tabelle 3.2 zeigt die Anzahlen der injizierten Weibchen, sowie die Schlüpf- und die Überlebensrate der einzelnen Versuchsansätze.

Konz. dsRNA	Anzahl der injizierten Puppen	Schlupf (%)	Überlebensrate nach 4 Tagen (%)	Überlebensrate nach 6 Tagen (%)
--	81 Männchen	65 (80,2%)	65 (80,2%)	65 (80,2%)
1,5 µg/µl	119	87 (73,1%)	2 (2,3%)	0
0,7 µg/µl	44	36 (81,8%)	8 (18,2%)	0
0,4 µg/µl	51	39 (76,5%)	10 (19,6%)	0

Tabelle 3.1: dsRNA Injektionen mit *Tcactus* RNA. Zeile 1 zeigt die Vergleichswerte für die Kontrolle (uninjizierte Wildtyp-Männchen), Zeilen 2 bis 4 die Zahlen der injizierten Puppen, sowie die jeweiligen Überlebensraten der Versuchsansätze mit verschiedenen Konzentrationen von *Tcactus* dsRNA. In Klammern sind die prozentualen Anteile angegeben.

Es zeigt sich, dass die Injektion von *cactus* dsRNA in allen drei Ansätzen zu kompletter Letalität der injizierten Weibchen innerhalb von 6 Tagen nach Injektion führt. Dem gegenüber entspricht die Schlüpfrate der Weibchen vergleichbaren Raten bei Injektionen mit *Tcdorsal* dsRNA oder Kontrollinjektionen mit Wasser (nicht gezeigt). Die Salzkonzentration der *cactus* dsRNA entsprach in allen drei Ansätzen der für *Tcdorsal* Injektionen verwendeten Konzentration.

Ebenso trat bei den uninjizierten Männchen, mit denen die Weibchen direkt im Anschluss an den Schlupf gekreuzt wurden, keine erhöhte Letalität auf, was eine Kontamination oder eine allgemeine verringerte Vitalität durch eventuell im Mehl befindliche Pathogene ausschließt. Somit handelt es sich bei der beobachteten Letalität um eine spezifische Reaktion auf die Injektion der *cactus* dsRNA. Während der 6 Tage bis zum Verlust sämtlicher Weibchen konnten keine Eier gewonnen werden.

3.4 Funktionelle Analyse von *Tcdorsal*

Tribolium Dorsal bildet in Blastodermstadien ähnlich seinem *Drosophila* Homolog einen Kerngradienten aus, mit höchsten Konzentrationen im zukünftigen ventralen Bereich des Embryos und abnehmenden Kernkonzentrationen in lateralen Regionen, während es im dorsalen Bereich des frühen *Tribolium* Embryos fast ausschließlich im Zytoplasma vorliegt (Chen et al., 2000; vgl. Abb.1.2). Diese Analogie in der Expression legt eine Konservierung zumindest von Aspekten der Funktionen von DmDorsal in der Etablierung und Unterteilung der Dorsoventralachse des Embryos nahe. Zu diesem Zweck wurde die Funktion von *Tcdorsal* im *Tribolium* Embryo mit Hilfe parentaler RNAi eingehend untersucht. Hierzu wurde doppelsträngige *Tcdorsal* RNA (*dsTcdl*) in weibliche Puppen injiziert und diese bis zum Schlupf der Imago aufgezogen. Diese Weibchen wurden anschließend direkt mit Wildtyp-Männchen gekreuzt und deren Nachkommenschaft analysiert. Die parentale RNAi wurde Injektionen in Embryonen vorgezogen, da zum einen die Injektion für die zu analysierenden Embryonen schonender ist und deshalb nicht-spezifische Effekte vermindert bzw. ausgeschlossen werden können, zum anderen, da *Tcdorsal* mRNA bereits maternal in die sich entwickelnde Eizelle abgelagert wird (Chen et al., 2000) und die parentale RNAi auch die Ausschaltung maternalen Komponenten erlaubt.

Die im folgenden aufgeführten Ergebnisse sind, soweit nicht anders vermerkt, das Resultat von Injektionen mit *Tcdl* dsRNA in einer Konzentration von 1,0 µg/µl.

Zum einfachen Verständnis werden im folgenden Embryonen, die aus Eiern hervorgehen, welche von mit *Tcdorsal* dsRNA injizierten Weibchen gelegt wurden, als „*Tcdl* RNAi Embryonen“ bezeichnet.

3.4.1 Defekte in der Morphologie von *Tcdl* RNAi Embryonen

Um festzustellen, welchen Einfluss TcDorsal auf die Spezifizierung der embryonalen Achsen hat, wurde die DNA der Zellkerne von *Tcdl* RNAi Embryonen mit DAPI angefärbt.

Bereits während des Blastodermstadiums unterscheiden sich *Tcdl* RNAi Embryonen von Wildtypembryonen gleichen Stadiums klar aufgrund einer veränderten Verteilung von Serosa und Keimanlage. Während im Wildtyp die Keimanlage sich auf die ventrale Hälfte der posterioren Seite des Eies beschränkt, erscheint die Anlage im *Tcdl* RNAi Embryo symmetrisch, die Zellen der Keimanlage kondensieren über den gesamten Umfang der posterioren

Hälfte (Abb 3.13 A, B). Einen identischen Effekt kann man bei RNAi Experimenten mit *TcToll* beobachten (Abb.3.13 C).

Zwar bilden sich aus solchen symmetrischen Anlagen Keimstreifen, diese zeigen jedoch keine mehrschichtige Organisation, stattdessen bilden diese Embryonen einschichtige Hohlschläuche aus, die keine Anzeichen einer dorsoventralen Differenzierung erkennen lassen und komplett apolar erscheinen (Abb.3.14 C und D). So sind sowohl erkennbare Kopfstrukturen, als auch Beinanlagen nicht vorhanden. Jedoch erfolgt die Spezifizierung der Keimanlage offensichtlich unabhängig von Dorsal, benötigt also keine dorsoventrale Information.

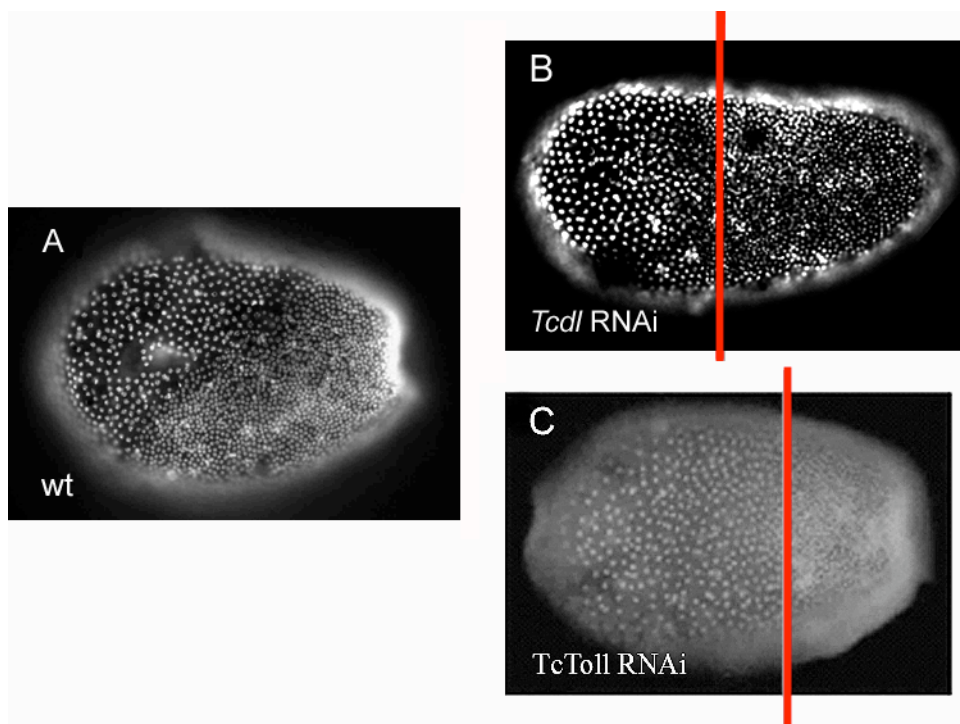


Abb.3.13: DAPI Färbungen von frühen Wildtyp und *Tcdl* RNAi Embryonen. A zeigt einen Wildtyp Embryo. In B ist ein *Tcdl* RNAi Embryo in ähnlichem Stadium gezeigt. Die Grenze zwischen präsumptiven Serosazellen und den Zellen der Keimanlage verläuft symmetrisch im Vergleich zur dorsoventralen Achse. C zeigt einen vergleichbaren *TcToll* RNAi Embryo (Foto aus Basal, 2004).

Da diese Phänotypen möglicherweise auch aufgrund einer fehlerhaften AP-Achsen Festlegung entstehen könnten, wurden dieselben Embryonen auf die Proteinexpression des Segmentpolaritätsgens *Engrailed* als Marker für die AP-Achse hin untersucht (Abb.3.14).

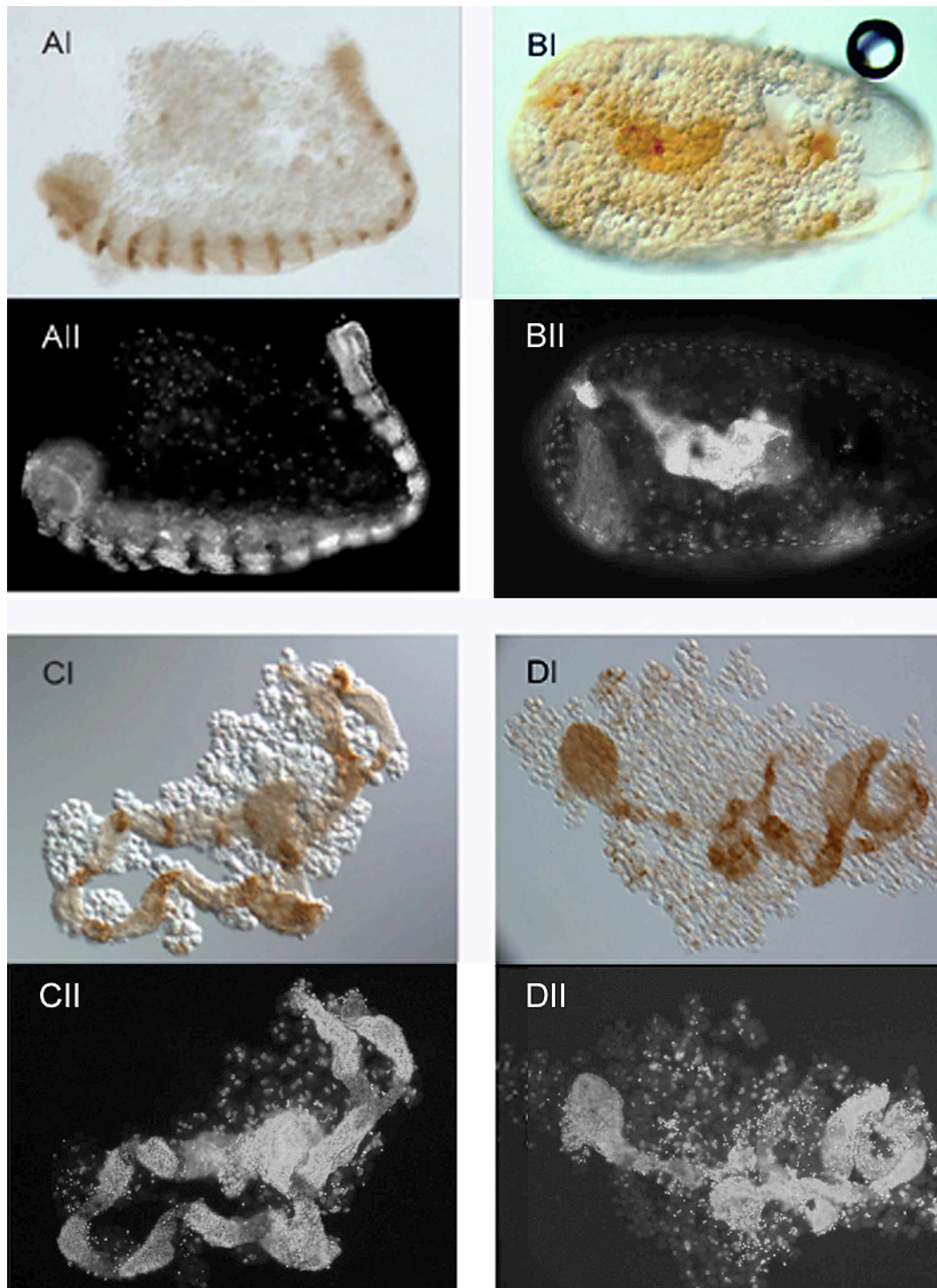


Abb 3.14: Engrailed-Antikörperfärbung an Wildtyp bzw. *Tcdl* RNAi Embryonen. Gezeigt ist jeweils die lichtmikroskopische Aufnahme eines für Engrailed gefärbten Embryos, sowie die zugehörige Aufnahme einer DAPI-Färbung desselben Embryos. A zeigt die Gesamtpräparation eines Wildtyp Embryos im Stadium der vollständigen Keimstreifausstreckung. B zeigt die Gesamtansicht eines *Tcdl* RNAi Embryos, C und D jeweils aus den Eihüllen präparierte Embryonen, In B ist aufgrund der dreidimensionalen Anordnung nur ein Teil des Embryos sichtbar.

Trotz der vom Wildtyp abweichenden Morphologie exprimieren die einschichtigen *Tcdl* RNAi Embryonen *Engrailed* in einem Streifenmuster (Abb.3.14 B-D). Präpariert man diese *Tcdl* RNAi Embryonen aus ihren Eihüllen, so zeigt sich, dass *Engrailed* in diesen Schläuchen weiterhin in Streifen exprimiert wird, die in der Gesamtzahl von 16 Streifen (Brown *et al.*, 1994) dem Wildtypmuster entsprechen (vgl. Abb.3.14 A und C). Die *Tcdl* RNAi Embryonen gleichen hierbei in Morphologie und im Expressionsmuster von *Engrailed* stark dorsalisierten Embryonen aus *Drosophila melanogaster*. Ebenfalls wird das *Even-skipped* Protein weiterhin dynamisch in einem segmentalen Streifenmuster exprimiert (Daten nicht gezeigt). Dies zeigt, dass die in *Tcdl* RNAi Embryonen beobachteten RNAi Effekte offensichtlich nicht auf Defekte in der Segmentierung zurückzuführen ist.

Gleichfalls erscheint die in solchen Embryonen beobachtete Serosa wildtypisch, da sowohl im Blastodermstadium die Kerne der Serosazellen augenscheinlich polyploid sind, da sie in den DAPI-Färbungen deutlich größer erscheinen als die Kerne der Keimanlage als auch, da die Serosa in Stadien der Keimstreifausstreckung wie im Wildtyp den gesamten Embryo umschließt (Abb 3.14 B). Auch sind wie im Wildtyp die Serosazellen selbst deutlich größer als die Zellen der Keimanlage, was sich in den DAPI-Färbungen durch eine größere Entfernung der einzelnen Serosakerne voneinander ausdrückt.

3.4.2 Die Wachstumszone in dorsalisierten Embryonen

Die Erzeugung der wildtypischen Anzahl von Segmenten in *Tcdl* RNAi Embryonen setzt voraus, dass in Abwesenheit von TcDorsal eine Wachstumszone angelegt wird, die in diesen Embryonen auch aktiv ist und neue Segmente generieren kann. Zur Klärung der Frage, wie die Wachstumszonen der schlauchförmigen *Tcdl* RNAi Embryonen aufgebaut sind, wurden solche Embryonen mittels eines Antikörpers gegen phosphoryliertes Tyrosin, der die Markierung von Zellmembranen ermöglicht, sowie mit DAPI und Toto-3 zur DNA-Markierung gefärbt. Das Resultat ist in Abb.3.15 dargestellt.

Es lässt sich zeigen, dass die posteriore Wachstumszone der einzige Bereich in *Tcdl* RNAi Embryonen ist, der eindeutig ein mehrschichtiges Gewebe ausbildet (Abb.3.15 D und G). Jedoch zeigen die Wachstumszonen in diesen Embryonen eindeutig weniger Zellschichten als die Wachstumszone in Wildtyp-Embryonen (vgl. Abb.3.15 D, G und K). Demgegenüber sind mediale und anteriore Bereiche der Embryonen in Form eines einschichtigen Epithels aus zumeist palisadenförmigen Zellen organisiert (Abb.3.15 A, B).

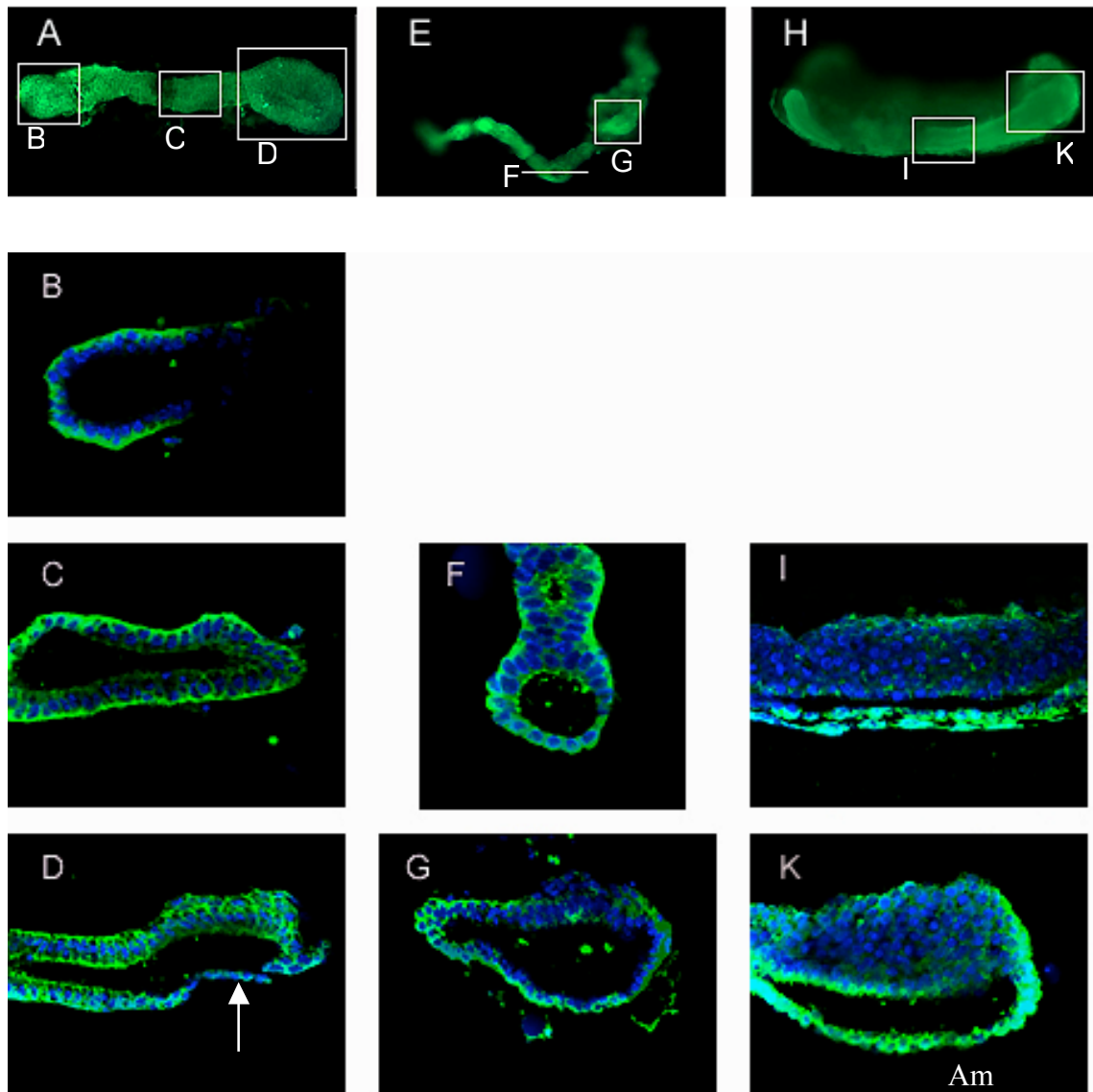


Abb3.15: Antikörperfärbungen gegen phosphoryliertes Tyrosin (pTyr; grün) und DNA-Färbung mittels Toto-3 Iodid (blau) an *Tcdl* RNAi (A-G) bzw. Wildtyp-Embryonen (H-K). Gezeigt sind jeweils eine lichtmikroskopische Aufnahme eines *Tcdl* RNAi Embryos in einem mittleren (A) und einem späten Stadium (E), bzw. eines Wildtyp-Embryos im Stadium der mittleren Keimstreifenausstreckung (H). Die weiteren Bilder zeigen optische, konfokale Längsschnitte der in A, E, H markierten Bereiche der entsprechenden Embryonen bis auf (F), das einen Querschnitt durch den medialen Bereich des Embryos in (E) zeigt. Anterior ist jeweils links.

Im Wildtyp ist die der Amnionhöhle zugewandte Zellschicht der Wachstumszone epithelial organisiert, während weiter dorsal gelegene Zellschichten mesenchymalen Charakter zeigen. Auch in *Tcdl* RNAi Embryonen besitzt die Zellschicht, die der Körperhöhle zugewandt ist, epitheliales Aussehen, während die weitere Schichten in der Wachstumszone mesenchymal erscheinen (Abb.3.15 D).

Auch eine klare Trennung des Amnions von der Keimanlage ist in *Tcdl* RNAi Embryonen nicht eindeutig nachzuweisen, jedoch erscheinen die Zellen, die in der Wachstumszone dem

mehrschichtigen Bereich gegenüber liegen, flacher als die Zellen des eigentlichen Embryos (Abb.3.15 D; Pfeil). Auch in Wildtyp-Embryonen erscheint das Amnion als flache Zellschicht auf der ventralen Seite des Embryos (Abb.3.15, K). Somit ist nicht sicher, ob es sich bei der Körperhöhle der *Tcdl* RNAi Embryonen ebenfalls tatsächlich um eine Amnionhöhle handelt.

3.4.3 Expression mesodermaler Gene

Sowohl *twist* als auch *snail* werden in *Drosophila* ab dem Blastodermstadium im zukünftigen Mesoderm exprimiert. Hierbei wirkt *twist* als Selektorgen, es wird zur Determinierung des Mesoderms benötigt, während *snail* Gene, die zur Festlegung auf ein neuronales Schicksal hin führen würden, im Bereich des Mesoderms reprimiert (Leptin, 1991; Ip *et al.*, 1992b).

Auch in *Tribolium* werden sowohl *Tctwist* als auch *Tcsnail* im Mesoderm exprimiert (Sommer und Tautz, 1994; Abb.3.16 A, C, E). Da in *dl* Mutanten in *Drosophila* die Expression sowohl von *twist* als auch von *snail* verhindert wird, und die Wildtypexpression der beiden Gene durch hohe Kernkonzentrationen von Dorsal aktiviert wird, wurde im folgenden untersucht, ob *Tcdl* RNAi Embryonen noch beide Gene exprimieren.

Es zeigt sich, dass bereits in frühen Stadien die Expression von *twist* unterbleibt (Abb.3.16 B). Dies ist sowohl bei Injektionen mit 1,0 als auch mit 0,6 µg/µl dsRNA der Fall, somit reicht eine etwas geringere Konzentration an *Tcdl* dsRNA bereits nicht mehr aus, um die Expression mesodermaler Gene zu ermöglichen (nicht gezeigt).

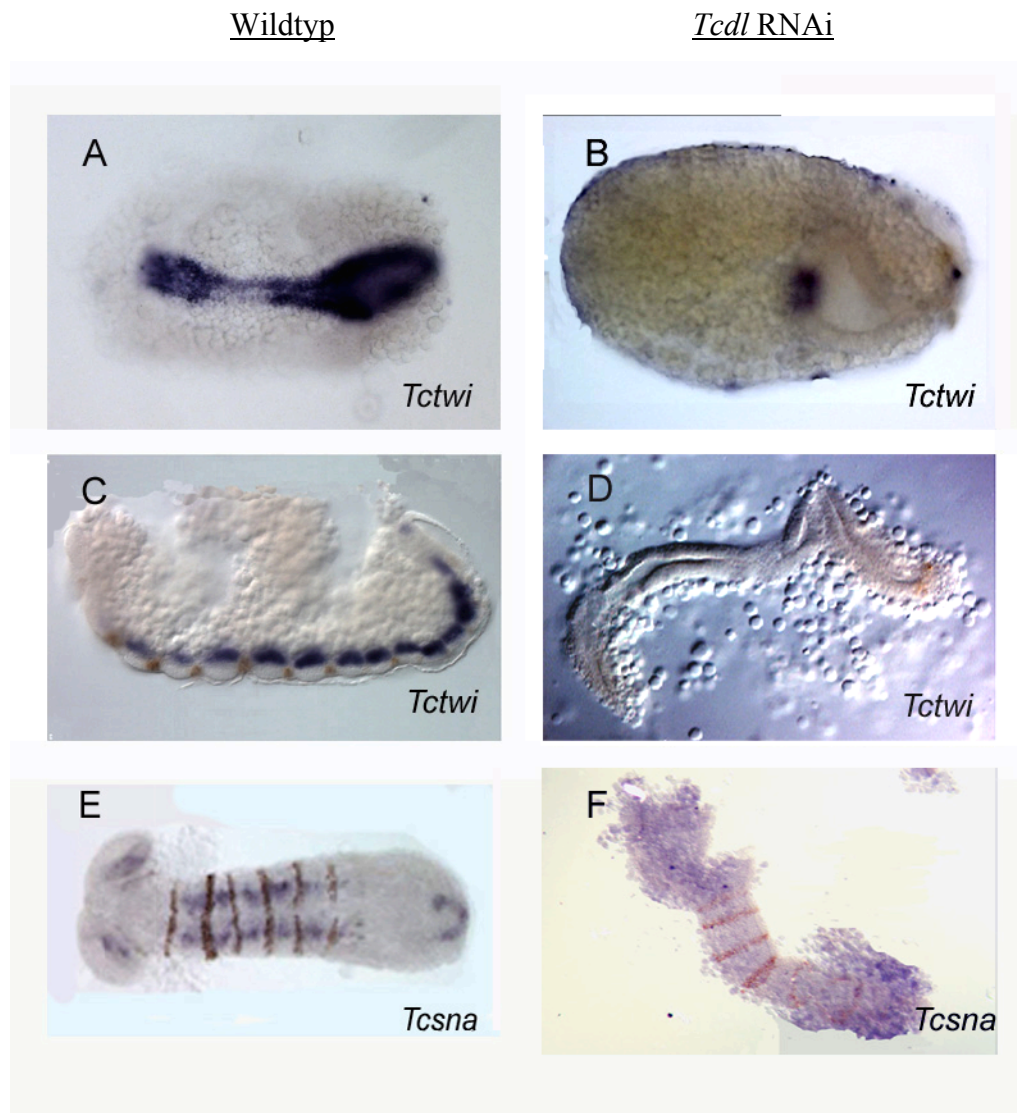


Abb. 3.16: Expression von *Tctwist* (A-D) und *Tcsna* (E,F) in Wildtyp und *Tcdl* RNAi Embryonen. Gezeigt sind Wildtyp (A, C, E) und *Tcdl* RNAi Embryonen in ähnlichen Stadien (B, D, F). Die Embryonen in C, E, F sind zusätzlich gefärbt mit anti-En Antikörper. B, C und D zeigen laterale Ansichten, A, E und F zeigen ventrale Ansichten.

Bereits während der frühen Keimstreifinvagination lässt sich jedoch eine schwache Expression von *Tctwist* am posterioren Ende des Keimstreifs in etwa der Hälfte der analysierten Embryonen erkennen (Abb.3.16 B; diese Region liegt im Vergleich zu den Achsen des Eies am weitesten anterior, da der Embryo mit dem posteriore Ende zuerst einwandert; bzw. beim Wildtyp dieses Ende zuerst vom Amnion überwandert wird).

Bei voll ausgestrecktem Keimstreif werden sowohl *twist* als auch *snail* in weiten Regionen des Embryos nicht exprimiert (Abb.3.16 D und F). Allerdings fand sich am posterioren Ende immer noch eine schwache Expression von *twist* mRNA wie auch Protein in einer kleinen Gruppe von Zellen im terminalen Bereich (Abb.3.16 D; anti-TcTwist Färbung). Dieser Aspekt wurde für *snail* nicht beobachtet, jedoch kann eine Expression von *snail* mRNA

unterhalb der Detektionsschwelle in diesen Zellen nicht ausgeschlossen werden. Dies könnte auch erklären, warum nur etwa 50% der *Tcdl* RNAi Embryonen eine terminale *Tctwist* Expression erkennbar war. Andererseits kann es sich hierbei auch um einen schwächeren Phänotyp handeln, als in Embryonen, in denen diese Expressionsdomäne vollständig fehlt, jedoch fanden sich hierfür keine morphologischen Hinweise.

3.4.4 Expression von lateralen Markergenen

In *Drosophila* werden sowohl *short gastrulation* als auch *ventral nervous system defective* (*vnd*) jeweils in einem Streifen im präsumptiven neurogenen Ektoderm zu beiden Seiten des Mesoderms exprimiert. Hierbei wird *sog* in einem ca. 8 Zellen breiten Streifen, *vnd* in einem 4-5 Zellen umfassenden Streifen im ventralen Bereich der *sog* exprimierenden Region angeschaltet (Stathopoulos und Levine, 2002a). In *Tribolium* wurde mit Hilfe degenerierter Primer PCR ein Homolog zu *sog* kloniert (Stockhammer, 2003). *Tcsog* wird wie *Dmsog* in Bereichen beiderseits des Mesoderms exprimiert, jedoch dehnt sich die Expression im Gegensatz zu seinem *Drosophila* Homolog auch auf das zukünftige Mesoderm aus (Stockhammer, 2003, Abb. 3.17 A).

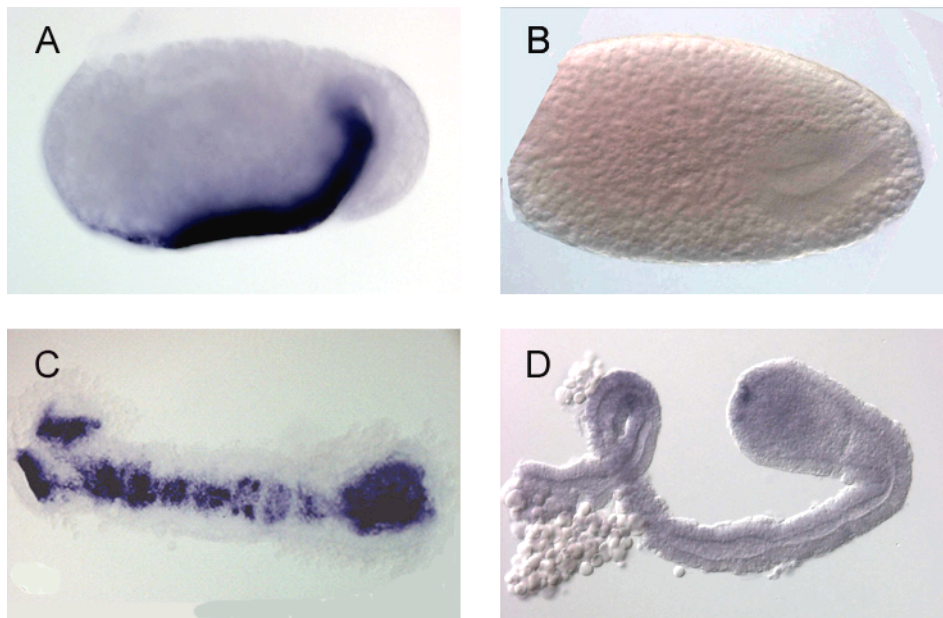


Abb.3.17: Expression von *Tcsog* in Wildtyp (A,C) und *Tcdl* RNAi Embryonen (B,D). Gezeigt sind Stadien der frühen Keimstreifinvagination (A und B), sowie Embryonen in Stadien der Keimstreifausstreckung (C und D).

Ähnlich zur Expression mesodermaler Gene wird auch *Tcsog* in *Tcdl* RNAi Embryonen in frühen Stadien weder ventral noch in lateralen Regionen exprimiert (Abb 3.17 B). Dagegen zeigen mutante Embryonen in späteren Stadien in einigen Zellen, die vermutlich innerhalb des terminalen Segmentes lokalisiert sind, schwache Expression von *Tcsog* (Abb. 3.17 D). Der Rest des Embryos bleibt jedoch auch in diesen Stadien frei von *Tcsog* mRNA. Im Gegensatz zur terminalen Expression von *Tctwist* findet sich die terminale Expression von *Tcsog* in sämtlichen betrachteten Embryonen (nicht gezeigt).

Das *Tribolium* Homolog zu *vnd* wird wie sein Gegenpart aus *Drosophila* in longitudinalen Streifen im Neuroektoderm exprimiert (Wheeler, S. und Skeath, J., nicht publiziert). Diese Streifen sind jedoch schmaler als diejenigen der *Tcsog* Expression. Sie liegen in frühen Stadien getrennt von einander zu beiden Seiten des Mesoderms, mit Beginn der Gastrulation gelangen diese Streifen jedoch in räumliche Nachbarschaft zu einander und bilden in älteren Segmenten einen Streifen, während in jungen Segmenten, in denen das Mesoderm noch nicht eingewandert ist, noch zwei laterale Streifen vorhanden sind.

Auch für *Tcvnd* lässt sich in *Tcdl* Embryonen ausschließlich innerhalb der Wachstumszone eine Expression nachweisen, während sämtliche anderen Zellen frei von Expression bleiben (Abb.3.18).

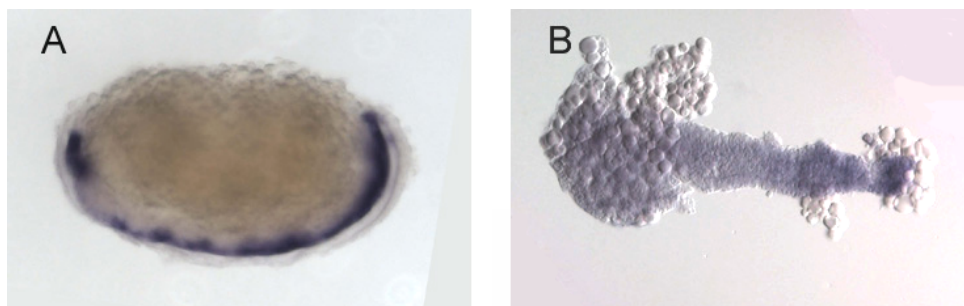


Abb.3.18: Expression von *Tcvnd* während des Stadiums der Keimstreifelongation, in Wildtyp (A) und einem *Tcdl* RNAi Embryo in einem vergleichbaren Stadium. Anterior ist jeweils rechts.

3.4.5 *dpp* und *zen* als Marker für extraembryonales Gewebe

In *Tribolium* existieren zwei zu *Dmzerknüllt* homologe Gene. In frühen Stadien der Embryonalentwicklung wird *Tczen1* in einer anterior-dorsalen Kappe exprimiert (Abb.3.19 A). Aus diesen Zellen gehen später die Serosazellen hervor (Falciani *et al.*, 1996). *Tczen2* zeigt in frühen Stadien ein zu *Tczen1* identisches Expressionsmuster (Abb.3.19 C).

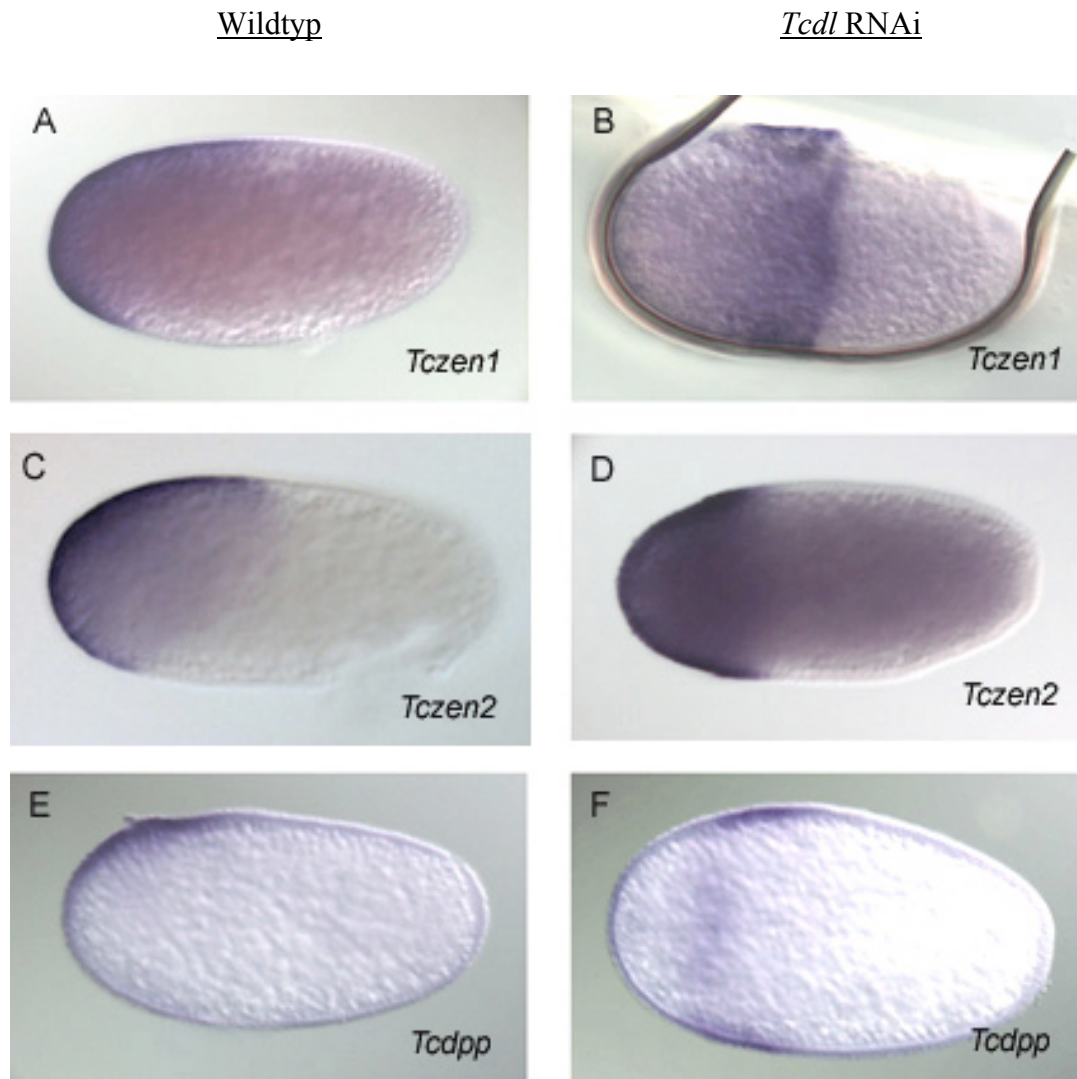


Abb.3.19: mRNA Expression von *Tczen1* (A, B), *Tczen2* (C,D) und *Tcdpp* (E,F) in Wildtyp und *Tcdorsal* RNAi Embryonen. Laterale Ansichten. Anterior ist jeweils links, dorsal ist oben.

Sowohl für *zen1* als auch für *zen2* lässt sich nachweisen, dass die frühe Expression in einer anterioren Kappe erhalten bleibt (Abb.3.19 B, D). Die dorsale Grenze der Expressionsdomäne beider Gene bei ca. 55% Eilänge verschiebt sich dabei nicht. Jedoch ist die ventrale Grenze beider Expressionsmuster deutlich in Richtung posterior verschoben (von 80% nach 50-60% Eilänge), so dass die Expressionsdomäne nun eine symmetrische Kappe im

anterioren Drittel bzw. in der anterioren Hälfte des frühen Embryos ausbildet. Die genaue Lage der ventralen Expressionsgrenze unterscheidet sich leicht zwischen verschiedenen Embryonen (vgl. Abb.3.19 B und D), jedoch lassen sich zwischen beiden *zen* Genen keine spezifischen Unterschiede feststellen.

Das *Tribolium* Homolog zu *Drosophila dpp* zeigt ebenfalls ein frühes Expressionsmuster in Form einer anterioren Kappe (Abb.3.19 E). Später verfeinert sich die Expressionsdomäne zu einem Streifen von Zellen an der Grenze zwischen Serosazellen und der Anlage des eigentlichen Embryos (Chen *et al.*, 2000). In *Tcdl* RNAi Embryonen findet sich *dpp* mRNA in einer symmetrischen anterioren Expressionsdomäne, die vergleichbare Ausmaße zur Expression von beiden *Tezen* Genen besitzt (Abb.3.19 F). Eine spätere Expression an der symmetrischen Grenze zwischen Serosa und Keimanlage konnte dagegen nicht beobachtet werden.

3.4.6 Klärung des Zellschicksals in *Tcdl* RNAi Embryonen

Die Abwesenheit mesodermaler Zellmarker (vgl. 3.4.3) sowie ein Vergleich mit mutanten *dorsal* Phänotypen aus *Drosophila* lassen vermuten, dass die Zellen, die in *Tcdl* RNAi den Embryo bilden, entweder ein ektodermales Schicksal besitzen oder Amnioserosa ähnliche Zellen darstellen.

Zur Klärung dieser Frage wurde die Expression des Gens *Tcpannier* untersucht (das verwendete Konstrukt ist eine freundliche Leihgabe von N. Berns und R. Reuter, unveröffentlicht). In *Drosophila* wird *pannier* neben weiteren Aspekten in frühen Stadien spezifisch in der sich entwickelnden Amnioserosa exprimiert und wird auch für die Beibehaltung der Amnioserosa benötigt (Heitzler *et al.*, 1996; Ashe *et al.*, 2000).

Tcpannier wird im Wildtyp zu Beginn der Ausbildung der Primitivgrube in den dorsalen Zellen der Grube exprimiert (Abb.3.20 A). Diese Zellen gehören zum Amnion, das während der Keimstreifinvagination den eigentlichen Embryo überwandert (Abb.3.20 C). In vergleichbaren Stadien wird in *Tcdl* RNAi Embryonen *Tcpannier* in sämtlichen Zellen innerhalb der Primitivgrube exprimiert (Abb.3.20 B). Auch während der späteren Keimstreifinvagination wird *Tcpannier* in solchen Embryonen in weiten Bereichen, jedoch nicht von allen Zellen des Keimstreifs exprimiert, eine Abgrenzung des Amnions von den Zellen des eigentlichen Embryos ist nicht erkennbar (vgl. Abb.3.20, C und D).

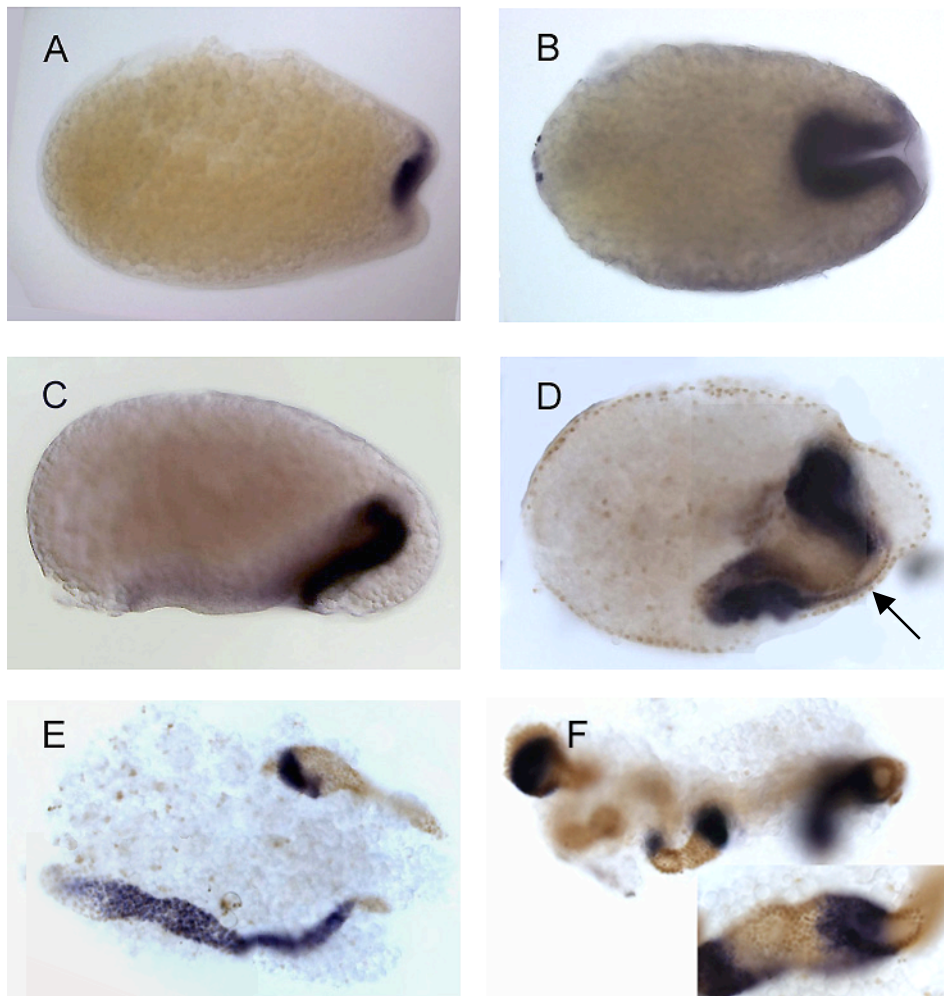


Abb.3.20: *in situ* Hybridisierung gegen *Tribolium pannier*. Gezeigt sind jeweils Wildtypstadien (A,C) und *Tcdl* RNAi Embryonen in verschiedenen Stadien (B, D, E, F). A und B bzw. C und D zeigen in etwa identische Stadien der frühen und späten Keimstreifinvagination. Der Pfeil in D deutet auf eine Gruppe von Zellen, die *Tcpannier* in diesem Stadium nicht exprimieren. E und F zeigen je einen *Tcdl* RNAi Embryo im Stadium des elongierten Keimstreifs, F zeigt zudem eine 400 fache Vergrößerung eines Ausschnitts dieses Embryos.

Die Expression von *Tcpannier* wird in den früh exprimierenden Zellen offensichtlich beibehalten, da in maximal elongierten *Tcdl* RNAi Embryonen in variierendem Ausmaß weiterhin größere Gruppen von Zellen in nicht vorhersagbaren Regionen *Tcpannier* exprimieren. Hierbei findet sich in einigen Embryonen *pannier* Expression in weiten Teilen des Embryos einschließlich der terminalen Region (Abb.3.20 E), während in anderen Embryonen vergleichbarer Stadien *pannier* nur in kleineren Arealen exprimiert wird, die auch unzusammenhängend sein können (Abb.3.20 F). Jedoch ist die Expression nicht auf eine Seite des Embryos beschränkt, sondern erstreckt sich über den ganzen Umfang des Keimstreifs (3.20 F).

3.4.7 Früh exprimierte Marker: *Tc006A12* und *hairy*

Der Klon *Tc006A12* entstammt einer EST-Datenbank (Savard, J., 2003). *Tc006A12* wird im frühen Blastoderm zunächst in einem medialen Ring exprimiert, dieser Aspekt der Expression verfeinert sich zu einem Dreieck, während sich in der Region der Amnionfalte eine zweite Expressionsdomäne ausbildet (Abb.3.21 A). Diese Domäne entwickelt später eine Gap-Gen ähnliche Expression. Da die dreieckige Expressionsdomäne in etwa dem Bereich von Zellen entspricht, in dem in *Tcdl* RNAi Embryonen die Expression von *Tczen* dereprimiert wird, wurde die Auswirkung von *Tcdl* RNAi auf die Expression dieses Markers untersucht.

In frühen *Tcdl* RNAi Embryonen (auch in schwachen Phänotypen, vgl. 3.4.7) bildet sich zwar die posteriore Expressionsdomäne aus, jedoch fehlt die anteriore, dreieckförmige Domäne vollständig (3.21 B). Auch in späteren Stadien, während der Keimstreif-ausstreckung, wo *Tc006A12* in wildtypischen Embryonen sowohl Kopfbereich, als auch in der oben erwähnten Gap-Gen ähnlichen Domäne exprimiert wird, findet sich in *Tcdl* RNAi Embryonen ausschließlich die Gap-Gen Domäne, während der anteriore Bereich von Expression frei bleibt (nicht gezeigt).

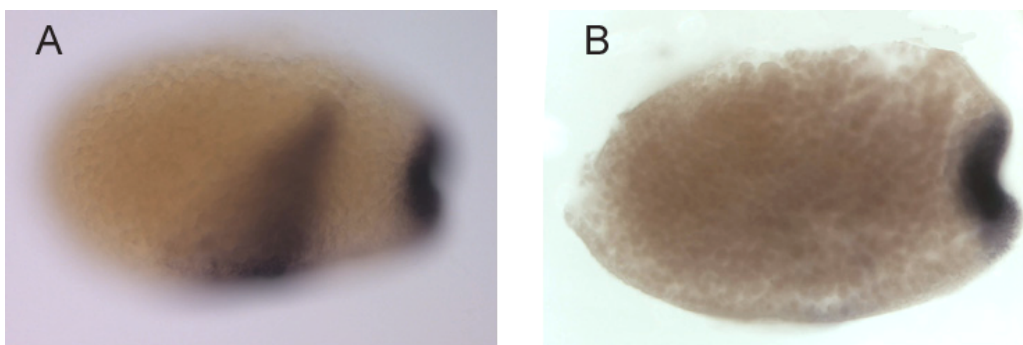


Abb.3.21: Expression von *Tc006A12* in Wildtyp (links) und *Tcdl* RNAi Embryonen (rechts). Gezeigt sind Embryonen im Stadium der Ausbildung der posterioren Primitivgrube.

Tribolium hairy wird mit Beginn des Blastodermstadiums ähnlich dem *Drosophila* Ortholog in einem Streifenmuster exprimiert (Sommer und Tautz, 1993, Abb 3.22). Beginnend mit einem medialen Streifen über den gesamten Umfang des Embryos, werden weitere Streifen in der Wachstumszone erzeugt, die sich im Anschluss in zwei Streifen auftrennen (Eckert et al., 2003). Gleichzeitig wird *hairy* ab frühen Keimanlagenstadien im Bereich der ventralen Mittellinie exprimiert (Eckert et al., 2003; Abb.3.22 C). In späteren Stadien werden von der Wachstumszone weitere *hairy* Streifen produziert, während weiter anterior gelegene Streifen verschwinden.

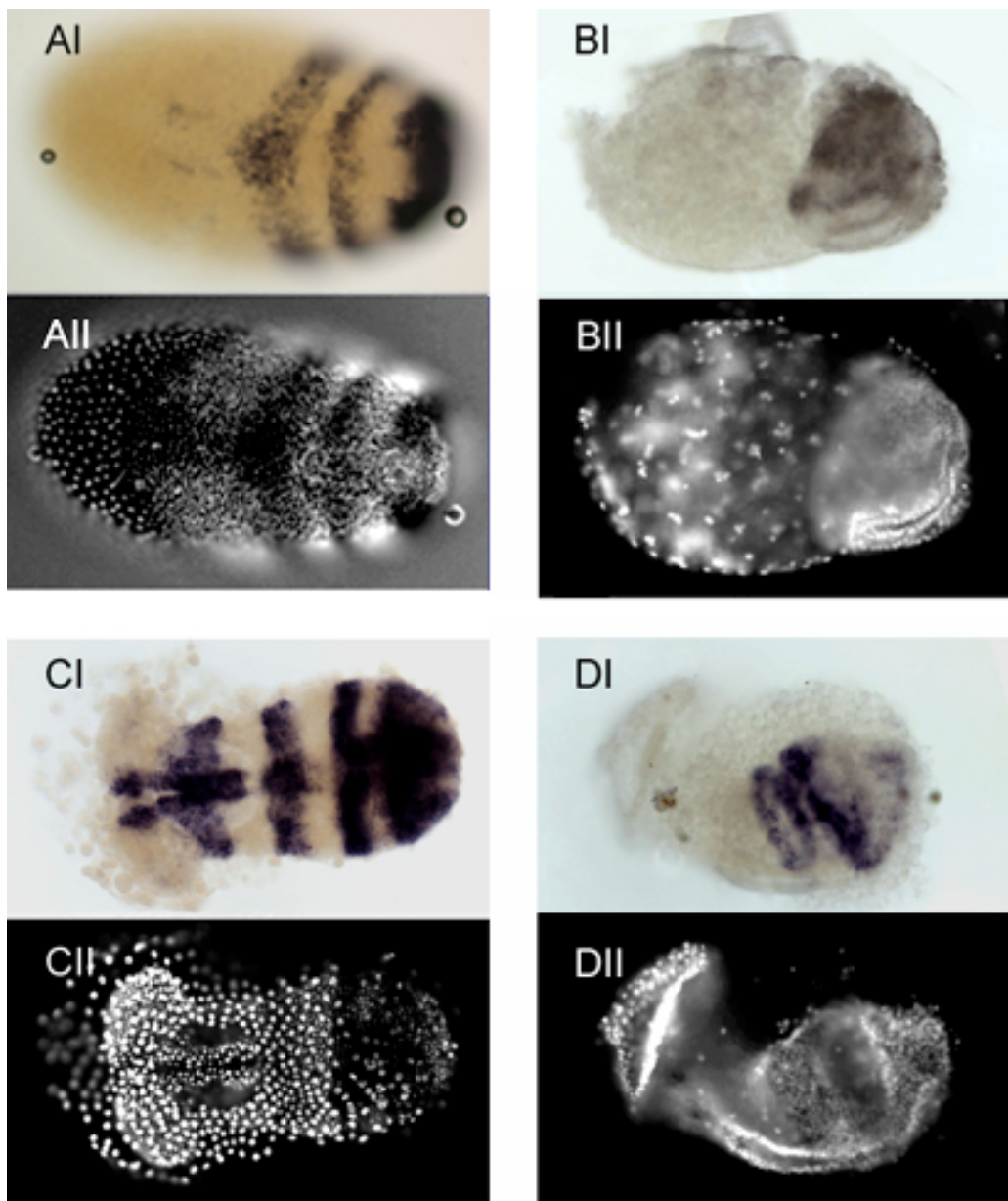


Abb.3.22: *Tchairy* Expression in Wildtyp (A, C) und *Tcdl* RNAi Embryonen (B, D), sichtbar gemacht durch *in situ* Hybridisierung. Gezeigt sind Embryonen während der Ausbildung der Primitivgrube (A, B) und während der frühen Keimstreifelongation (C, D) AII-DII zeigen DAPI-Färbungen der Embryonen in AI-DI. Alle Fotos zeigen ventrale Ansichten außer B, das eine dorsale Ansicht zeigt.

In frühen Blastodermstadien ist in *Tcdl* RNAi Embryonen die Expression von *hairy* nicht nachweisbar. Dies könnte sich entweder auf einen zeitlich verzögerten Beginn der Expression oder auf eine geringere Expressionsstärke zurückführen lassen.

In spätere Stadien wird *hairy* in *Tcdl* RNAi Embryonen ebenfalls in einem Streifenmuster exprimiert. Auch zeigt sich im Stadium der Ausbildung der Primitivgrube eine Expression in der Wachstumszone dieser Embryonen. Die Lage dieser Wachstumszone ist jedoch im Vergleich zu den Achsen des Eies verschoben (Abb.3.22 B). Während der frühen Keimstreifinvagination wandern diese Streifen nach anterior. Jedoch sind die einzelnen Streifen nun nicht mehr wie im Wildtyp genau parallel angeordnet, sondern die einzelnen *hairy* Streifen erscheinen der veränderten Morphologie der Embryonen angepasst, die während der Invagination beginnen, sich zu verdrehen (Abb.3.22, vgl. C und D). Der longitudinale Streifen der Wildtypexpression ist in *Tcdl* RNAi Embryonen nicht detektierbar.

3.4.8 Schwache Phänotypen

Neben den oben analysierten Phänotypen, die vermutlich den Ausfallphänotyp für *Tcdorsal* darstellen (vgl. Diskussion), ließen sich in Ablagen von *dsTcdl* injizierten Weibchen auch schwächere Phänotypen auffinden. Diese zeichneten sich morphologisch durch die Ausbildung von Keimanlagen und Keimstreifen mit Amnion aus, jedoch fehlten weitere Merkmale dorsoventraler Muster wie Beinanhänge oder Kopfstrukturen (vgl. Abb.3.23). Solche Phänotypen ließen sich nicht bei Kontrollinjektionen mit Injektionspuffer erzeugen (Daten nicht gezeigt), so dass es sich hier um spezifische Auswirkungen der Injektion von *dorsal* dsRNA handeln muss.

	Klasse I Leere Eihülle	Klasse II Kutikulareste	Klasse III Dors. Kutikula	Klasse IV Wildtyp	n
Ablage 1 (4d)	69 (71,9%)	22 (22,9%)	-	5 (5,2%)	96
Ablage 2 (6d)	28 (39,4%)	8 (11,2%)	14 (19,7%)	21 (29,6%)	71
Ablage 3 (10d)	3 (7,9%)	-	2 (5,3%)	33 (86,8%)	38

Tab. 3.2: Kutikulapräparationen von Eiablagen *Tcdl* injizierter Weibchen (Konz.: 0,5µg/µl) 4, 6 und 10 Tage nach Injektion. Angegeben sind jeweils die Anzahlen der gefundenen Phänotypen pro Phänotypklasse sowie der prozentuale Anteil an der insgesamt analysierten Anzahl (in Klammern). n = Anzahl der untersuchten Kutikulas; Dors. Kutikula: Kutikula mit dorsalen Borsten, jedoch ohne ventrales Borstenmuster und Beine. Bei Injektion mit 1,0µg/µl *Tcdl* dsRNA lassen sich die Klassen II und III erst 9-10 Tage nach Injektion und in einem noch geringeren Umfang finden.

Frühe Eiablagen von ds*Tcdl* injizierten Weibchen enthalten fast ausschließlich leere Eihüllen ohne erkennbare Kutikula (Klasse I; Abb 3.23 B). Da diese leeren Eier bei Injektion von H₂O nicht auftreten, sollten diese dem stärksten Phänotyp der RNAi mit *Tcdorsal* entsprechen. Dies weist auf eine Abwesenheit des die Kutikula sezernierenden Ektoderms hin.

In Kutikulapräparationen von späteren Eiablagen oder bei Injektion einer geringeren konzentrierten *Tcdl* dsRNA (0,5µg/µl) lassen sich neben leeren Eiern in geringerem Prozentsatz auch Kutikulas finden (Tab. 3.2).

Es zeigt sich, dass der Anteil der Klasse I mit zunehmendem Abstand vom Zeitpunkt der Injektion abnimmt. Statt dessen nimmt der Anteil an Kutikulas mit intermediärem mutantern Phänotyp zunächst zu und dann wieder ab, hierbei nimmt jedoch ebenfalls der Anteil an Wildtyp Kutikulas stetig zu (Tab.3.2). Dies spricht dafür, dass es sich bei den Phänotypen der Klassen II und III ebenfalls um spezifische Auswirkungen der RNAi handelt. Hier finden sich Reste von Kutikula, zum Teil mit einzelnen Borsten, jedoch ohne dass eine Zuordnung des verbleibenden Kutikulagewebes zu einer bestimmten Körperregion möglich wäre (Abb3.23, C). Dieser Phänotyp lässt sich nur bis maximal 6 Tage nach Injektion nachweisen. Zum gleichen Zeitpunkt tauchen erstmals Kutikulas der Klasse III auf (Tab. 3.2, vgl. Abb.3.23, D). Diese sind eindeutig segmentiert und schlauchförmig. Es finden sich jedoch ausschließlich dorsale Borsten, erkennbar an den stark lichtbrechenden Nebenborsten (3.23, Vergrößerung in DII und E, Pfeile). Dagegen sind die im Wildtyp ventral auffindbaren Borstenmuster nicht erkennbar (Abb3.23, F).

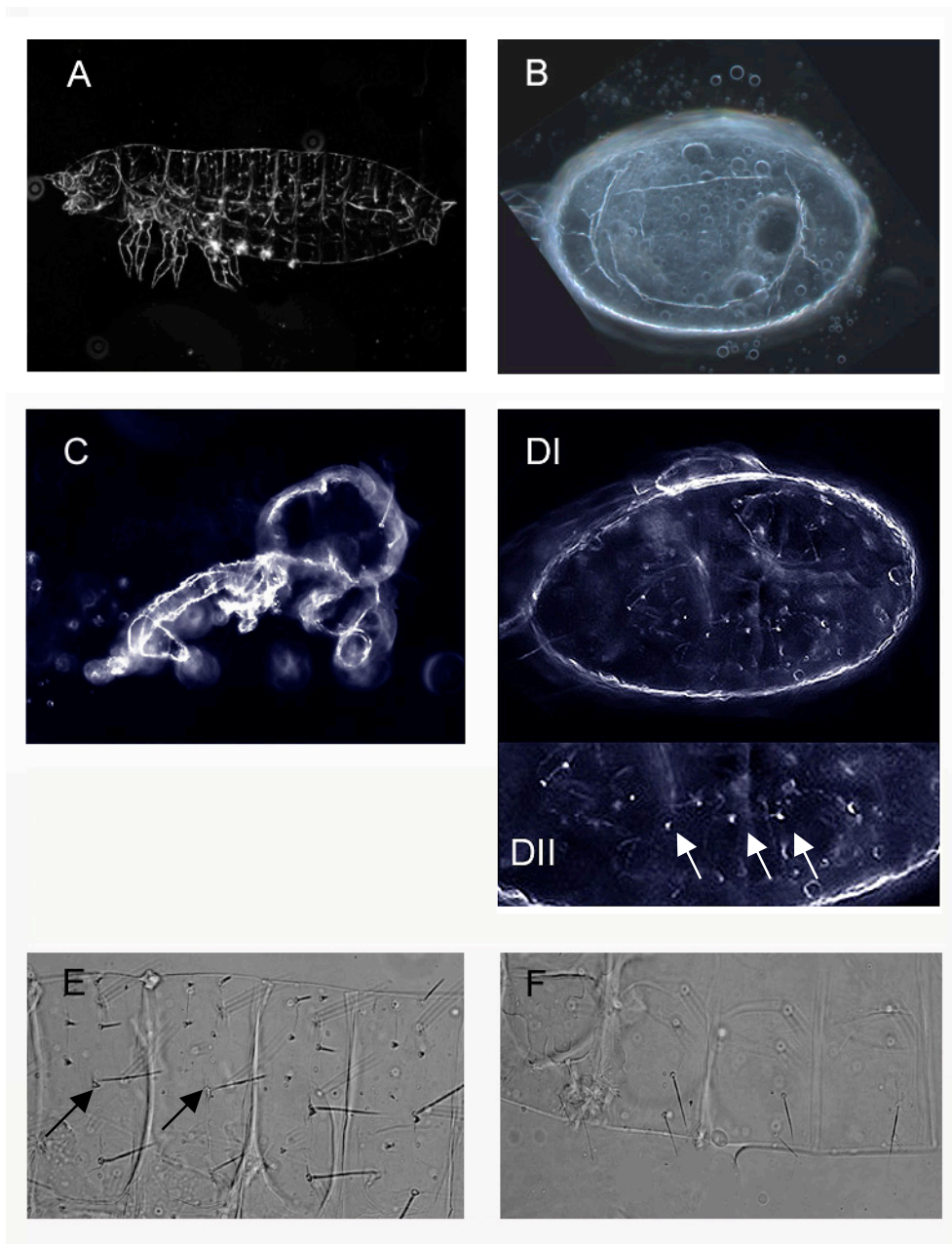


Abb 3.23: Kutikulapräparationen von Wildtyp (A, E, F) und *Tcd1*RNAi Embryonen (B-D), aufgenommen mit Dunkelfeldoptik. Die Kutikula in A entspricht dem Wildtyp; B stellt den Phänotyp der Klasse I dar, bei dem nur eine leere Eihülle zurückbleibt. Die Kutikula in C zeigt einen Phänotyp der Klasse II, es finden sich nur Reste von Kutikulamaterial mit einzelnen Borsten. D zeigt eine Kutikula der Klasse III, es finden sich nur dorsale Borsten (Pfeile in DII). E und F zeigen je einen dorsalen bzw. einen ventralen Ausschnitt einer Wildtypkutikula; Pfeile in E deuten auf die Nebenborsten.

Im Gegensatz zu den Kutikulapräparationen ließen sich bei der Untersuchung von Markergenen nur selten Embryonen finden, die offensichtlich einen hypomorphen Phänotyp darstellen. Ein Beispiel eines solchen Embryos zeigt Abb.3.24.

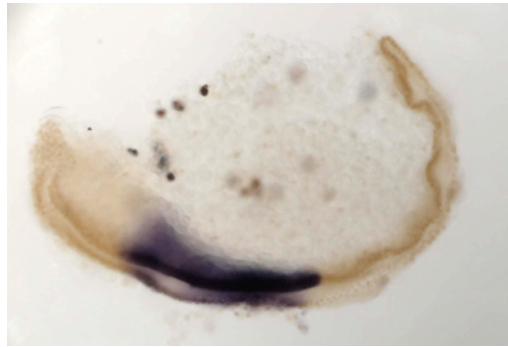


Abb.3.24: Expression von *Tc006A12* in einem hypomorphen *Tcdl* RNAi Embryo.

Die Expression des Markers *Tc006A12* unterscheidet sich nicht von dem eines amorphen *Tcdl* RNAi Embryos: Während die Expressionsdomäne im Bereich des Kopfes fehlt, bleibt die Gap-Gen ähnliche Domäne erhalten. Auch bildet der Embryo einen einschichtigen, hohlen Schlauch aus und er erscheint apolar, die Expression von *Tc006A12* findet sich auf der ventralen wie auf der dorsalen Seite des Embryos. Jedoch ähnelt die gesamte Morphologie derjenigen eines Wildtypembryos im Stadium der maximalen Elongation des Keimstreifs in Bezug auf die Länge des Embryos und der Lage im Ei, während amorphe *Tcdl* RNAi Embryonen in diesem Stadium verdreht im Ei liegen und deutlich länger sind. Solche Phänotypen ließen sich in weniger als 5% aller analysierten Embryonen finden.

4 Diskussion

4.1 Frühe Schritte zur Achsenbildung während der Oogenese

Eine asymmetrische Lokalisierung von Oozytenkernen in mittleren oder späten Stadien der Oogenese wurde bereits für mehrere Insektenarten beschrieben, so für *Drosophila melanogaster* (Neumann-Silberberg und Schüpbach, 1993), *Musca domestica* (Kleine-Schonnefeld und Engels, 1981) und *Acheta* (Nielsen, 1965). Bei *Acheta* wurde in diesem Zusammenhang bereits eine morphologische Veränderung der dem Oozytenkern benachbarten Follikelzellen beschrieben und vermutet, dass der Oozytenkern als Ausgangspunkt für Signale an das Follikelepithel dienen könnte.

In der vorliegenden Arbeit wurde eine asymmetrische Verlagerung der Oozytenkerne von *Anopheles gambiae* und *Tribolium castaneum* in mittleren Stadien der Oogenese gezeigt. Eine umfassende Beschreibung der Ovarien von Tenebrioniden findet sich bereits in Ullmann (1973) am Beispiel von *Tenebrio molitor*. Hier wird bereits eine asymmetrische Lokalisierung von Oozytenkernen in späteren Stadien der Oogenese gezeigt, ohne dass diese jedoch näher beschrieben wird oder erwähnt wird, ob diese asymmetrische Positionierung ein generelles Merkmal später *Tenebrio*-Ovarien darstellt.

Somit wurde für Vertreter von wenigstens drei verschiedenen Insektenordnungen, Orthopteren, Coleopteren und Dipteren, und sowohl für Langkeimer (*Anopheles*, *Musca*, *Drosophila*) als auch für Kurzkeimer (*Acheta*, *Tenebrio*, *Tribolium*) eine asymmetrische Lokalisierung beschrieben. Dies legt nahe, dass eine asymmetrische Positionierung des Oozytenkernes eine Voraussetzung für die Achsenbildung nicht nur in *Drosophila*, sondern in verschiedenen Insektenordnungen darstellt. Da sich jedoch in *Tribolium* der Oozytenkern ausschließlich in Bezug zur dorsoventralen Achse bewegt, ist nicht sicher, ob der Kern hier auch als Ausgangspunkt eines Signals zur Spezifizierung der posterioren Follikelzellen dient, wie dies in *Drosophila* der Fall ist (Roth *et al.*, 1995; Peri *et al.*, 1999). Existiert ein solches Signal auch in *Tribolium*, müsste dies in einem sehr frühen Stadium erfolgen, in dem der Oozytenkern noch Kontakt zu sämtlichen Follikelzellen, einschließlich der später posterioren Follikelzellen hat (vgl. Abb.3.2 D). Dann jedoch muss das polarisierende Signal so gesteuert werden, dass ausschließlich die posterioren Follikelzellen das Signal empfangen oder diese Zellen müssen bereits vorher als separate Follikelzellpopulation die Kompetenz erworben haben, dieses Signal von der Oozyte zu verarbeiten. Aus *Drosophila* ist bekannt, dass dort tatsächlich

unterschiedlich spezialisierte Populationen von Follikelzellen existieren, die auch eine unterschiedliche Kompetenz zur Verarbeitung des Gurken Signals zeigen (Gonzales-Reyes und St. Johnston, 1998). Die Follikelepithelien von *Tribolium* und *Anopheles* zeigen keine Anzeichen einer regional unterschiedlichen Morphologie oder Spezialisierung, jedoch ist dies auch in *Drosophila* in vergleichbaren Stadien noch nicht der Fall.

Alternativ ist es daher auch möglich, dass in *Tribolium* die Weitergabe der anteriorposterioren Polarisierungsinformation mittels anderer Systeme an die sich entwickelnde Oozyte erfolgt. Hierbei spielt offensichtlich der Aufbau der Ovarien der betreffenden Art eine untergeordnete Rolle. In den beschriebenen Dipteren sind die Ovarien meroistisch und polytroph, das heißt, die Oozyte wird zusammen mit den anhängenden Nährzellen von einem gemeinsamen Follikelepithel umschlossen und bildet so eine Eikammer. In *Tenebrio* und *Tribolium* existieren dagegen meroistische, telotrophe Ovarien. Hier sind nur die Oozyten selbst von einem einschichtigen Epithel umschlossen, während die Nährzellen im Bereich des Germariums verbleiben und mit den Oozyten jeweils über einen Nährstrang verbunden sind (Ullmann, 1973; eigene Beobachtung). *Acheta* besitzt hingegen panoistische Ovarien, die keinerlei Nährzellen enthalten. Somit kann hier die Wanderung des Oozytenkerns nicht auf den Einstrom von Plasmaproteinen und anderen maternalen Faktoren aus den Nährzellen in die Oozyte zurückzuführen sein und macht einen aktiven Transport, z.B. durch Komponenten des Zytoskeletts, wie bereits für *Drosophila* gezeigt (Januschke *et al.* 2002), auch in niederen Insektenarten und -ordnungen wahrscheinlich.

Die Eihülle vieler Insektenarten aus unterschiedlichen Ordnungen lassen bereits die Vorhersage der beiden Hauptkörperachsen anhand von Markern zu. Somit muss wenigstens in Arten, die solche Eier hervorbringen, eine Information zur Spezifizierung der Körperachsen während der Oogenese an die sich entwickelnde Oozyte weiter gegeben werden (Roth, 2003). In *Drosophila* ist hierfür die Positionierung des Oozytenkerns und die damit zusammenhängenden Signalprozesse über das TGF α -ähnliche Protein Gurken von entscheidender Bedeutung. Da die Positionierung des Oozytenkerns offensichtlich auch in niederen Insektenordnungen bis zu den Orthopteren in einem stereotypischen Muster und zumindest in Bezug auf eine der beiden Körperachsen asymmetrisch erfolgt, lässt sich postulieren, dass auch hier der Oozytenkern als Ausgangspunkt eines Signals zur Musterbildung fungiert. Ob auch in niederen Insektenarten ein TGF α -ähnliches Molekül als Signal verwendet wird, lässt sich jedoch nicht eindeutig vorhersagen. Datenbanksuchen nach Orthologen von Gurken führten in Arten außerhalb der Drosophiliden bislang zu keinem eindeutigen Ergebnis (S.Roth, persön-

liche Mitteilung und eigene Beobachtung). In *Anopheles* existiert offensichtlich nur ein Homolog zu den drei TGF α -ähnlichen Faktoren aus *Drosophila* (Gurken, Spitz und Keren). Dieses Homolog weist auf Ebene der Aminosäuresequenz im Bereich der EGF-Wiederholungen eine nahezu identische Ähnlichkeit zu allen drei TGF α -Faktoren aus *Drosophila* auf. Ebenso liefert die *in situ* Hybridisierung keinen Hinweis auf eine asymmetrische Lokalisierung der Transkripte in *Anopheles* Oozyten (eigene Beobachtung). Selbst in *Drosophila virilis* zeigt die Sequenz des Gurken Homologs einen sehr geringen Grad an Konservierung außerhalb der Region der EGF-Wiederholungen (Peri *et al.*, 1999). Es handelt sich hier also offensichtlich um ein innerhalb der Dipteren sehr schnell evolvierendes Gen. Ein ähnliches Beispiel eines früh in der Achsenbildung von *Drosophila* benötigten Gens mit einer hohen Evolutionsrate liefert z.B. das *bicoid* Gen. Hier findet sich in Vertretern von Familien außerhalb der höher entwickelten Cyclorrrapha nur ein Hox3 Gen mit Charakteristika, die sowohl denen von *bicoid* als auch von *zerknüllt* ähneln (Stauber *et al.*, 2002).

Jedoch ist zum einen denkbar, dass die mRNA des EGF Gens aus *Anopheles* gerade in Stadien zwischen den hier analysierten Stadien asymmetrisch lokalisiert wird. Für diese Arbeit standen nur Ovarien in begrenzter Anzahl zur Verfügung, so dass nur Stadien in Intervallen von ungefähr 150 Minuten Differenz untersucht werden konnten. Sollte die mRNA des TGF α -ähnlichen Gens jedoch nur kurzzeitig asymmetrisch lokalisiert werden, wäre hierfür ein Zeitraum von 2 _ Stunden möglich, was in etwa 5% der Entwicklungsdauer der Oozyte entspricht. Des weiteren ist möglich, dass eine asymmetrische Aktivität eines solchen TGF α -Homologs nicht über die Lokalisierung der Transkripte gesteuert wird, sondern durch posttranskriptionelle Regulation. Jedoch ließ sich z.B. eine Regulation auf Ebene der Translation mit den zur Verfügung stehenden Methoden nicht nachweisen. Es ist jedoch bekannt, dass der EGF-Signalweg in *Drosophila* wie in Vertebraten auch eine ausgeprägte posttranslationelle Regulierung aufweist (Freeman und Gurdon, 2002). Vor allem die Regulierung der Produktion von aktiven EGF- oder TGF α Liganden durch proteolytische Spaltung einer membrangebundenen Form ist ein wiederkehrendes Motiv in der Kontrolle der Aktivität des EGF-Signalweges. Aufgrund der geringen Sequenzähnlichkeit ist allerdings nicht eindeutig geklärt, ob das *Anopheles* EGF Homolog eine inaktive, membrangebundene Form besitzt.

Eine eingehendere Analyse der Verteilung von mRNA und Protein des TGF- α ähnlichen Gens aus *Anopheles* sollten eine Aussage über die Verwendung des EGF-Signalweges in der dorsoventralen Musterbildung zumindest in Nematoceren erlauben.

Die Existenz eines in Bezug auf die dorsoventrale Achse asymmetrisch im Follikelepithel exprimierten *pipe* Gens in *Tribolium* wie auch in *Anopheles* lässt auf eine konservierte Beteiligung von *pipe* Genen an der Weiterleitung einer polarisierenden Information vom Follikelepithel an die sich entwickelnden Eihüllen schließen. In *Drosophila* wird diese Asymmetrie direkt in Folge des Gurken-Signals an die dorsalen Follikelzellen etabliert (Sen *et al.*, 1998). Da jedoch wie oben erwähnt bislang kein für eine solche Regulierung erwarteter Gurken-ähnlicher Faktor außerhalb der Drosophiliden eindeutig identifiziert werden konnte, lässt sich nicht mit letzter Sicherheit klären, ob die Regulierung der *pipe* Gene in *Anopheles* und *Tribolium* ebenfalls der Kontrolle einer EGF-Signalkaskade unterliegt. Möglicherweise kann die Weitergabe dieser polarisierenden Information von der Oozyte an das umgebende Follikelepithel und die Regulierung der *pipe* Gene auch über andere Signalwege realisiert werden. Jedoch lässt die Konservierung der *pipe* Expression keinen Schluss über eine Konservierung der Funktion von Pipe während der Oogenese in allen Insekten zu. So könnte in basalen Insekten *pipe* möglicherweise im gesamten Follikelepithel exprimiert werden und eine generelle Funktion in der Modifizierung von Bestandteilen der extrazellulären Matrix erfüllen. Die Regulierung der *pipe* Gene könnte erst später unter die Kontrolle des EGF-Signalweges gelangt sein und Pipe so die Fähigkeit zur Weiterleitung einer polarisierenden Information an die Oozyte verleihen. Dann jedoch sollte sich auch in *Tribolium* und *Anopheles* ein solches asymmetrisches EGF-Signal nachweisen lassen.

4.2 Die Etablierung der Dorsoventral-Achse im frühen *Tribolium* Embryo

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Funktionsweise des *dorsal* Gens aus *Tribolium castaneum* mittels RNAi Experimenten eingehend untersucht.

Die Spezifizierung der extraembryonalen Serosa erfolgt in *Tribolium* offensichtlich unabhängig vom Vorhandensein dorsoventraler Informationen. Auch in den stärksten *Tcdl* RNAi Phänotypen erscheint die Serosa völlig wildtypisch in Bezug auf die Größe der Kerne. Auch fand sich kein zusätzliches Serosamaterial im Inneren des Embryos. Zwar ist die Anlage der Serosa in frühen Stadien vergrößert, was sich in der Ausdehnung der Expression von *zen* im Vergleich zum Wildtyp und in der Verschiebung der Grenze von Serosa und Keimanlage zeigt, jedoch scheint die Vergrößerung der Zellzahl keinen generellen Defekt in der Ausbildung der Serosa zu verursachen. Eventuell wird der Überschuss an Zellen durch eine höhere Zelldichte und eine geringere Größe der einzelnen Zellen kompensiert.

Somit scheint in Coleopteren während der Embryogenese zunächst eine Differenzierung in Serosa und Keimanlage zu erfolgen, während in *Drosophila* die Festlegung des extraembryonalen Gewebes im Zuge der Unterteilung des Embryos in verschiedene dorsoventrale Regionen erfolgt (Rushlow und Arora, 1990; Wharton *et al.*, 1993). Für diesen ersten Differenzierungsschritt ist in *Tribolium* eine dorsoventrale Information augenscheinlich nicht notwendig. Folglich findet dieser Schritt unter Kontrolle des anteriorposterioren Systems statt. Die Serosa der Coleopteren stellt dann im Gegensatz zur Amnioserosa der höheren Dipteren kein dorsales Zellschicksal dar.

Die Lage und Spezifizierung der Amnionzellen im Blastodermstadium ist dagegen bislang nicht untersucht worden. Jedoch zeigt das GataX Homolog *Tcpannier* ab Ausbildung der posterioren Primitivgrube eine Expression in den dorsalen Zellen innerhalb der Grube, den präsumptiven Amnionzellen. In *Tcdl* RNAi Embryonen exprimieren sämtliche Zellen der Primitivgrube *Tcpannier* und in einwandernden Keimstreifen lässt sich anhand der *pannier* Expression keine klare Trennung zwischen embryonalen Zellen und Zellen des Amnions erkennen. Dies legt den Schluss nahe, dass dorsalisierte *Tribolium* Embryonen wenigstens teilweise aus Amnionzellen bestehen. Somit würde das Amnion das am weitesten dorsale Schicksal repräsentieren und von der Entstehung der Serosa unabhängig sein. Hier besteht eine formale Ähnlichkeit zur Situation in *Drosophila*: In den stärksten dorsalisierten Mutanten bestehen die resultierenden Embryonen aus einer Mischung von dorsalem Ektoderm und Amnioserosazellen (Wharton *et al.*, 1993). Da nicht alle Zellen der *Tcdl* RNAi Embryonen *Tcpannier* exprimieren, repräsentieren die restlichen Zellen hier vermutlich zu einem großen Teil ebenfalls dorsales Ektoderm. Nicht geklärt ist aber, welchen Effekt die Dorsalisierung auf die Anlage und die Ausbildung des Darmes hat. So können die Bereiche, die *pannier* nicht exprimieren, auch teilweise endodermale Zellen oder Zellen des Proctodeums oder Stomodeums beinhalten, zumal die Spezifizierung des Endoderms in *Tribolium* bislang nicht aufgeklärt worden ist.

Demgegenüber zeigen die Kutikulapräparationen bei Injektionen von *Tcdl* dsRNA in geringerer Konzentration, dass dorsale Bereiche des die Kutikula sezernierenden Ektoderms offensichtlich in solchen Experimenten weniger stark betroffen sind, während weiter ventrale Bereiche auch in diesen Experimenten nicht beobachtet werden konnten. Auch zeigten *in situ* Hybridisierungen gegen *Tctwist* keine Expression, woraus sich schließen lässt, dass sowohl ventrales Ektoderm wie auch das Mesoderm in diesen Embryonen weiterhin abwesend sind. Somit zeigt sich, dass analog zur Funktion von Dorsal in *Drosophila*, TcDorsal ebenfalls in

der Lage ist, verschiedene Schwellenwerte für die Spezifizierung von unterschiedlichen Zellschicksalen entlang der dorsoventralen Achse des *Tribolium* Embryos festzulegen.

Wie bereits postuliert, geht die Verlagerung der Anlagen extraembryonaler Membranen im Laufe der Insekten Evolution von anterioren in dorsale Bereiche des frühen Embryos einher mit einer Verschiebung der Expressionsdomänen der Gene *zerknüllt* und *dpp* (Stauber *et al.*, 1999; Schmitt-Ott, 2000). *Tribolium* stellt möglicherweise einen Zwischenschritt auf dem Weg zu einer solchen Verschiebung dar: Während die frühe Expression beider Gene in *Tribolium* sich auf die anterioren Regionen des Embryos beschränkt, und somit unter Kontrolle des anteriorposterioren oder des terminalen Systems stattfinden sollte, ist der Aspekt der späteren Expression beider Gene zumindest teilweise unter Kontrolle des dorsoventralen Systems (Schröder *et al.*, 2000; vgl. 4.3). Jedoch scheint in *Tribolium* der Dorsal-abhängige Einfluss auf die Kontrolle entlang der AP-Achse aufgesetzt zu sein: Zunächst findet eine Eingrenzung des Zellschicksals entlang der anteriorposterioren Achse statt, die anschließend durch das dorsoventrale System weiter auf den anterior-dorsalen Bereich eingegrenzt wird. Diese Situation in Coleopteren stellt somit eventuell einen Zwischenschritt dar auf dem Weg von einer primär anteriorposterioren Anlage extraembryonalen Gewebes in extremen Kurzkeimern und der Kontrolle der spezifizierenden Gene hin zu einer Anlage und Kontrolle von *dpp* und *zen* hauptsächlich in Abhängigkeit der dorsoventralen Information wie in höheren Dipteren.

Der Einfluss von Dorsal auf die dorsoventrale Musterbildung des Embryos scheint in *Tribolium* im Vergleich zu *Drosophila* eher in einer generell polarisierenden Funktion zu bestehen. Dies zeigt sich im Vergleich des RNAi Phänotyps von *Tcdorsal* mit denen von *Tcsog* und *Tctwist*. So lassen sich die Erweiterungen der Expressionsdomänen der beiden Gene *dpp* und *zen* in *Tcdl* RNAi Embryonen ausschließlich durch einen Ausfall von *sog* erklären, da in *Tcsog* RNAi Embryonen die frühe Expression von *dpp* und *zen* von der in *Tcdl* RNAi Embryonen nicht zu unterscheiden ist (Mikulski, 2004).

Des weiteren verschwindet in starken *Tctwist* mutanten Embryonen ebenso wie in allen *Tcdl* RNAi Embryonen die Expression von *snail* völlig (Basal, 2004). Somit scheint der Einfluss von TcDorsal auf die Aktivierung von *snail* ausschließlich indirekt über die Regulierung von *twist* zu bestehen. In *Drosophila* konnte gezeigt werden, dass zur Etablierung sämtlicher Schwellenwerte entlang der dorsoventralen Achse Twist alleine nicht ausreichend ist, da bei Ausfall von Dorsal Twist nur einen Teil der Schwellenwerte definieren kann (Stathopoulos

und Levine, 2002b). Vermutlich ist dies auch in *Tribolium* der Fall, allerdings ist bislang nur die Expression von *snail* in beiden RNAi Experimenten analysiert worden.

Somit kommt den zygotischen Genen offensichtlich in Kurzkeimern eine größere Bedeutung in der Unterteilung der embryonalen dorsoventralen Achse in unterschiedliche Regionen zu, als dies in höheren Dipteren der Fall ist. *Anopheles*, dessen Entwicklung als Langkeimer und niedere Diptere eher derjenigen von *Drosophila* ähnelt (Monnerat *et al.*, 2002), sollte im Vergleich zu *Tribolium* einen weiter zunehmenden Einfluss des maternalen Systems in der Spezifizierung der embryonalen dorsoventralen Achse zeigen.

4.3 Späte Prozesse der dorsoventralen Musterbildung

In *Tcdl* RNAi Embryonen erscheint die Wachstumszone ähnlich dem Wildtyp als mehrschichtiges Gewebe aus mesenchymalen Zellen. Diese Region ist die einzige in *Tcdl* RNAi Embryonen, die mehrschichtig ist, während der Hauptteil des Embryos aus einschichtigen, zumeist palisadenförmigen Zellen mit epithelialeem Aussehen besteht.

Die Funktion der Wachstumszone scheint jedoch in Abwesenheit dorsoventraler Information gewährleistet zu sein, da die Embryonen die vollständige Anzahl von Segmenten ausbilden, wie dies anhand der Ausbildung der kompletten Anzahl von 16 Engrailed-Streifen zu beobachten war. Auch verhindert die Abwesenheit des Mesoderms offenbar nicht die Bildung neuer Segmente, wie dies in Vertebraten zu beobachten ist, da hier Derivate des Mesoderms selbst segmentiert werden (vgl. Tautz, 2004).

Dies zeigt, dass die Wachstumszone in *Tribolium* kein neues dorsoventrales Muster für die im Zuge der Keimstreifelongation hervorgebrachten Segmente generiert. Statt dessen hängt auch das dorsoventrale Muster dieser Segmente von der im frühen Blastoderm durch die Toll-Dorsal Kaskade errichteten dorsoventralen Information ab. Wie diese frühe polarisierende Information in der zellulären Umgebung der Wachstumszone gespeichert wird und an die aus ihr hervorgehenden neuen Segmente vermittelt wird, konnte im Verlauf dieser Arbeit nicht untersucht werden. Jedoch scheint der für einige der analysierten Gene (z.B. *Tctwist*, *Tcsog*, *Tcvnd*) in *Tcdl* RNAi Embryonen beobachtete Puls an Expression in der Region der Wachstumszone nicht ausreichend für die Vermittlung einer korrekten dorsoventralen Achse für die neu gebildeten Segmente. Eine formelle Möglichkeit würde darin bestehen, dass während des Blastodermstadiums bereits Zellpopulationen innerhalb der Wachstumszone mit einer unterschiedlichen dorsoventralen Information ausgestattet werden, die als Stammzellen

für verschiedene Gewebe fungieren. So wurde vermutet, dass in der inneren Zellschicht der Wachstumszone bereits während des Blastodermstadiums Zellen mit mesodermalem Charakter hinterlegt werden könnten, obwohl diese den mesodermalen Marker *twist* nicht kontinuierlich exprimieren (Handel *et al.*, 2004).

Embryonen ohne TcDorsal Funktion erscheinen extrem elongiert im Vergleich zum Wildtyp. Hierin ähneln sie sehr *Drosophila* Mutanten, in denen der Rückzug des Keimstreifs nicht vollständig ausgeführt werden kann. Dieser Defekt könnte auf zwei Arten gedeutet werden: Zum einen kann ein Fehlen des Amnions für einen solchen Phänotyp verantwortlich sein. In *Drosophila* wird die Amnioserosa während des Keimstreifrückzugs benötigt, was in entsprechenden Mutanten zu elongierten Embryonen führt, in denen der Rückzug nicht durchgeführt werden kann (Goldmann-Levi *et al.*, 1996). Des Weiteren könnte auch das Fehlen des invaginierenden Mesoderms, hier gezeigt durch die Abwesenheit von *twist* und *snail* Expression und die einschichtige Organisation der *Tcdl* Embryonen, einen solchen Phänotyp hervorrufen. In *Drosophila* entwickeln sich Mutanten für *dorsal*, aber auch für *twist* ebenfalls zu ähnlich aussehenden, elongierten Embryonen (Simpson, 1982; Roth *et al.*, 1989; vgl. Costa *et al.*, 1993). Die genaue Ursache dieses Phänotyps ist allerdings auch in *Drosophila* noch ungeklärt.

4.4 Potentielle Zielgene von TcDorsal und deren Regulierung

Die Expression mesodermaler Gene wie *twist* und *snail* in *Tribolium* ist abhängig von TcDorsal. Dies zeigt sich in der völligen Abwesenheit der mRNA Expression dieser beiden Gene in *Tcdl* RNAi Embryonen und steht im Einklang mit dem Phänotyp von *dl* Mutanten in *Drosophila*, in denen ebenfalls die Expression der beiden mesodermalen Gene unterbleibt (Roth *et al.*, 1989). Da dieser Phänotyp auch mit geringeren Konzentrationen an dsRNA erreicht werden konnte, liegt die Vermutung nahe, dass analog zu *Drosophila* auch die Aktivierung der mesodermalen Gene in *Tribolium* eine hohe Kernkonzentration von Dorsal erforderlich macht, wie sie nur in den am weitesten ventral gelegenen Kernen des Blastoderms vorhanden sind.

Die terminale Expression von *twist* in späteren Stadien lässt sich evtl. auf den Einfluss des terminalen Systems zurückführen. In *Drosophila* ist das terminale System notwendig, um *twist* an den Polen des frühen Embryos zu exprimieren (Ray *et al.*, 1991). Auch wenn die ab-

dominalen Segmente in *Tribolium* erst in späteren Stadien aus der Wachstumszone hervorgehen, wurde bereits postuliert, dass die terminale, posteriore Region des Embryos bereits während des Blastoderms spezifiziert wird (Wolff *et al.*, 1995; Schröder *et al.*, 2000). Somit ist es denkbar, dass die Expression von *twist* in der terminalen Region der elonigierenden *Tcdl* RNAi Embryonen in der Aktivierung des Gens durch das terminale System in *Tribolium* begründet ist. Die Abwesenheit von *snail* Expression in diesen Zellen lässt sich durch das Fehlen von Twist begründen. In *Tctwist* RNAi Embryonen fehlt die Expression von *snail* ebenfalls vollständig (Basal, 2004). Allerdings kann auch eine direkte Reprimierung von *snail* durch das terminale System nicht ausgeschlossen werden. In *Drosophila* wurde ein direkter Einfluss des terminalen Systems auf die Expression von *snail* nachgewiesen (Ray *et al.*, 1991).

Die Expression mehrerer Markergene in *Tcsog* und *Tcdl* RNAi, hier wurden *zen* und *dpp* betrachtet, ist nicht unterscheidbar, was die Vermutung nahe legt, dass in *Tribolium* das Zusammenspiel zwischen BMP und Dorsal Signalweg möglicherweise einfacher geregelt ist, als in höheren Dipteren: So gibt es Anzeichen dafür, dass TcSog die Funktion von Dpp nicht nur posttranslational beeinflusst, sondern auf diesem Weg auch indirekt dessen Expression reprimiert (siehe auch 4.2). Dies erfolgt vermutlich, indem Sog die Diffusion von Dpp durch direkte Bindung blockiert und so dessen Wirkungsbereich einschränkt. Dies verhindert offensichtlich auch eine Autoaktivierung von Dpp in Zellen im Bereich hoher Sog Aktivität. In *Drosophila* ist Dpp in der Lage, in Zellen, die das Dpp Signal empfangen, seine eigene Expression zu aktivieren. Diese Autoaktivierung wird durch die durch Bindung an Sog verhindert (Biehs *et al.*, 1996).

Die Ausweitung der *dpp* und *zen* Expression in *Tcdl* RNAi lässt sich so ausschließlich auf der Basis des Fehlens der *sog* Expression erklären, während in *Drosophila* Dorsal an die cis-regulatorischen Sequenzen von *dpp* und *zen* bindet und die Expression beider Gene in ventralen Regionen des frühen Embryos reprimiert (Rushlow *et al.*, 2000; Stathopoulos und Levine, 2002).

Schröder *et al.* (2000) postulierten bereits, dass *zen* und *dpp* wenigstens teilweise von Genen des dorsoventralen Systems kontrolliert werden. Beide werden zunächst in einer anterioren Kappe exprimiert. Diese Expression dehnt sich anschließend zusammen mit der Ausweitung der Serosazellen in den dorsalen Bereich des Embryos aus. Es scheint jedoch, dass diese Verschiebung in dorsale Regionen an sich nicht unter Kontrolle des dorsoventralen Systems erfolgt. Viel mehr scheint sie auch in Abwesenheit von Dorsal abzulaufen, jedoch ohne eine

Beschränkung auf den dorsalen Bereich zu erfahren. Die Ausweitung der Expression beider Gene in Richtung der anteriorposterioren Achse erfolgt somit unabhängig von dorsoventraler Information. Offensichtlich ist das dorsoventrale System notwendig zur Eingrenzung der Expression von *dpp* und *zen* auf die dorsalen, anterioren Bereiche (vgl. auch 4.2).

Die Ausschaltung der Genfunktion von *zen1* in *Tribolium* führt zum Verlust der Serosa (M. van der Zee und S. Roth, in Vorbereitung) und es konnte gezeigt werden, dass beide *zen* Gene essentiell zur Spezifizierung oder Funktion der extraembryonalen Gewebe sind. Andererseits führt jedoch die Ausweitung sowohl von *zen1* als auch *zen2* Expression in *Tcdl* RNAi Embryonen nicht zu einer sichtbaren Veränderung der Serosa. Die hier gezeigten Phänotypen legen nahe, dass Dorsal die Expression beider *zen* Gene im ventralen Bereich des Embryos über die Aktivierung von *Tcsog* indirekt reprimiert und somit auf den anterioren, dorsalen Bereich beschränkt.

Die Ausweitung der Expression von *Tcsog* in ventrale Regionen im Wildtyp ist nicht unbedingt auf eine veränderte Regulierung durch Dorsal zurückzuführen. In *Drosophila* wird die Expression von *sog* im Mesoderm durch die reprimierende Wirkung von Snail in dieser Region unterdrückt (Stathopoulos und Levine, 2002). Ein Fehlen von Bindestellen für Snail im *Tcsog* Promoter könnte die Expression im Mesoderm erklären (vgl. Stockhammer, 2003).

Wie in *Drosophila* scheinen auch in *Tribolium* lateral exprimierte Gene – hier wurden *Tcsog* und *Tcvnd* betrachtet – bereits bei geringeren Kernkonzentrationen von TcDorsal aktiviert zu werden. Dies zeigt sich in der Expression beider Gene in breiteren Streifen zu beiden Seiten des Mesoderms. In *Drosophila* konnte gezeigt werden, dass die Promotoren von *sog* und *vnd* hochaffine Bindestellen für Dorsal besitzen, die gewährleisten, dass geringe Konzentrationen von Dorsal ausreichen, um diese Gene anzuschalten (Markstein *et al.*, 2002). Solche hochaffinen Bindestellen kann man aufgrund des Expressionsmusters der beiden Gene und des Fehlens von *sog* und *vnd* Expression in weiten Bereichen der *Tcdl* RNAi Embryonen auch für die cis-regulatorischen Sequenzen der beiden *Tribolium* Gene postulieren. Eine Analyse der betreffenden cis-regulatorischen Bereiche ist jedoch bislang nicht durchgeführt worden.

In der Zwischenzeit konnten weitere konzentrationsabhängige Motive in cis-regulatorischen Regionen von Dorsal Zielgenen in *Drosophila* identifiziert werden. Dies ermöglichte auch die Identifizierung von bis dahin nicht bekannten Zielgenen des Dorsal Transkriptionsfaktors (Stathopoulos *et al.*, 2002). Für *Tribolium* Dorsal wurden solche Bindemotive bislang nur für die cis-regulatorische Region von *Tctwist* eingehender untersucht (Chen *et al.*, 2000; Mikulski, 2004). Ein Nachweis für eine direkte Regulierung der in der vorliegenden Arbeit verwen-

deten Markergene wie *Tczen*, *Tcvnd* und *Tcsna* steht somit noch aus. Die Untersuchung der cis-regulatorischen Regionen dieser Gene auf konservierte Motive und Dorsal-Bindestellen sollte daher den Nachweis ermöglichen, ob diese Gene tatsächlich von Dorsal direkt oder möglicherweise indirekt über Faktoren wie TcTwist oder TcSog gesteuert werden und damit, ob die Regulation von in *Drosophila* Dorsal-abhängigen Zielgenen nach der Abspaltung der Coleopteren von der Linie der Dipteren weitere Änderungen erfahren haben.

Die Tatsache, dass bei Injektion geringerer Konzentrationen von *Tcdl* dsRNA keine Aktivierung von lateralen Genen wie *Tcsog* zu erkennen war, spricht ebenfalls für eine eher generelle polarisierende Wirkung von TcDorsal. Daher finden sich vermutlich in *Tribolium* weniger Dorsal-abhängige Schwellenwerte von Zielgen-Expressionen als in *Drosophila*. Dies führt dann evtl. zu einer geringeren Menge an zygotischen Zielgenen, die von TcDorsal reguliert werden und dann ihrerseits aber einen größeren Anteil an der Unterteilung der dorsoventralen Achse in *Tribolium* besitzen.

4.5 Zur möglichen Funktion von *Tccactus*

Eine genaue Analyse der Funktion von *Tccactus* wurde im Laufe der vorliegenden Arbeit durch die in den RNAi Experimenten auftretende Letalität verhindert (vgl. 3.3.5). Diese auftretende Letalität im adulten Stadium macht eine Betrachtung der *cactus* Funktion während der frühen Embryogenese von *Tribolium* mittels parentaler RNAi unmöglich. Die Ursache für die Letalität konnte im Verlaufe dieser Arbeit nicht geklärt werden, jedoch zeigt dieses Phänomen beim Ausfall von *Tccactus* Parallelen zu starken *Drosophila* Mutanten für *cactus*. Im Gegensatz zu anderen Genen der Dorsal Gruppe führt ein Ausfall von *Dmcactus* ebenfalls zu vollständiger Letalität in larvalen und puppalen Stadien (Roth *et al.*, 1991).

Ein spezifischer Effekt lässt sich vor allem in larvalen und puppalen Stadien ausmachen, wo amorphe Mutationen in *Dmcactus* zygotisch zu Letalität führen. Diese Letalität geht einher mit dem Auftreten von melanotischen Tumoren in betroffenen Larven oder Puppen (Roth *et al.*, 1991; Govind, 1996). Mittlerweile wurde gezeigt, dass diese Tumore auf Defekten in der larvalen Hämatopoiese beruhen, an der *cactus* beteiligt ist (Qiu *et al.*, 1999). Hier scheint die Toll Kaskade einschließlich Cactus an der Regulierung der Zahl der Hämatozyten beteiligt zu sein. In *cactus* Mutanten findet sich daher eine massive Erhöhung der Hämatozytenzahl sowie eine Vergrößerung der Lymphdrüsen. Im Gegensatz zu Cactus ist Dorsal in den Lymphdrüsen nicht exprimiert, weshalb vermutet wird, dass Cactus hier als Inhibitor für Dif wirkt (Qiu *et al.*, 1999).

Belvin und Anderson (1996) postulierten ebenfalls, dass eine Signalverstärkung der Toll-Dorsal Kaskade möglicherweise grundsätzlich einen stärkeren Effekt hervorruft als eine Herunterregulierung des Signals in Folge einer Mutation für *Toll* oder einer anderen Komponente des Signalweges. So könnte die Letalität in *Tccactus* RNAi Experimenten auch auf eine Überaktivierung der Toll-Dorsal Kaskade in einem oder mehreren anderen Prozessen zurückzuführen sein, z.B. in einer ständigen Immunantwort auch in Abwesenheit von Pathogenen.

In *Drosophila* existieren zwei Isoformen von Cactus, eine maternale und eine zygotische Isoform, die jedoch beide vom selben Gen kodiert werden. Beide Formen unterscheiden sich nur im C-terminalen Bereich um 12 Aminosäuren (Kidd, 1992). Sollte dies in *Tribolium* ebenfalls der Fall sein und auch dort beide Isoformen nur außerhalb der Ankyrin-Wiederholungen voneinander abweichen, so sollten beide Formen von der in dieser Arbeit verwendeten Probe detektiert worden sein. Jedoch kann nicht ausgeschlossen werden, dass eine weitere Isoform existiert, die nicht von der verwendeten Probe erkannt wird, da sie innerhalb der Wiederholungen eine abweichende Sequenz aufweist. Dies könnte die Abwesenheit von *Tccactus* Transkripten im frühen Embryo erklären.

Alternativ könnte es wie in *Apis* beobachtet auch in Coleopteren zu einer Duplikation und möglicherweise anschließend zu einer Subfunktionalisierung der beiden neuen *cactus*-Gene gekommen sein. Dann könnte eines dieser Gene einen Teil des maternalen Aspektes, das andere den zygotischen Aspekt der Funktion des ancestralen Gens verkörpern. Eine solche Duplikation ist in *Tribolium* z.B. für das *zerknüllt* Gen zu beobachten, wo beide Gene in der Region der zukünftigen Serosa exprimiert werden, jedoch eindeutig voneinander abweichende, nicht redundante Funktionen in der Spezifizierung dieser Gewebe erfüllen (Falciani *et al.*, 1996; M. van der Zee und S., Roth, in Vorbereitung). Auch wurde für die Evolutionslinie der Dipteren eine Duplikation eines ancestralen Hox3-Gens postuliert, in dessen Anschluss eines der beiden Gene (*bicoid*) eine anterior spezifizierende Funktion übernommen hat, während das andere, *zerknüllt*, eine Funktion in der Spezifizierung der extraembryonalen Membranen in höheren Dipteren erfüllt (Schmidt-Ott, 2000; Stauber *et al.*, 2002).

Während sich in frühen *Drosophila* Embryonen maternale *cactus* mRNA nachweisen lässt (Geisler *et al.*, 1992), konnte die Expression von *Tribolium cactus* mRNA im Embryo erst einige Stunden nach Eiablage nachgewiesen werden. Da jedoch in *Tribolium* Ovarien maternale *Tccactus* mRNA Expression beobachtet wurde, erscheint es wahrscheinlich, dass dieser Aspekt der Expression die Funktion von *Tccactus* im frühen Embryo sicherstellt. Das beob-

achtete Expressionsmuster lässt darauf schließen, dass die maternale mRNA im gesamten Ei lokalisiert wird und bis zum Zeitpunkt der Eiablage translatiert und anschließend komplett abgebaut wird. Maternales Cactus Protein sollte dann als cytoplasmatischer Inhibitor für TcDorsal im frühen Embryo fungieren. Dem entsprechend sollte sich Cactus Protein im abgelegten Ei nachweisen lassen. Leider war jedoch bis zum Abschluss dieser Arbeit die Erzeugung eines anti-TcCactus Antikörpers nicht möglich. Ein solcher Antikörper sollte nicht nur endgültigen Aufschluss über die zeitliche Aktivität des Cactus Proteins liefern, sondern auch Hinweise auf die Regulation des *Tccactus* Gens aufzeigen.

Die in dieser Arbeit dargestellte zygotische Expression von *Tccactus* korreliert zeitlich nicht mit der Annahme, dass Cactus als genereller Inhibitor der Kernlokalisierung von Dorsal in sämtlichen Zellen des frühen Blastoderms wirkt und der signalbedingte Abbau des zygotischen Cactus Proteins zur Ausbildung des Dorsal-Gradienten in den am weitesten ventral gelegenen Zellen führt. In diesem Falle müsste Dorsal in weiter dorsal gelegenen Zellen ebenfalls aufgrund der Abwesenheit von Cactus eine hohe Kernkonzentration aufweisen, was jedoch nicht der Fall ist.

Dagegen fällt der Beginn der zygotischen *Tccactus* Expression zeitlich in etwa mit der Verfeinerung des Dorsal-Gradienten auf der ventralen Seite des Blastoderm-Embryos zusammen (Chen *et al.*, 2000). In diesem Zusammenhang sind zwei mögliche Funktionen für TcCactus denkbar: Zum einen könnte die Aktivierung von *Tccactus* durch Dorsal selbst einen negativen Rückkopplungsmechanismus einleiten, in dessen Verlauf Cactus Protein das aus den Kernen austretende Dorsal-Protein im Cytoplasma festhält und somit ein Andauern des Kerntransportes des Dorsal-Proteins und die Regulierung seiner Zielgene unterbindet. Dieser Mechanismus könnte notwendig sein, um einen Übergang in der Festlegung einzelner Gewebetypen entlang der Dorsoventral-Achse von genereller, maternaler Positionsinformation hin zu einer genauen Regulierung der einzelnen Körperbereiche durch zygotische Kontrollgene zu gewährleisten. Solche möglichen „Master“-Kontrollgene könnten z.B. *Tctwist*, *Tcsog* oder *Tczen* für Mesoderm, neurogenes Ektoderm und extraembryonale Gewebe sein.

Eine weitere Möglichkeit wäre eine Einbeziehung des zygotischen Cactus Proteins in den Verfeinerungsprozess des Dorsal Gradienten selbst: Im Anschluss an die Errichtung des frühen, breiten Kerngradienten von Dorsal, beginnt eine konzentrationsabhängige Aktivierung von *cactus*. Dorsal überwindet die durch diese Cactus Expression errichtete, neue Schwelle

zum Kerntransport nur in den am weitesten ventral gelegenen Kernen, während weiter lateral gelegene Kerne durch Cactus nun an der Anreicherung hoher Konzentrationen von Dorsal gehindert werden und Dorsal in diesen Regionen im Cytoplasma festgehalten wird. Als Folge wird die Kernkonzentration von Dorsal in weiter lateral gelegenen Kernen verringert, während sie in den am weitesten ventral gelegenen Kernen unverändert bleibt. So bildet sich im Anschluss ein schärferer Gradient mit einem erhöhten Gefälle aus. Neben *Tccactus* zeigt auch die Expression von *TcToll* einen Hinweis auf einen extensiven Rückkopplungsmechanismus zur Etablierung des Dorsal-Gradienten in *Tribolium* (Basal, 2004).

Es konnte gezeigt werden, dass in *Drosophila* Dorsal in Zellkultur in der Lage ist, die Translation von Cactus zu verstärken und dessen Stabilität zu erhöhen (Kubota und Gay, 1995). In Vertebraten ist das Nf- κ B Protein p65 ebenfalls in der Lage, die Konzentration seines eigenen Inhibitors, I κ B zu erhöhen (Scott *et al.*, 1994). In diesem Falle jedoch erfolgt die Regulation offensichtlich auf transkriptioneller Ebene. Zudem konnten κ B-Bindestellen in der cis-regulatorischen Region des menschlichen I κ B- α Gens nachgewiesen werden, die für eine Aktivierung des I κ B- α Gens nach Induktion mit TNF α essentiell sind (Ito *et al.*, 1994). Es wurde postuliert, dass diese Regulierung Teil eines autoregulatorischen Rückkopplungsmechanismus ist, der als Folge eines signalabhängigen Abbaus des I κ B-Proteins benötigt wird, um ein andauerndes Gleichgewicht der Nf- κ B und I κ B Proteine in der Zelle zu gewährleisten.

Die in dieser Arbeit gezeigte Regulierung des *Tccactus* Gens erfolgt vermutlich in Abhängigkeit von Dorsal und findet offensichtlich auf transkriptioneller Ebene statt. In diesem Punkt erscheint damit die Situation in *Tribolium* ähnlicher der in Vertebraten als in höheren Dipteren. Dies lässt vermuten, dass eine transkriptionelle Regulation der I κ B-Gene durch Nf- κ B Faktoren eine ancestrale Situation darstellt und dass die translationelle Kontrolle, die in *Drosophila* nachgewiesen werden konnte, eine evolutionär neue Errungenschaft höherer Insekten darstellt.

Die späten Expressionsmuster von *Tccactus* in den Zellen der ventralen Mittellinie und der Anlage des Hinterdarms können bislang nicht hinreichend erklärt werden. Zwar wurde in *Drosophila* eine Expression von *cactus* in den Zellen des Mesektoderms beobachtet, jedoch konnte dieser Expression keine eindeutige Funktion zugewiesen werden (Kearney *et al.*, 2004 und S. Roth, persönliche Mitteilung). Ob die Expression von *Tccactus* tatsächlich ebenfalls in Zellen mesektodermalen Ursprungs stattfindet, kann anhand der vorliegenden Marker nicht geklärt werden. Hierzu könnte beispielsweise die Klonierung eines *Tribolium* Homologs zu

single minded, welches in *Drosophila* in den Zellen des Mesektoderms exprimiert wird und diese spezifiziert (Thomas *et al.*, 1988; Xiao *et al.*, 1996), Aufschluss verschaffen.

4.6 Die Toll-Dorsal Kaskade in *Tribolium*

Mit *pipe*, *Toll*, *dorsal* und *cactus* finden sich für wenigstens vier der 12 in *Drosophila* für die Dorsoventral-Achse zuständigen Kaskade eindeutige Orthologe in *Tribolium castaneum*. Dabei ist *dorsal* das bislang einzige Gen des intrazellulären Teils der Kaskade, für den eine rein maternale Expression nachgewiesen werden konnte (Chen *et al.*, 2000), während zumindest *Toll* und *cactus* auch zygotisch exprimiert werden (Maxton-Küchenmeister *et al.*, 1999; Basal, 2004 und diese Arbeit).

Vermutlich sind auch weitere, wesentliche Bestandteile der in *Drosophila* agierenden Kaskade in *Tribolium* wiederzufinden, da sich zumindest in Lepidopteren und Hymenopteren nahezu sämtliche Komponenten der Signalkette identifizieren lassen (vgl. 1.5). Außerhalb der Insekten finden sich jedoch bislang keine eindeutigen Hinweise auf eine Einbeziehung der Toll-Dorsal Kaskade in Prozesse der frühen Achsenbildung:

Im Egel *Helobdella robusta* (*Hro*) konnte eine Expression eines Dorsal Homologs während der frühen Embryonalentwicklung gezeigt werden (Goldstein *et al.*, 2001). Während jedoch *snail* als mögliches Zielgen von Dorsal in den selben Zellen angestellt wird, zeigt das beobachtete Expressionsmuster keinen Hinweis auf eine generelle Funktion dieses Dorsal Homologs in der dorsoventralen Musterbildung der Anneliden, da *Hrodorsal* in mesodermalen und ektodermalen Vorläuferzellen exprimiert wird, jedoch nicht im frühen Embryo ausschließlich in prospektiven ventralen Zellen zu finden ist.

Die Funktion von einigen Faktoren der Toll/Dorsal Kaskade wurde mittels Erzeugung geeigneter Deletionsmutanten in *Caenorhabditis elegans* untersucht (Pujol *et al.*, 2001). Es zeigte sich, dass weder Toll, noch Pelle oder Cactus an der frühen Embryonalentwicklung im Fadenwurm beteiligt ist. Auch die Resistenz gegen verschiedene Pathogene scheint in diesen Mutanten nicht beeinträchtigt. Statt dessen zeigt das untersuchte *Toll* Gen eine Funktion in der chemosensorischen Erkennung und Vermeidung bestimmter Pathogene. Des weiteren scheint im Genom von *C.elegans* kein Homolog eines Rel/Nf- κ B Gens zu existieren.

Jedoch kann die Situation in Anneliden wie in Nematoden als stark abweichend von der frühen Insektenentwicklung betrachtet werden: In beiden Systemen setzt eine Zellularisierung bereits sehr früh in der embryonalen Entwicklung, während der ersten Zellteilung, ein. Dies

macht insbesondere die Verwendung eines extrazellulären Liganden zur Aktivierung der intrazellulären Toll-Kaskade in diesen Stadien sehr unwahrscheinlich.

Die Achsenbildung in Vertebraten wird vornehmlich auf zygotischer Ebene realisiert. Hierbei spielen Homologe zu den *Drosophila* Genen *dpp* und *sog* entscheidende Rollen (zusammengefasst in Holley und Ferguson, 1997). Diese sind wie in *Drosophila* für eine frühe Unterteilung der dorsoventralen Achse zuständig, jedoch ist ihre Rolle hier im Vergleich zu Insekten invertiert: Während *dpp* in *Drosophila* im dorsalen Bereich exprimiert wird, wird sein Homolog BMP4 in *Xenopus* in prospektiven ventralen Geweben exprimiert, während Chordin, das Homolog zu Short Gastrulation eine dorsalisierende Funktion hat. Eine maternale Steuerung dieser Vorgänge ist jedoch bislang nicht eindeutig beschrieben worden.

Zwar zeigt das aus *Xenopus* isolierte, zu Dorsal ähnliche, Rel-1 Protein Expressionsmuster, die mit einer Funktion während der frühen Embryogenese vereinbar wären, und Überexpression dieses Proteins führt zu einer Unterdrückung dorsaler Zellschicksale, jedoch ließ sich bislang eine eindeutige Funktion für XRel-1 in der Achsenbildung nicht nachweisen (Kao und Lockwood, 1996; Armstrong *et al.*, 1998).

Interessanterweise existieren Hinweise, dass in Spinnen ebenfalls zygotisches Dpp eine gravierendere Rolle in der dorsoventralen Achsenbildung einnimmt, als dies bei Insekten der Fall ist (Akiyama-Oda und Oda, 2003).

Somit scheint die Rekrutierung der Toll-Dorsal Kaskade zur Spezifizierung der embryonalen, dorsoventralen Achse eine auf die Evolutionslinie der Arthropoden, vielleicht sogar auf die Insekten beschränkte Eigenschaft zu sein, während in anderen Invertebraten keine Anzeichen für eine Beteiligung dieser Signalkette an der Achsenbildung gefunden wurden. Da sowohl in Vertebraten als auch in Arthropoden (und zumindest teilweise auch in Pflanzen; Nürnberger *et al.*, 2004) diese Kaskade jedoch an der Immunantwort gegen Pathogene maßgeblich beteiligt ist, scheint dies die ancestrale Funktion des Toll-Dorsal Signalwegs zu sein. Eine ähnliche Sichtweise wurde unter anderem bereits in Hoffmann *et al.* (1999) und von Lall und Patel (2001) vertreten. Dagegen wird von Friedman und Hughes (2002) der Standpunkt vertreten, dass der Toll/Dorsal Signalweg in Vertebraten und Insekten unabhängig voneinander für die Funktionen innerhalb der Immunabwehr kooptiert wurde.

Die – mögliche – unabhängige Rekrutierung des Toll/Dorsal Signalweges zur Ausübung von Funktionen während der frühen Embryogenese in Insekten und *Xenopus* könnte auf eine

generelle Eignung dieses Signalweges für eine Steuerung früher Entwicklungsprozesse zurückzuführen sein.

Die beobachteten Unterschiede in der Bedeutung des maternalen Toll-Dorsal Systems im Vergleich zum Anteil von frühen zygotischen Genen an der dorsoventralen Musterbildung zwischen *Drosophila* und *Tribolium* lassen vermuten, dass der Toll-Dorsal Signalweg in Insekten zunächst eine untergeordnete Rolle gespielt hat und erst mit dem Auftreten eines syncytiellen Blastodermstadiums an Bedeutung gewonnen hat. In Langkeiminsekten führte dies dann zur Kontrolle der gesamten dorsoventralen Achsenbildung durch den Toll-Dorsal Signalweg. Falls diese Annahme zutrifft, sollte die Untersuchung dieses Signalweges in evolutionär niederen Insekten, den Hemimetabola, eine noch geringere Beteiligung von Dorsal an der Achsenbildung zeigen und somit den Grundtypus der dorsoventralen Achsenbildung in basalen Insekten aufklären helfen können.

5 Zusammenfassung

Im Gegensatz zur Etablierung der dorsoventralen Achse des *Drosophila* Embryos, ist die Spezifizierung dieser Körperachse in Kurzkeiminsekten bislang größtenteils unverstanden. Da die meisten Segmente von einer posterioren Wachstumszone in einer zellulären Umgebung hervorgebracht werden, stellt sich die Frage, ob maternale Faktoren Einfluss auf die dorsoventrale Musterbildung solcher Segmente haben können.

Der Nf- κ B ähnliche Faktor *Tribolium* Dorsal erfüllt, wie *Drosophila* Dorsal, essentielle Funktionen in der generellen Polarisierung der dorsoventralen Achse des *Tribolium* Embryos. Während wichtige Zielgene wie *twist* und *sog* zwischen *Drosophila* und *Tribolium* Dorsal offensichtlich konserviert sind, scheint die Regulierung anderer möglicher Zielgene durch TcDorsal indirekt zu verlaufen. Die Funktion von TcDorsal wird ebenfalls zur Spezifizierung des dorsoventralen Musters der posterioren Segmente benötigt, die erst nach Beendigung der Expression von Dorsal erzeugt werden.

Tribolium und *Anopheles* zeigen Anzeichen für eine Initiierung der Erzeugung der embryonalen Achsen bereits während der Oogenese. Dies ist umso erstaunlicher, als der Aufbau der Ovarien in Coleopteren von dem der Ovarien in Dipteren abweicht. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die asymmetrische Positionierung des Oozytenkerns und eine nachfolgende, asymmetrische Expression von Homologen des *Drosophila* Gens *pipe* im Follikelepithel konservierte Merkmale darstellen, die entscheidende maternale Beiträge zur Festlegung der ventralen Seite des zukünftigen Embryos liefern können.

Das isolierte *Tccactus* Gen besitzt ein Expressionsmuster, das eine Rolle in der Verfeinerung des Dorsal Gradienten oder in der Übertragung der maternalen polarisierenden Information an zygotische Gene nahe legt. Obwohl maternale RNA im frühen *Tribolium* Embryo nicht nachweisbar ist, könnte die beobachtete maternale Expression der *Tccactus* mRNA in Ovarien eine Quelle zur Erzeugung von maternalem Cactus Protein sein, dass im frühen Embryo eine Rolle als genereller cytoplasmatischer Inhibitor für TcDorsal erfüllen könnte.

Somit erscheinen entscheidende Prozesse der Achsenbildung zwischen Kurz- und Langkeiminsekten konserviert. Die beobachteten Unterschiede zwischen beiden Insektengruppen in Bezug zur Bedeutung des maternalen Toll/Dorsal Signalweges im Vergleich zu zygotischen Genen für die Achsenfestlegung könnten hierbei in speziellen Anpassungen an den jeweiligen Modus der Embryogenese begründet sein.

Abstract

Whereas the formation of the embryonic dorsoventral axis of the *Drosophila* embryo has been analysed in great detail, the specification of this body axis in short-germ insects is only poorly understood. As most of the segments are produced by a posterior growth zone in a cellular environment, the question arises if early acting factors can participate in the dorsoventral organization of later added segments.

In this work, we show that the *Tribolium* Nf- κ B like factor Dorsal, like its *Drosophila* counterpart, is essential for the polarization of the dorsoventral axis of the *Tribolium* embryo albeit having a more general role in axis formation. Whereas key target genes as *twist* and *sog* are conserved between *Drosophila* and *Tribolium* Dorsal, the influence of TcDorsal on other putative target genes might be indirect. Dorsal function was also found to be required for defining the dorsoventral axis of posterior segments, that are only added long after Dorsal expression is detectable.

Furthermore, *Tribolium* and *Anopheles* show clear signs of early steps of axis formation already during oogenesis. This is remarkable as the architecture of ovaries in Coleopterans deviates from that of Dipteran ovaries. Here, the asymmetrical positioning of the oocyte nucleus and subsequent asymmetric expression of homologues to the *Drosophila* gene *pipe* were found to be conserved between the analysed species and might provide maternal cues for defining the ventral side of the future embryo.

The expression pattern of the isolated *Tccactus* gene implies a role for *Tccactus* in refining the Dorsal gradient or transducing maternal polarizing information to zygotic genes. Though maternal RNA was not detectable in the early *Tribolium* embryo, maternal expression of *Tccactus* mRNA in the ovary might supply the developing oocyte with a source for maternal Cactus protein that could fulfil a function as a general cytoplasmic inhibitor of TcDorsal in the early embryo.

Thus, fundamental processes in dorsoventral axis formation seem to be conserved between short-germ and long-germ insects. The differences between both types of insects regarding the impact of the maternal Toll/Dorsal pathway versus zygotic genes on axis formation might be attributed to the different modes of embryogenesis.

6 Anhang

6.1 Allgemeine Abkürzungen

<i>Ag</i>	<i>Anopheles gambiae</i>
<i>Am</i>	<i>Apis mellifera</i>
AP	anterioposterior
AS	Aminosäure(n)
<i>Bm</i>	<i>Bombyx mori</i>
bp	Basenpaare
cDNA	Komplementäre DNA (<i>complementary DNA</i>)
<i>Ce</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
<i>Dm</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynucleosidtriphosphat
<i>Dp</i>	<i>Drosophila pseudoobscura</i>
ds	doppelsträngig
DV	dorsoventral
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EtOH	Ethanol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
hpi	Stunden nach Induktion (Blutmahl)
kb	Kilobasenpaare
mRNA	Boten RNA (<i>messenger RNA</i>)
OD	Optische Dichte
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA Interferenz
SSC	<i>standard saline citrate</i>
ST-Box	Sulfotransferase-Box
TBE	<u>T</u> ris/ <u>B</u> orat/ <u>E</u> DTA-Puffer
<i>Tc</i>	<i>Tribolium castaneum</i>
TE	Tris/EDTA-Puffer
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-Amniomethan
U	Einheiten (<i>units</i>)
Upm	Umdrehungen pro Minute
h	Stunde
min	Minute
sec	Sekunde
ü.N.	Über Nacht
RT	Raumtemperatur

6.2 Partielle cDNA Sequenz von *Tcpipe* und abgeleitete Proteinsequenz

```

1      caagtaaataacaccctgaaagcacagcagaacattgttttcttcaatcgagttccaaaa
1      Q V N N T L K A Q Q N I V F F N R V P K

61     gttggttcccaaactttaatggaattaatacgcgattaagtataagaaataatTTTtggc
21     V G S Q T L M E L I R R L S I R N N F G

121    tttcatcaagatagggtgcaaagagtggaaacaattagactctctccagaagatcaagca
41     F H Q D R V Q R V E T I R L S P E D Q A

181    gtattatcatccctgggtgtctagttatgaacctccaggagtttataatcaaacatgTTTtgc
61     V L S S L V S S Y E P P G V Y I K H V C

241    tttaccaacatatcaagatTTTtggatttctgaaccaatttatataaatctcgTactcgcgac
81     F T N I S R F G F P E P I Y I N L V R D

301    ccagtggaaacgcgtaatTTTtcttggattattatgtaagagctccatggTactacgTTtgaa
101    P V E R V I S W Y Y Y V R A P W Y Y V E

361    agaaaaattgccttctcctgacattcctcttccagatcctaaatggctaaaaaaggatTTTt
121    R K I A F P D I P L P D P K W L K K D F

421    gaacattgcgTTTTtgagcggTgatcgggaaatgcaaatatctgacgggagaaaactcgTgaa
141    E H C V L S G D R E C K Y L T G E T R E

481    ggaataggagaccccagacgtcaatctatggTTTTtctgtggcc
161    G I G D P R R Q S M F F C G

```

Abb.6.1: Sequenz der mittels PCR amplifizierten, partiellen cDNA von *Tcpipe*. Dargestellt ist ebenfalls die aus der cDNA-Sequenz abgeleitete Proteinsequenz des längsten offenen Leserasters dieser cDNA.

6.3 Phylogenetischer Stammbaum der Pipe Proteine aus Insekten

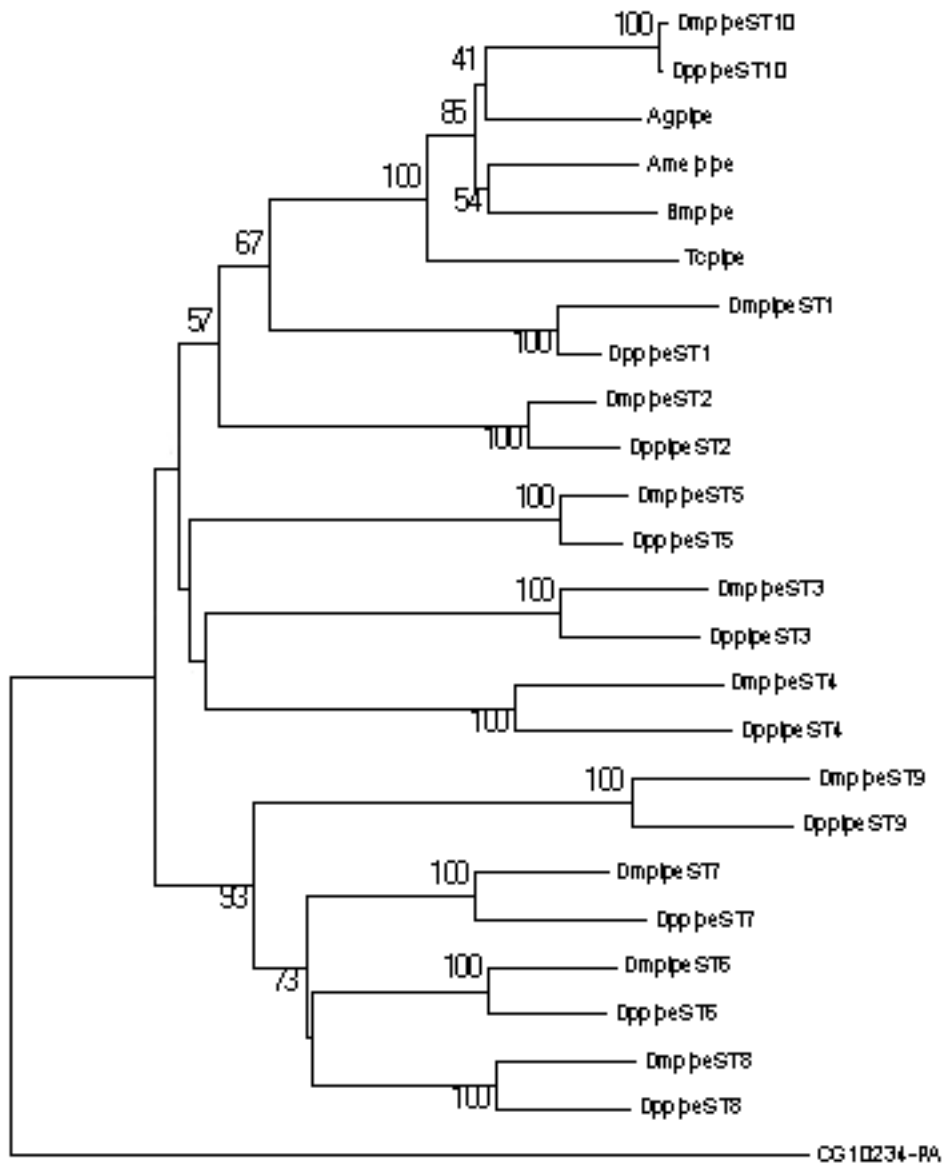


Abb.6.2: Phylogenetischer Vergleich der in *Tribolium*, *Bombyx*, *Apis* und *Anopheles* identifizierten Pipe ähnlichen Proteine mit den ST-Boxen der *pipe* Loci aus *Drosophila melanogaster* und *D. pseudoobscura* sowie mit dem vorhergesagten Produkt des Gens CG10234 aus *Drosophila melanogaster*. Dargestellt ist der mit Hilfe der Neighbour-Joining Methode erzeugte Stammbaum, der aus 700 Zwischenbäumen errechnet wurde. Die Werte an den Verzweigungspunkten geben die sogenannten „bootstrap values“ an.

6.4 Partielle cDNA Sequenz von *Tcactus* und abgeleitete Proteinsequenz

```

1   tggaaacagtatattccaacaggatgaggatggcgatacgttccctccacttggetattgcc
1   W K Q Y F Q Q D E D G D T F L H L A I A
61  gaaggattcgtcgaggtagtccttgctttaatcaggaaagctccccaccctttgttcctt
21  E G F V E V V L A L I R K A P H P L F L
121 gacacccccaatgataacgcccacacccaatccacctcgccgctgccaacagaactgg
41  D T P N D N A Q T P I H L A A A K Q N W
181 ctaatagttcgggtggttggtggcaggtgctaaaccctgtcccagaaacatccgaggt
61  L I V R W L V V A G A K P C P R N I R G
241 gattcacccttacatatagcagtagcagaatgggtgatttacgaacatgcagagccatcacc
81  D S P L H I A V R N G D L R T C R A I T
301 gatccagtacaagaacaagaaaggatatacacttggtttaacttaccacaaacagccctat
101 D P V Q E Q E R I S L G L T Y P K Q P Y
361 caggagatcaatctcgaccaatggaactacgaaggtcagacgtgctgcatgtggctgcc
121 Q E I N L D Q W N Y E G Q T C V H V A A
421 atcgaaggccacatcgacgttctgcccacctgggtgtggtacggcgccgacatcaacgcc
141 I E G H I D V L R H L V W Y G A D I N A
481 cgagaaggctcgccagggttacaccgcccctccactactccatagtgcggggcatgaacgt
161 R E G R Q G Y T A L H Y S I V R G D E R
541 ctggcgcactttttactctccgaatgcacgaaattgaacgccgacgccgtcacctacggt
181 L A H F L L S E C T K L N A D A V T Y G
601 ggaaacagcgcc
201 G N S A

```

Abb.6.3: Sequenz der mittels PCR amplifizierten, partiellen cDNA von *Tcactus*. Dargestellt ist ebenfalls die aus der cDNA-Sequenz abgeleitete Proteinsequenz des längsten offenen Leserasters. Die fünf Ankyrin-Wiederholungen sind unterstrichen, ein Threonin, das möglicherweise ein Phosphorylierungssignal darstellt, ist rot markiert.

7 Literatur

- Adoutte, A., Balavoine, G., Lartillot, N., Lespinet, O., Prud'Homme, B. und DeRosa, R.** (2000). The new animal phylogeny: Reliability and implications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 4453-4456.
- Akiyama-Oda, Y und Oda, H.** (2003). Early patterning of the spider embryo: a cluster of mesenchymal cells at the cumulus produces Dpp signals received by germ disc epithelial cells. *Development* **130**, 1735-1747.
- Anderson, K.V.** (2000). Toll signalling in the innate immune response. *Curr. Opin. Immunol.* **12**, 13-19.
- Anderson, K.V.** (1998). Pinning down positional information: Dorsal-ventral polarity in the *Drosophila* embryo. *Cell* **95**, 439-442.
- Aoki, T., Sano, Y., Yamamoto, T. und Inoue, J.I.** (1996). The ankyrin repeats, but not the PEST-like sequences are required for signal-dependent degradation of IkappaBalpha. *Oncogene* **12**, 1159-1164.
- Armstrong, N.J., Steinbeisser, H., Prothmann, C., DeLotto, R. und Rupp, R.A.** (1998). Conserved Spätzle/Toll signaling in dorsoventral patterning of *Xenopus* embryos. *Mech. Dev.* **71**, 99-105.
- Ashe, H.L., Mannervik, M. und Levine, M.** (2000). Dpp signaling thresholds in the dorsal ectoderm of *Drosophila* embryos. *Development* **127**, 3305-3312.
- Basal, A.** (2004) Funktionelle Studien zur dorsoventralen Musterbildung in *Tribolium castaneum*. Inaugural-Dissertation, Universität zu Köln.
- Belvin, M.P., Jin, Y. und Anderson, K.V.** (1995). Cactus protein degradation mediates *Drosophila* dorsal-ventral signalling. *Gen. Dev.* **9**, 783-793.
- Belvin, M.P. und Anderson, K.V.** (1996). A conserved signalling pathway: The *Drosophila* Toll-Dorsal pathway. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **12**, 393-416.
- Berghammer, A.J., Klingler, M. und Wimmer, E.A.** (1999a). A universal marker for transgenic insects. *Nature* **402**, 370-371.
- Berghammer, A., Bucher, G., Maderspacher, F. und Klingler, M.** (1999b). 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 of the dorsal morphogen in *Drosophila*. *Mech. Dev.* **60**, 109-123.

- Biehs, B., Francois, V. und Bier, E.** (1996). The *Drosophila short gastrulation* gene prevents Dpp from autoactivating and suppressing neurogenesis in the neuroectoderm. *Genes Dev.* **10**, 2922-2934.
- Brennan, C.A. und Anderson, K.V.** (2004). *Drosophila*: The genetics of innate immune recognition and response. *Annu. Rev. Immunol.* **22**, 457-483.
- Brown, S.J., Mahaffey, J.P., Lorenzen, M.D., Denell, R.E. und Mahaffey, J.W.** (1999). Using RNAi to investigate orthologous homeotic gene function during development of distantly related species. *Evol. Dev.* **1**, 11-15.
- Brown, S.J., Patel, N.H. und Denell, R.E.** (1994). Embryonic expression of the single *Tribolium engrailed* homolog. *Dev Genet.* **15**, 7-18.
- Brown S., Fellers J., Shippy T., Denell R., Stauber M. und Schmidt-Ott U.** (2001). A strategy for mapping bicoid on the phylogenetic tree. *Curr Biol* **11**, R43-4.
- Brown, S.J., Fellers, J.P., Shippy, T.D., Richardson, E.A., Maxwell, M., Stuart, J.J. und Denell, R.E.** (2002). Sequence of the *Tribolium castaneum* homeotic complex: the region corresponding to the *Drosophila melanogaster* antennapedia complex. *Genetics* **160**, 1067-1074.
- Brown, S.J., Denell, R.E. und Beeman, R.** (2003). Beetling around the genome. *Genet. Res. Camb.* **82**, 155-161.
- Bucher, G., Scholten, J. und Klingler, M.** (2002). Parental RNAi in *Tribolium* (Coleoptera). *Curr. Biol.* **12**, R85-86.
- Cai, H.N., Arnosti, D. und Levine, M.** (1996). Long-range repression in the *Drosophila* embryo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 9309-9314.
- Caterino, M.S., Shull, V.L., Hammond, P.M. und Vogler, A.P.** (2002). Basal relationships of Coleoptera inferred from 18S rDNA sequences. *Zool. Scripta* **31**, 41-49.
- Chariot, A., Leonardi, A., Muller, J., Bonif, M., Brown, K. und Siebenlist, U.** (2002). Association of the adaptor TANK with the I kappa B kinase (IKK) regulator NEMO connects IKK complexes with IKK epsilon and TBK1 kinases. *J. Biol. Chem.* **277**, 37029-37036.
- Chen, G., Handel, K. und Roth, S.** (2000). The maternal NF- κ B/Dorsal gradient of *Tribolium castaneum*: dynamics of early dorso-ventral patterning in a short-germ beetle. *Development* **127**, 514-5156.
- Christophides, G.K., Zdobnov, E., Barillas-Mury, C., Birney, E., Blandin, S., Blass, C., Brey, P.T., Collins, F.H., Danielli, A., Dimopoulos, G., Hetru, C., Hoa, N.T., Hoffmann, J.A., Kanzok, S.M., Letunic, I., Levashina, E.A., Loukeris, T.G., Lycett, G., Meister, S., Michel, K., Moita, L.F., Müller, H.-M., Osta, M.A., Paskewitz, S.M., Reichhart, J.-M., Rzhetsky, A., Troxler, L., Vernick, K.D., Vlachou, D., Volz, J., von Mering, C., Xu, J., Zheng, L., Bork, P., und Kafatos, F.C.** (2002). Immunity-related genes and gene families in *Anopheles gambiae*. *Science* **298**, 159-165.

- Costa, M., Sweeton, D. und Wieschaus, E.** (1993). Gastrulation in *Drosophila*: cellular mechanisms of morphogenetic movements. In: The development of *Drosophila melanogaster*; Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Cowden, J. und Levine, M.** (2003). Ventral dominance governs sequential patterns of gene expression across the dorsal-ventral axis of the neuroectoderm in the *Drosophila* embryo. *Dev. Biol.* **262**, 335-349.
- Cranston, P.S. und Gullan, P.J.** (2003) Phylogeny of insects. pp. 882-898. In V.H. Resh and R. T. Cardé (eds), *Encyclopedia of Insects*. Academic Press. Amsterdam.
- DeLotto, R.** (2001). Gastrulation defective, a complement factor C2/B-like protease, interprets a ventral prepattern in *Drosophila*. *EMBO Rep.* **2**, 721-726.
- Dissing, M., Giordano, H., und DeLotto, R.** (2001). Autoproteolysis and feedback in a protease cascade directing *Drosophila* dorsal-ventral cell fate. *EMBO J.* **20**, 2387-2393.
- Drier, E.A., Govind, S. und Steward, R.** (1999). Cactus-independent regulation of Dorsal nuclear import by the ventral signal. *Curr. Biol.* **10**, 23-26.
- Dushay, M.S., Åsling, B. und Hultmark, D.** (1996). Origins of immunity: *Relish*, a compound Rel-like gene in the antibacterial defense of *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 10343-10347.
- Eckert, C., Aranda, M., Wolff, C. und Tautz, D.** (2004). Separable stripe enhancer elements for the pair-rule gene *hairy* in the beetle *Tribolium*. *EMBO reports* **5**, 638-642.
- Edwards, D.N., Towb, P. und Wasserman, S.A.** (1997). An activity-dependent network of interactions links the Rel protein Dorsal with its cytoplasmic regulators. *Development* **124**, 3855-3864.
- Ephrussi, A. und St. Johnston, D.** (2004). Seeing is believing: the bicoid morphogen gradient matures. *Cell* **116**, 143-152.
- Falciani, F., Hausdorf, B., Schröder, R., Akam, M., Tautz, D., Denell, R. und Brown, S.** (1996). Class 3 Hox genes in insects and the origin of *zen*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 8479-8484.
- Flores-Saaib, R.D., Jia, S. und Courey, A. J.** (2001) Activation and repression by the C-terminal domain of Dorsal. *Development* **128**, 1869-1879.
- Flybase Consortium** (1999). The FlyBase database of the *Drosophila* Genome Projects and literature. *Nucleic Acids Res.* **27**, 85-88.
- Freeman, M. und Gurdon, J.B.** (2002). Regulatory principles of developmental signaling. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **18**, 515-539.
- French, V.** (1993). Insect development: The long and the short of it. *Nature* **361**, 400-401.
- Friedman, R. und Hughes, A.L.** (2002). Molecular evolution of the Nf- κ B signaling system. *Immunogenetics* **53**, 964-974.

- Gangloff, M., Weber, A.N.R., Gibbard, R.J. und Gay, N.J.** (2003). Evolutionary relationships, but functional differences, between the *Drosophila* and the human Toll-like receptor families. *Biochem. Soc. Trans.* **31**, 659-663.
- 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 κ B gene family of vertebrates. *Cell* **71**, 613-621.
- Girardin, S.E., Sansonetti, P.J. und Philpott, D.J.** (2002). Intracellular vs extracellular recognition of pathogens – common concepts in mammals and flies. *Trends Microbiol.* **10**, 193-199.
- Goldmann-Levi, R., Miller, C., Greenberg, G., Gabai, E. und Zak, N.B.** (1996). Cellular pathways acting along the germband and in the amnioserosa may participate in germband retraction of the *Drosophila melanogaster* embryo. *Int. J. Dev. Biol.* **40**, 1043-1051.
- Goldstein, B., Leviten, M.W. und Weisblat, D.A.** (2001). Dorsal and Snail homologs in leech development. *Dev. Genes Evol.* **211**, 329-337.
- Gonzalez-Reyes, A. und St.Johnston, D.** (1998). Patterning of the follicle epithelium along the anterior-posterior axis during *Drosophila* oogenesis. *Development* **125**, 2837-2846.
- Govind, S.** (1998). Rel signalling pathway and the melanotic tumor phenotype of *Drosophila*. *Biochem. Soc. Trans.* **24**, 39-44.
- Govind, S.** (1999). The control of development and immunity by Rel transcription factors in *Drosophila*. *Oncogene* **18**, 6875-6887.
- 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.
- Han, J., Lee, S.H., Tan, Y., LeMosy, E.K. und Hashimoto, C.** (2000). Gastrulation defective is a serine protease involved in activating the receptor Toll to polarize the *Drosophila* embryo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 9093-9097.
- Handel, K., Grünfelder, C.G., Roth, S. und Sander, K.** (2000). *Tribolium* embryogenesis: a SEM study of cell shapes and movements from blastoderm to serosal closure. *Dev. Genes Evol.* **210**: 167-179.
- Handel, K., Basal, A., Fan, X. und Roth, S.** (2004). *Tribolium castaneum twist*: gastrulation and mesoderm formation in a short-germ beetle. *Dev. Genes Evol.*, in Druck.
- 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.
- Hecht, P.M. und Anderson, K.V.** (1992). Extracellular proteases and embryonic pattern formation. *Trends Cell Biol.* **2**, 197-202.

Hedengren, M., Asling, B., Dushay, M.S., Ando, I., Ekengren, S., Wihlborg, M. und Hultmark, D. (1999). Relish, a central factor in the control of humoral but not cellular immunity in *Drosophila*. *Mol. Cell* **4**, 827-837.

Heitzler, P., Haenlin, M., Romain, P., Calleja, M. und Simpson, P. (1996). A genetic analysis of *pannier*, a gene necessary for viability of dorsal tissues and bristle positioning in *Drosophila*. *Genetics* **143**, 1271-1286.

Higgins, D., Thompson, J., Gibson, T., Thompson, J.D., Higgins, D.G. und Gibson, T.J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* **22**, 4673-4680.

Ho, K., Dunin-Borkowski, O.M. und Akam, M. (1997). Cellularization in locust embryos occurs before blastoderm formation. *Development* **124**, 2761-2768.

Hoffmann, J.A., Kafatos, F.C., Janeway, C.A. und Ezekowitz, R.A. (1999). Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science* **284**, 1313-1318.

Holley, S.A. und Ferguson, E.L. (1997). Fish are like flies are like frogs: conservation of dorsal-ventral patterning mechanisms. *Bioessays* **19**, 281-284.

Imler, J.-L. und Hoffmann, J.A. (2000). Signaling mechanisms in the antimicrobial host defense of *Drosophila*. *Curr. Opin. Microbiol.* **3**: 16-22.

Ip, Y.T., Park, R.E., Kosman, D., Bier, E. und Levine, M. (1992a). The dorsal gradient morphogen regulates stripes of *rhomboid* expression in the presumptive neuroectoderm of the *Drosophila* embryo. *Gen. Dev.* **6**, 1728-1739.

Ip, Y.T., Park, R.E., Kosman, D., Yazdanbakhsh, K. und Levine, M. (1992b). *dorsal-twist* interactions establish *snail* expression in the presumptive mesoderm of the *Drosophila* embryo. *Gen. Dev.* **6**, 1518-1530.

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.

Ito, C.Y., Kazantsev, A.G. und Baldwin jr, A.S. (1994). Three Nf- κ B sites in the I κ B- α promoter are required for induction of gene expression by TNF α . *Nuc. Acids Res.* **22**, 3787-3792.

Januschke, J., Gervais, L., Dass, S., Kaltschmidt, J.A., Lopez-Schier, H., St. Johnston, D., Brand, A.H., Roth, S. und Guichet, A. (2002). Polar transport in the *Drosophila* oocyte requires Dynein and Kinesin I cooperation. *Curr. Biol.* **12**, 1971-1981.

Jiang, J., Kosman, D., Ip, Y.T. und Levine, M. (1991). The dorsal morphogen gradient regulates the mesoderm determinant *twist* in early *Drosophila* embryos. *Gen. Dev.* **5**, 1881-1991.

- Kao, K.R. und Lockwood, A.** (1996). Negative regulation of dorsal patterning in early embryos by overexpression of XrelA, a *Xenopus* homologue of NF- κ B . *Mech. Dev.* **58**, 129-139.
- Karin, M.** (1999). The beginning of the end: I κ B kinase (IKK) and Nf- κ B activation. *J. Biol. Chem.* **274**, 27339-27342.
- Kearney, J.B., Wheeler, S.R., Estes, P., Parente, B. und Crews, S.T.** (2004). Gene expression profiling of the developing *Drosophila* CNS midline cells. *Dev. Biol.* **275**, 473-492.
- Kidd, S.** (1992). Characterization of the *Drosophila cactus* locus and analysis of interaction between cactus and dorsal proteins. *Cell* **71**, 623-635.
- Kispert, A., Herrmann, B.G., Leptin, M. und Reuter, R.** (1994). Homologs of the mouse brachyury gene are involved in the specification of posterior terminal structures in *Drosophila*, *Tribolium* and *Locusta*. *Genes Dev.* **8**, 2137-2150.
- Kleine-Schonfeld, H. und Engels, W.** (1981). Symmetrical pattern of follicle arrangement in the ovary of *Musca domestica* (Insecta, Diptera). *Zoomorphology* **98**, 185-190.
- Kobayashi, M., Habuchi, H., Yoneda, M., Habuchi, O. und Kimata, K.** (1997). Molecular cloning and expression of Chinese Hamster ovary cell heparan-sulfate-2-sulfotransferase. *J. Biol. chem.* **272**, 13980-13985.
- 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.
- Krem, M.M. und Di Cera, E.** (2002). Evolution of enzyme cascades from embryonic development to blood coagulation. *Trends Biochem. Sci.* **27**, 67-74.
- Kubota, K. und Gay, N.J.** (1995). The dorsal protein enhances the biosynthesis and stability of the *Drosophila* I κ B homologue cactus. *Nuc. Acids Res.* **23**, 3111-3118.
- Kumar, S., Tamura, K. und Nei, M.** (2004). MEGA3 : Integrated software for Molecular Evolutionary Genetic Analysis and sequence alignment. *Brief. Bioinf.* **5**, 2.
- Lall, S. und Patel, N.H.** (2001). Conservation and divergence in molecular mechanisms of axis formation. *Annu. Rev. Genet.* **35**, 407-437.
- Lemaitre, B., Meister, M., Govind, S., Georgel, P., Steward, R., Reichhar, J.-M. und Hoffmann, J.A.** (1995). Functional analysis and regulation of nuclear import of *dorsal* during the immune response in *Drosophila*. *EMBO J.* **14**, 536-545.
- Lemaitre, B., Nicholas, 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.
- LeMosy, E.K., Tan, Y-Q. und Hashimoto, C.** (2001). Activation of a protease cascade involved in patterning the *Drosophila* embryo. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **98**, 5055-5060.
- Leptin, M.** (1991). *twist* and *snail* as positive and negative regulators during *Drosophila* mesoderm development. Genes Dev. **5**, 1568-1576.
- Letsou, A., Alexander, S., Orth, K. und Wasserman, S.** (1991). Genetic and molecular characterization of *tube*, a *Drosophila* gene maternally required for embryonic dorsoventral polarity. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **88**, 810-814.
- Levashina, E.A., Langley, E., Green, C., Gubb, D., Ashburner, M., Hoffmann, J.A. und Reichhart, J.-M.** (1999). Constitutive activation of Toll-mediated antifungal defense in serpin-deficient *Drosophila*. Science **285**, 1917-1919.
- Liu, H., Su, Y.C., Becker, E., Treisman, J. und Skolnik, E.Y.** (1999). A *Drosophila* TNF-receptor-associated factor (TRAF) binds the ste20 kinase Misshapen and activates Jun kinase. Curr. Biol. **9**, 101-104.
- Liu, Z. und Friedirch, M.** (2004). The *Tribolium* homologue of *glass* and the evolution of insect larval eyes. Dev. Biol. **269**, 36-54.
- Lorenzen, M.D., Berghammer, A.J., Brown, S.J., Denell, R.E., Klingler, M. und Beeman, R.W.** (2003). piggyBac-mediated germline transformation in the beetle *Tribolium castaneum*. Insect Mol. Biol. **12**, 433-440.
- Lygioxigakis, P., Roth, S. und Reichhart, J.-M.** (2003). A Serpin regulates dorsal-ventral axis formation in the *Drosophila* embryo. Curr. Biol. **13**, 2097-2102.
- Lynch, J. und Desplan, C.** (2003). 'De-Evolution' of *Drosophila* toward a more generic mode of axis patterning. Int. J. Dev. Biol. **47**, 497-503.
- Markstein, M., Markstein, P., Markstein, V. und Levine, M.S.** (2002). Genome-wide analysis of clustered Dorsal binding sites identifies putative target genes in the *Drosophila* genome. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **99**, 763-768.
- Maxton-Küchenmeister, J., Handel, K., Schmidt-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.
- Meng, X., Khanuja, B.S. und Ip, Y.T.** (1999). Toll receptor-mediated *Drosophila* immune response requires Dif, an NF-kappaB factor. Genes Dev. **13**, 792-797.

- Meister, M., Lemaitre, B. und Hoffmann, J.A.** (1997). Antimicrobial peptide defense in *Drosophila*. *BioEssays* **19**, 1019-1026.
- Mikulski, C.** (2004). Funktionelle Analysen zygotischer dorsoventral Gene in *Tribolium castaneum*. Diplomarbeit, Universität zu Köln.
- 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.
- 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.
- Monnerat, A.T., Pelajo-Machado, M., Vale, B.S., Soares, M.J., Lima, J.B.P., Lenzi, H.L. und Valle, D.** (2002). *Anopheles albitarsis* embryogenesis: Morphological identification of major events. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **97**, 589-596.
- Montgomery, M.K., Xu, S. und Fire, A.** (1998). RNA as a target of RNA mediated genetic interference in *Caenorhabditis elegans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 15502-15507.
- 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.
- Neumann-Silberberg, F.S. und Schüpbach, T.** (1994). Dorsoventral axis formation in *Drosophila* depends on the correct dosage of the gene *gurken*. *Development* **120**, 2457-63.
- Nilson, L.A. und Schüpbach, T.** (1998). Localized requirements for *windbeutel* and *pipe* reveal a dorsoventral prepattern within the follicular epithelium of the *Drosophila* ovary. *Cell* **93**, 253-262.
- Nürnberg, T., Brunner, F., Kemmerling, B. und Piater, L.** (2004). Innate immunity in plants and animals: striking similarities and obvious differences. *Immunol. Rev.* **198**, 249-266.
- O'Neill L.A.** (2003). The role of MyD88-like adapters in Toll-like receptor signal transduction. *Biochem Soc Trans.* **31**, 643-647.
- Ong, E., Yeh, J-C., Ding, Y., Hindsgaul, O., Pedersen, L.C., Negishi, M. und Fukuda, M.** (1999). Structure and function of HNK-1 sulfotransferase. *J. Biol. Chem.* **274**, 25608-25612.
- Parker, J.S., Mizuguchi, K. und Gay, N.J.** (2001). A family of proteins related to Spätzle, the toll receptor ligand, are encoded in the *Drosophila* genome. *Proteins* **45**, 71-80.
- Patel, N.H., Martin, B.E., Coleman, K.G., Poole, S.J., Ellis, M.C., Korneberg, Z.B. und Goodman, C.S.** (1989). Expression of Engrailed proteins in arthropods, annelids and chordates. *Cell* **58**, 955-968.
- Patel, N.H.** (1994a). Developmental evolution: Insights from studies of insect segmentation. *Science* **266**, 581-589.

- Patel, N.H., Hayward, D.C., Lall, S., Pirkel, N.R., Di Pietro, D. und Ball, E.E.** (2001). Grasshopper *hunchback* expression reveals conserved and novel aspects of axis formation and segmentation. *Development* **128**, 3459-3472.
- Peri F., Bökel C. und Roth S.** (1999). Local Gurken signaling and dynamic MAPK activation during *Drosophila* oogenesis. *Mech Dev.* **81**, 75-88.
- Petersen, U.M., Kadalayil, I., Rehorn, K.P., Hoshizaki, D.K., Reuter, R. und Engstrom, W.** (1999). Serpent regulates *Drosophila* immunity genes in the fat body through an essential GATA motif. *EMBO J.* **18**, 4013-4022.
- Pujol, N., Link, E.M., Liu, L.X., Leopold Kurz, C., Alloing, G., Tan, M.-W., Ray, K.P., Solari, R., Johnson, C.D. und Ewbank, J.J.** (2001). A reverse genetic analysis of components of the Toll signaling pathway in *Caenorhabditis elegans*. *Curr. Biol.* **11**, 809-821.
- Qiu, P., Pan, P.C. und Govind, S.** (1999). A role for the *Drosophila* Toll/Cactus pathway in larval hematopoiesis. *Development* **125**, 1909-1920.
- 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.
- Ray, R.P. und Schüpbach, T.** (1996). Intercellular signaling and the polarization of body axes during *Drosophila* oogenesis. *Genes Dev.* **10**, 1711-1723.
- 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.
- 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.
- 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., 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.
- Roth, S., Jordan, P. und Karess, R.** (1996). Binuclear *Drosophila* oocytes: Consequences and implications for dorsal-ventral patterning in oogenesis and embryogenesis. *Development* **126**, 927-934.

Roth, S. (2003). The origin of dorsoventral polarity in *Drosophila*. Phil. Trans. R. Soc. Ser. B. **358**, 1317-1329.

Rushlow, C. und Arora, K. (1990) Dorsal ventral polarity and pattern formation in the *Drosophila* embryo. Semin. Cell Biol. **1**, 137-49.

Rushlow, C., Colosimo, P.F., Lin, M., Xu, M. und Kirov, N. (2000). Transcriptional regulation of the *Drosophila* gene *zen* by competing Smad and Brinker inputs. Gen. Dev. **15**, 340-351.

Sanchez-Salazar, J., Pletcher, M.T., Bennett, R.L., Brown, S.J., Dandamudi, T.J., Denell, R.E. 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.

Savard, J. (2004). A genomic approach to the study of *Tribolium castaneum* genetics, development & evolution. Inaugural-Dissertation, Universität zu Köln.

Schmidt-Ott, U. (2000). The amnioserosa is an apomorphic character of cyclorrhaphan flies. Development **210**, 373-376.

Schröder, R., Eckert, C., Wolff, C. und Tautz, D. (2000). Conserved and divergent aspects of terminal patterning in the beetle *Tribolium castaneum*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **97**, 6591-6596.

Schröder, R. (2003). The genes *orthodenticle* and *hunchback* substitute for *bicoid* in the beetle *Tribolium*. Nature **422**, 621-625.

Scott, M.L., Fujita, T., Liou, H.C., Nolan, G.P. und Baltimore, D. (1993). The p65 subunit of NF-kappa B regulates I kappa B by two distinct mechanisms. Genes Dev. **7**, 1266-1276.

Sen, J., Goltz, J.S., Stevens, L. und Stein, D. (1998). Spatially restricted expression of *pipe* in the *Drosophila* egg chamber defines embryonic dorso-ventral polarity. Cell **95**, 471-481.

Sen, J., Goltz, J.S., Konsolaki, M., Schüpbach, T. und Stein, D. (2000). Windbeutel is required for function and correct subcellular localization of the *Drosophila* patterning protein Pipe. Development **127**, 5541-5550.

Sergeev, P., Streit, A., Heller, A. und Steinmann-Zwicky, M. (2001). The *Drosophila* dorsoventral determinant *pipe* contains ten copies of a variable domain homologous to mammalian heparan sulfate 2-sulfotransferase. Dev. Dyn. **220**, 122-132.

Silverman, N. und Maniatis, T. (2001). NF-κB signaling pathways in mammalian and insect immunity. Gen. Dev. **15**, 2321-2342.

Simpson, 1982

- Sokolova, M.I.A.** (1994). A redescription of the morphology of mosquito (Diptera: Culicidae) ovarioles during vitellogenesis. *Bull. Soc. Vector Ecol.* **19**, 53-68.
- Sommer, R.J. und Tautz, D.** (1993). Involvement of an orthologue of the *Drosophila* pair-rule gene *hairy* in segment formation of the short germ-band embryo of *Tribolium* (Coleoptera). *Nature* **361**, 448-450.
- Sommer, R. und Tautz, D.** (1994). Expression patterns of *twist* and *snail* in *Tribolium* (Coleoptera) suggest a homologous formation of mesoderm in long and short germ insects. *Dev. Genet.* **15**, 32-37.
- St. Johnston, D. und Nüsslein-Volhard, C.** (1992). The origin of pattern and polarity in the *Drosophila* embryo. *Cell* **68**, 201-219.
- Stathopoulos, A. und Levine, M.** (2002a). Dorsal gradient networks in the *Drosophila* embryo. *Dev. Biol.* **246**, 57-67.
- Stathopoulos, A. und Levine, M.** (2002b). Linear signaling in the Toll-Dorsal pathway of *Drosophila*: activated Pelle kinase specifies all threshold outputs of gene expression while the bHLH protein Twist specifies a subset. *Development* **129**, 3411-3419.
- Stathopoulos, A., Van Drenth, M., Erives, A., Markstein, M. und Levine, M.** (2002). Whole-genome analysis of dorsal-ventral patterning in the *Drosophila* embryo. *Cell* **111**, 687-701.
- Stauber, M., Jäckle, H. und Schmidt-Ott, U.** (1999). The anterior determinant *bicoid* of *Drosophila* is a derived Hox class 3 gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 3786-3789.
- Stauber, M., Prell, A. und Schmidt-Ott, U.** (2002). A single *Hox3* gene with composite *bicoid* and *zerknüllt* expression characteristics in non-Cyclorrhaphan flies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 274-279.
- Stein, D., Goltz, J.S., Jurcsak, J. und Stevens, L.** (1998). The Dorsal-related immunity factor (Dif) can define the dorsal-ventral axis of polarity in the *Drosophila* embryo. *Development* **125**, 2159-2169.
- Steward, R.** (1989). Relocalization of the Dorsal protein from the cytoplasm to the nucleus correlates with its function. *Cell* **59**, 1179-1188.
- Stockhammer, O.** (2003). Das Gen *short gastrulation* des Kurzkeimkäfers *Tribolium castaneum*. Diplomarbeit, Universität zu Köln.
- Tautz, D., Friedrich, M. und Schröder, R.** (1994). Insect embryogenesis - what is ancestral and what is derived? *Development* 1994 Supplement, 193-199.
- Tautz, D.** (2000). Evolution of transcriptional regulation. *Curr. Opin. Gen. Dev.* **10**, 575-579.
- Tautz, D.** (2004). Segmentation. *Developmental Cell* **7**, 301-312.
- 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.

- Thomas, J.B., Crews, S.T. und Goodman, C.S.** (1988). Molecular genetics of the *single-minded* locus: a gene involved in the development of the *Drosophila* nervous system. *Cell* **52**, 133-141.
- Tomoyasu, Y. und Denell, R.E.** (2004). Larval RNAi in *Tribolium* (Coleoptera) for analyzing adult development. *Dev. Genes Evol.* Epublication
- Towb, P., Galindo, R.L. und Wasserman, S. A.** (1998). Recruitment of Tube and Pelle to signaling sites at the surface of the *Drosophila* embryo. *Development* **125**, 2443-2450
- Towb, P., Bergmann, A. und Wasserman, S.A.** (2001). The protein kinase Pelle mediates feedback regulation in the *Drosophila* Toll signaling pathway. *Development* **128**, 4729-4736.
- Ullmann, S.L.** (1973). Oogenesis in *Tenebrio molitor*: Histological and autoradiographical observations on pupal and adult ovaries. *J. Embryol. Exp. Morph.* **30**, 179-217.
- van Eeden, F. und St Johnston, D.** (1999). The polarisation of the anterior-posterior and dorsal-ventral axes during *Drosophila* oogenesis. *Curr. Opin. Gen. Dev.* **9**, 396-404.
- Wharton, K.A., Ray, R.P. und Gelbart, W.M.** (1993). An activity gradient of *decapentaplegic* is necessary for the specification of dorsal pattern elements in the *Drosophila* embryo. *Development* **117**, 807-822.
- Whiting, M.F., Carpenter, J.C., Wheeler, Q.D. und Wheeler, W.C.** (1997). The Strepsiptera problem: phylogeny of the holometabolous insect orders inferred from 18S and 28S ribosomal DNA sequences and morphology. *Syst. Biol.* **46**, 1-68.
- Williams, M.J., Rodriguez, A., Kimbrell, D.A. und Eldon, E.D.** (1998). The *18wheeler* mutation reveals complex antibacterial gene regulation in *Drosophila* host defense. *EMBO J.* **16**, 6120-6130.
- Wimmer, E.A., Carelton, A., Harjes, P., Turner, T. und Desplan, C.** (2000). Bicoid-independent formation of thoracic segments in *Drosophila*. *Science* **297**, 2476-2479.
- 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., Schulz, C., Tautz, D. und Klingler, M.** (1998). Regulation of the *Tribolium* homologues of *caudal* and *hunchback* in *Drosophila*: evidence for maternal gradient systems in a short germ embryo. *Development* **125**, 3645-3654.
- Wu, L.P. und Anderson, K.V.** (1998). Regulated nuclear import of Rel proteins in the *Drosophila* immune response. *Nature* **392**, 93-97.
- Xiao, H., Hrdlicka, L.A. und Nambu, J.R.** (1996). Alternate functions of the *single-minded* and *rhomboid* genes in development of the *Drosophila* ventral neuroectoderm. *Mech. Dev.* **58**, 65-74.

Yang, R.B., Mark, M.R., Gray, A., Huang, A., Xie, M.H., Zhang, M., Goddard, A., Wood, W.I., Gurney, A.I. und Godowski, P.J. (1998) Toll-like receptor-2 mediates lipopolysaccharide-induced cellular signalling. *Nature* **395**, 284-288.

Zdobnov, E.M., von Mering, C., Letunic, I., Torrents, D., Suyama, M., Copley, R.R., Christophides, G.K., Thomasova, D., Holt, R.A., Subramanian, G.M., Müller, H.-M., Dimopoulos, G., Law, J.H., Wells, M.A., Birney, E., Charlab, R., Halpern, A.I., Kokoza, E., Kraft, C.L., Lai, Z., Lewis, S., Louis, C., Barillas-Mury, C., Nusskern, D., Rubin, G.M., Salzberg, S.L., Sutton, G.G., Topalis, P., Wides, R., Wincker, P., Yandell, M., Collins, F.H., Ribeiro, J., Gelbart, W.M. Kafatos, F.C. und Bork, P. (2002). Comparative genome and proteome analysis of *Anopheles gambiae* and *Drosophila melanogaster*. *Science* **298**, 149-159 und supporting online material.

Erklärung

Ich versichere hiermit, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbstständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit – einschließlich Tabelle, 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 02.12.2004

Patrick Kalscheuer

Lebenslauf

Patrick Kalscheuer	Staatsangehörigkeit: Deutsch Geboren am 19.12.1973 in Köln Eltern: Karl-Josef Kalscheuer und Lieselotte Kalscheuer, geb. Herrmann
1980-1984	Besuch der Städtischen Grundschule in Erftstadt- Gymnich
1984-1993	Besuch des Städtischen Gymnasiums in Erftstadt- Lechenich
Juni 1993	Abitur am Städt. Gymnasium in Erftstadt-Lechenich
1993-1994	Grundwehrdienst bei 11. Kompanie/ AusbReg 3 in Roth und JaboG 31 "B" in Kerpen
1994-2000	Studium der Biologie an der Universität zu Köln
März 2000	Erlangung des Diploms Prüfungsfächer: Entwicklungsbiologie, Genetik, Biochemie Diplomarbeit bei Herrn Dr. Uwe Hinz am Institut für Entwicklungsbiologie der Universität zu Köln Titel: Molekulare Analyse des <i>Drosophila</i> Gens <i>bHLH54F</i>
Seit 2001	Doktorarbeit bei Herrn Prof. Dr. Siegfried Roth am Institut für Entwicklungsbiologie der Universität zu Köln