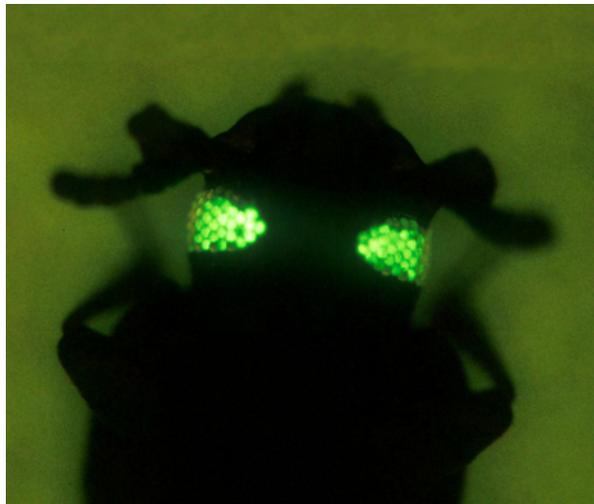


**KEIMBAHNTRANSFORMATION MIT UNIVERSELLEM MARKER
UND NEUE HOMÖOTISCHE GENE IN
*TRIBOLIUM CASTANEUM***



Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften

an der Fakultät Biologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von
Andreas J. Berghammer
aus München

2003

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Martin Klingler
2. Berichterstatter: Prof. Dr. Harry MacWilliams

Tag der mündlichen Prüfung: 30. April 2004

Danksagung

Ich danke Martin Klingler für seine Unterstützung und die Möglichkeit diese Arbeit in seinem Labor anfertigen zu können. Der gewährte Freiraum ermöglichte es, eigenständig wissenschaftliche Fragen zu bearbeiten und Projekte oder Kooperationen zu entwickeln. Vor allem seine Rücksichtnahme und sein Verständnis dafür, daß andere Dinge manchmal wichtiger sein müssen als die Arbeit, waren eine große Erleichterung in dieser Zeit.

Besonderer Dank gilt auch Diethard Tautz, der vor allem anfangs das Projekt tatkräftig befördert hat, ohne dessen Erfahrung viele Vorteile für uns wieder verloren gegangen wären und der bis heute jederzeit ansprechbar war.

Ernst Wimmer danke ich für die hervorragende Zusammenarbeit zum richtigen Zeitpunkt.

Großer Dank gebührt meinen ehemaligen und gegenwärtigen Kollegen für die gemeinsame Zeit am Zoologischen Institut und besonders ...

Christian Wolff, für die hervorragende Einführung in die Entwicklungsbiologie von *Drosophila* und *Tribolium* und die stete Diskussions- und Hilfsbereitschaft bei allen Problemen;

Reinhard Schröder, für seine Hilfe und Unterstützung mit z.B. dem Senden eines Bildes im letzten Augenblick (wt Kutikula in Kap. 3);

Claudia Englbrecht für die Hilfe bei der Spalt-Analyse;

Gabi Büttner, für die exzellenten Färbungen, sowie zusammen mit Sigrid Richter, Traudl Feldmaier-Fuchs, Barbara Wigand und Bianka Hartung für die wertvolle Mitarbeit im Labor, bei Präparaten und bei der Käferhaltung;

David Delorenzo für die Hilfe bei Computern und Software;

den studentischen Hilfskräften und Praktikanten Friederike Siegel, Iris Graf, Claudia Wehner und Brigitte Pichler für die Erledigung vieler zum Teil langweiliger, aber nun mal notwendiger Arbeiten;

Johannes Scholten, Gregor Bucher und Christoph Eckert für die Durchsicht und Korrekturen an der vorliegenden Arbeit;

Gregor Bucher, Christoph Eckert, Johannes Scholten, Markus Weber, Hilde Wohlfrom, Xiaohui Zeng und Alexander Cerny für das hervorragende und zuweilen sehr ungewöhnliche Arbeitsklima in der AG Klingler, die interessanten Gespräche in und außerhalb der Wissenschaft und die Einblicke in die darstellende Kunst Oberbayerns und die unbekannte Musikwelt Afrikas oder Finnlands. Dazu die Möglichkeit auch mal Dampf ablassen zu können, um den täglichen Wahnsinn zu bewältigen. Nur Schade, daß keine Tondokumente darüber erhalten sind!

Aus der vorliegenden Arbeit wurde veröffentlicht oder ist in Vorbereitung:

- 1) **Berghammer, A., Bucher, G., Maderspacher, F. and Klingler, M.** (1999a). A system to efficiently maintain embryonic lethal mutations in the flour beetle *Tribolium castaneum*. *Dev Genes Evol* **209**, 382-9.
- 2) **Berghammer, A. J., Klingler, M. and Wimmer, E. A.** (1999b). A universal marker for transgenic insects. *Nature* **402**, 370-1.
- 3) **Lorenzen, M. D.*, Berghammer, A. J.*, Brown, S. J., Denell, R. E., Klingler, M. and Beeman, R. W.** (2003). piggyBac-mediated germline transformation in the beetle *Tribolium castaneum*. *Insect Mol Biol* **12**, 433-40.
* gleichberechtigte Erstautoren
- 4) **Pavlopoulos, A.*, Berghammer, A. J.*, Averof, M. and Klingler, M.** Efficient transformation of the beetle *Tribolium castaneum* using the *Minos* transposable element: quantitative and qualitative analysis of genomic integration events. *Genetics*, in press
* gleichberechtigte Erstautoren
- 5) Die Funktion des region-spezifischen homöotischen Gens *spalt* in *T. castaneum*
- 6) *wurm* und *überlänge*: Neue homöotische Mutanten außerhalb des HOM-Komplexes
- 7) Dorso-ventral-Mutanten in *T. castaneum* (in Zusammenarbeit mit S. Roth, Köln)

weitere Publikationen:

unveröffentlichte Daten zitiert in

Eberhard, William G., „Female control: Sexual selection by cryptic female choice”

Princeton University Press (1996), Princeton, New Jersey

Der Universelle Marker wurde in den USA zum Patent angemeldet. Ein erstes Teilpatent wurde am 11. Februar 2003 unter der Nummer 6,518,481 erteilt (United States Patent „Universal markers of transgenesis“).

Inhaltsverzeichnis

Allgemeine Einleitung	8
Tribolium als neues Insekten-Modellsystem	8
Transposons als universelle transgene Werkzeuge.....	15
Terminale homöotische Gene in Tribolium.....	19
1. Entwicklung eines Transformationssystems	21
1.0. Aufbau der Vektoren und Expression des Markergens 3xP3-EGFP	23
1.1. Transformation von <i>T. castaneum</i> mit Hermes	24
1.1.1. Einleitung	24
1.1.2. Transformationseffizienz.....	25
1.1.3. Stabilität der Integrationen.....	26
1.2. Transformation von <i>T. castaneum</i> mit piggyBac	26
1.2.1. Einleitung	26
1.2.2. Transformationseffizienz.....	27
1.2.3. Stabilität und Charakterisierung der Integrationen	32
1.2.4. Remobilisierung	34
1.3. Transformation von <i>T. castaneum</i> mit Minos	37
1.3.1. Einleitung	37
1.3.2. Transformationseffizienz.....	40
1.3.3. Stabilität und Molekulare Analyse der Transformationsereignisse im Genom	42
1.4. Die Verwendung des 3xP3-EGFP Markers in wt Hintergrund	48
1.5. Somatische- und Keimbahntransformation im Zebrafisch <i>Danio rerio</i>	50
1.6. Diskussion	51
2. Anwendung des Transformationssystems zur Analyse maternaler Musterbildung..	57
2.1. Anteriorer BCD-Protein Gradient.....	59
2.2. anteriore (<i>bcd</i>) und posteriore (<i>osk</i>) mRNA-Lokalisierungssignale	60
2.3. Promotoranalyse <i>Tc'hb</i>	62
2.4. Diskussion	65
3. Terminale homöotische Mutanten und molekulare Analyse des <i>Tc'spalt</i> Gens	67
3.1. Analyse der homöotischen Phänotypen <i>wurm</i> ^{10b17} und <i>überlänge</i> ^{10d21}	67
3.1.1. Karte der Wildtyp-Kutikula	67
3.1.2. Beschreibung der Mutanten <i>überlänge</i> ^{10d21} und <i>wurm</i> ^{10b17}	74
3.1.3. Genetische Kartierung zum Homöotischen Komplex (HOM-C).....	84
3.2. Das <i>Tribolium spalt</i> Homolog <i>Tc'sal</i>	88
3.2.1. Einleitung	88
3.2.2. Klonierung des <i>Tribolium spalt</i> Genes <i>Tc'sal</i>	92
3.2.3. Expression von <i>Tc'sal</i>	97

3.2.4. pRNAi von Tc'spalt	101
3.3. Diskussion	103
Zusammenfassung	118
Anhang	120
Zu Kapitel 1	120
A.1. Datentabelle zur Transformationseffizienz mit piggyBac.....	120
A.2. Mobilitätsassays mit Minos (weitere Literaturangaben).....	121
A.3. Datentabelle zur Segregation von Minos-Insertionen.....	121
A.4. Zusammenfassende Tabelle der Segregations- und Southern-Blot-Analyse.....	123
A.5. mariner (MOS1) Ergänzung Transformationsplasmid	124
Zu Kapitel 2	125
A.6. Blast-Ergebnislisten für Tc'sal	125
Zu weiteren Projekten	129
A.7.1. SpermienSpeicherung in Tribolium	129
A.7.2. Spermienverdrängung in befruchteten Weibchen	130
A.8. Analyse von dorso-ventralen Mutanten	132
Abkürzungsverzeichnis	134
Material & Methoden	135
Tribolienstämme und Marker.....	135
Molekularbiologische Methoden.....	135
Antikörper	135
Plasmide.....	136
Genetische und Embryologische Methoden.....	139
Geräte	147
Literatur	148
Lebenslauf	156

Allgemeine Einleitung

Tribolium als neues Insekten-Modellsystem

Drosophila melanogaster ist der überragende Referenzorganismus in der Genetik und der Entwicklungsbiologie. Und dies nicht erst seit dem bahnbrechenden Mutagenesecree von Christiane Nüsslein-Volhard und Eric Wieschaus, deren Arbeiten mit denen von Edward Lewis 1995 mit dem Nobelpreis belohnt wurden. Bereits Anfang des vergangenen Jahrhunderts, nachdem gerade die Mendel'schen Vererbungsregeln „wiederentdeckt“ worden waren, machte sich Thomas Hunt Morgan auf die Suche nach den physikalischen Grundlagen der Erbfaktoren. Da damals die Universitäten kein Geld für Forschungsprojekte gaben, benötigte er einen zur Genetik geeigneten und möglichst billig zu haltenden Organismus für seine Studien, und wählte *Drosophila melanogaster*. Die Fliegenkulturen wurden in den Jahren um 1910 auf Bananen gezogen, bevor ein auf Agar basiertes Labormedium entwickelt wurde. Morgan und seine Studierenden suchten nach sichtbaren Mutationen (z.B. *white*), die sie über verschiedene Generationen verfolgen und mit zytogenetischen Befunden korrelieren konnten. Dadurch konnten sie nachweisen, daß diskrete Abschnitte auf den Chromosomen die Erbinformationen beinhalten.

Donald Poulson ist es wohl zuzuschreiben, daß die Taufliege auch als Modell für entwicklungsbiologische Studien etabliert wurde. Er untersuchte in den 30er und 40er Jahren den Einfluß von chromosomalen Defizienzen auf die Embryonalentwicklung und war einer der ersten, der konstatierte, daß die Gene für die Kontrolle entwicklungsbiologischer Prozesse verantwortlich sind (Poulson, 1943; Poulson, 1945). Damit begründete er den genetischen Ansatz in der Embryologie, der in den folgenden Jahrzehnten vor allem durch Arbeiten an Imaginalscheiben weiterentwickelt wurde und schließlich zu dem oben erwähnten Mutagenesecree führte. Die Idee dabei war, in einem groß angelegten, systematischen Ansatz im Genom von *Drosophila* nach allen Genen zu suchen, die an der Embryonalentwicklung beteiligt sind. Dazu wurden die Fliegen mit der mutagenen Chemikalie EMS behandelt. Bei den Nachkommen wurde, mit Hilfe eines entsprechenden Kreuzungsschemas, nach mißgebildeten Embryonen gesucht. Die gefundenen Mutanten ließen sich entsprechend ihres Phänotyps in verschiedene Klassen einteilen: Gene, die die dorso-ventrale Polarität betreffen, Segmentierungsgene (Gapgene, Paarregelgene, Segmentpolaritätsgene) und solche, die die Identität der gebildeten Segmente bestimmen (homöotische Gene, die bereits auch anhand adulter Phänotypen bekannt waren). In einem späteren Screen wurden dann auch maternalen Faktoren identifiziert, also Gene, die in der Mutter aktiv sein müssen, damit später im Embryo die Musterbildung richtig gestartet werden kann.

Je mehr aber das Wissen über die Entwicklung von *Drosophila*-Embryonen zunahm, desto mehr stellte sich die Frage nach der Allgemeingültigkeit der so entdeckten Mechanismen. Der Vorteil der kurzen Generationszeit für Experimente an *Drosophila* ist in dieser Beziehung ein gewichtiger Nachteil: Diese ökologisch sinnvolle Anpassung wird, unter Anderem, auch durch eine sehr abgeleitete, und damit recht untypische Embryonalentwicklung erreicht. Die Embryonalentwicklung verschiedener Insektenordnungen wurde zuerst von Krause vergleichend untersucht (Krause, 1939). Er führte die Unterteilung nach Kurz- und Langkeimer ein. Damit werden in heutiger Auslegung Entwicklungstypen danach unterschieden, ob alle Segmente bereits im Blastoderm mehr oder weniger gleichzeitig angelegt werden (Langkeim), oder ob in diesem Stadium nur der Kopfbereich mit den vorderen Segmenten festgelegt wird, während die übrigen Segmente dann in einem sekundären Wachstumsprozeß entstehen (Kurzkeim). Von manchen Autoren (z.B. N. Patel) wird zusätzlich eine dritte Kategorie verwendet. Neben dem Kurzkeim (frühe Musterbildung umfasst hier nur Vorderkopf und gnathale Segmente bis zum Anfang des Thorax) und dem Langkeim gibt es einen Intermediären Keim, bei dem auch Thorax bzw. vorderes Abdomen schon im Blastoderm angelegt werden. Abbildung E.1 stellt die Unterschiede zwischen Kurz- und Langkeimen am Beispiel der Expression des Paarregelgens *paired/pairberry* dar. Dies ist das bisher einzige Gen, das eine vergleichbare Paarregelexpression in allen drei gezeigten Arten aufweist. Bei *Drosophila* sind alle 8 primären, doppelsegmentalen *paired* Streifen bereits im Blastoderm zu sehen (Abb. E.1, rechts oben). Diese teilen sich im weiteren Verlauf der Entwicklung in segmentale Streifen auf (rechts unten). Im Gegensatz dazu findet man bei *Tribolium* im Blastoderm (Abb. E.1, Mitte oben) und entsprechend im Keimrudiment (Mitte) nur die ersten zwei primären Streifen, die dem Bereich des mandibulären, maxillären und labialen Segmentes entsprechen. Im Verlauf des Wachstumsprozesses werden posterior weitere Primärstreifen gebildet (Mitte unten), während sich die vorderen Streifen schon in das segmentale Sekundärmuster aufspalten. In der linken Spalte sind einige Stadien der Heuschrecke *Schistocerca* als Beispiel für einen "extremen Kurzkeimer" (Tautz et al., 1994) aufgeführt. Im Blastoderm ist bei dieser Spezies noch keine Färbung zu sehen. Erst nachdem die Keimanlage entstanden ist, findet sich terminal eine erste *paired*-Domäne, die aber offenbar keine Segmentierungsfunktion hat (Abb. E.1 links oben). Erst nach Beginn des Längenwachstums bildet sich der erste Streifen (links Mitte), der den Segmenten Maxille, Mandibel und Labium entspricht. Danach entwickelt sich *Schistocerca* ähnlich wie *Tribolium* (links unten) bis am Ende alle 18 sekundären Streifen gebildet worden sind (Davis et al., 2001; Davis and Patel, 2002).

Damit unterscheiden sich diese drei Segmentierungstypen funktionell deutlich voneinander: bei *Schistocerca* entstehen alle Streifen in einer zellularisierten Umgebung, bei *Drosophila* alle in einem Synzytium, während bei *Tribolium* offenbar einige Streifen im synzytialen

Blastoderm, die meisten aber im zellularisierten Keimstreif entstehen. Aufgrund dieser unterschiedlichen zellulären Bedingungen, wegen der unterschiedlichen Position der Streifen im Ei, und wegen der unterschiedlichen zeitlichen Abfolge scheint sehr wahrscheinlich, daß auch die diesen Streifen zugrunde liegenden Musterbildungsmechanismen sich wesentlich unterscheiden.

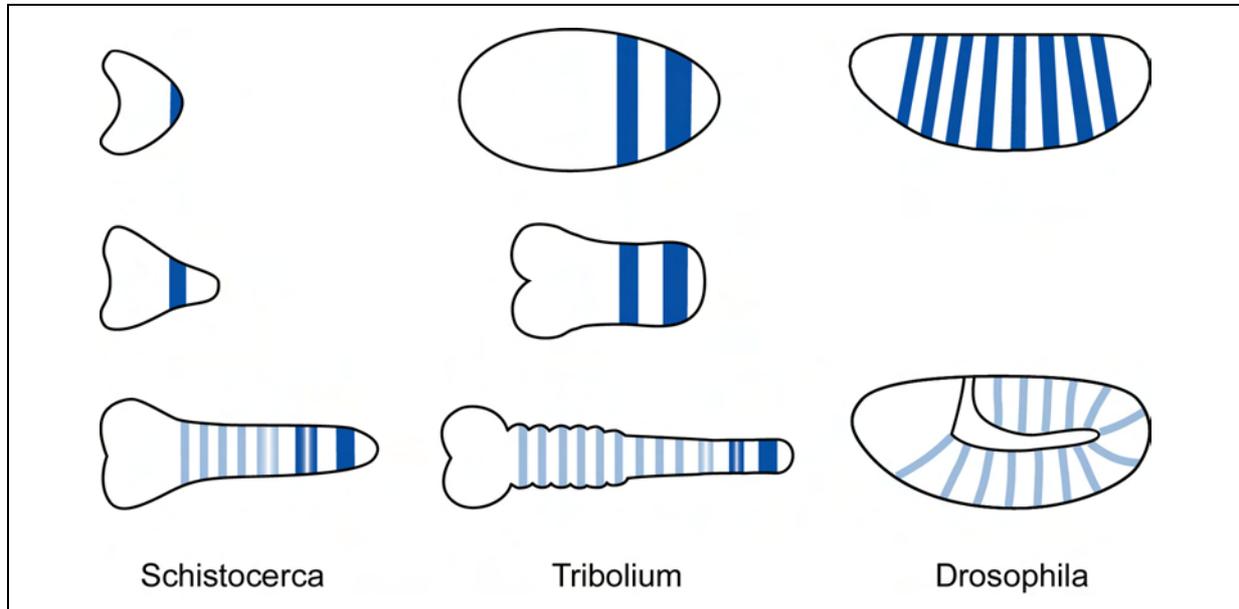


Abb. E.1 Die Segmentierungstypen der Insekten, gezeigt am Beispiel der Expression des *paired/pairberry*-Gens.

Extremer Kurzkeim (*Schistocerca*), "normaler" Kurzkeim (*Tribolium*), und typischer Langkeim (*Drosophila*). Dargestellt sind primäre doppelsegmentale *paired* Streifen (dunkle breite Streifen), sowie die spätere segmentale Expression (helle, schmale Streifen). Nähere, Nebeneinander abgebildete Embryonen der drei Spezies repräsentieren nicht exakt miteinander vergleichbare Stadien der Embryonalentwicklung, sondern stellen die wichtigsten Unterschiede heraus.

Die phylogenetische Verteilung der verschiedenen Typen ist in Abb. E.2 dargestellt. Man erkennt daraus, daß die Embryonalentwicklung von *Drosophila* stark abgeleitet und damit nicht repräsentativ für die Mehrzahl der Insektenordnungen ist. Neben den Dipteren kommt der Langkeim-Typ hauptsächlich bei Siphonapteren und Lepidopteren vor. Bei den Hymenopteren und Coleopteren sind noch alle 3 verschiedenen Typen zu finden. In den basaleren Gruppen außerhalb der Holometabolen gibt es dagegen nur Kurz- bzw. Intermediärkeimer, aber keine Langkeimer. Daher ist es von großem Interesse, einen Kurzkeimer, der evolutionär dem ursprünglichen Typ entspricht, daraufhin zu untersuchen, inwieweit die aus *Drosophila* bekannten Gene und Regulationsabläufe allgemeingültig sind.

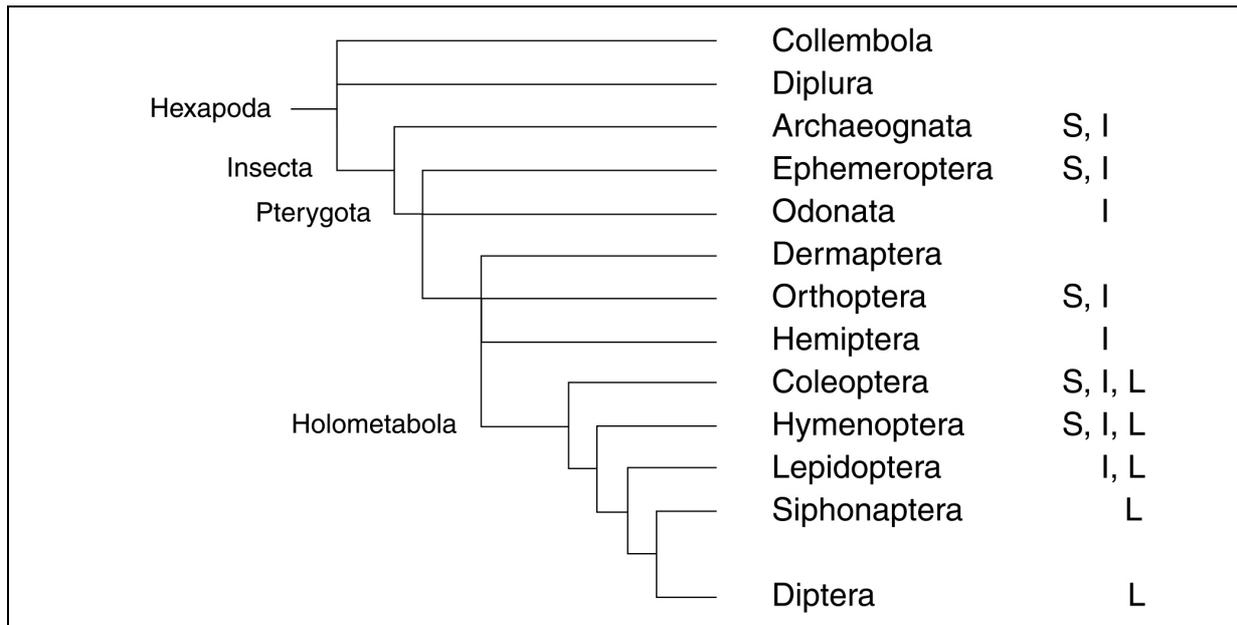


Abb. E.2 Phylogeniebaum mit Lang-, Intermediär- und Kurzkeimverteilung.

S= Kurzkeim, I= Intermediärer Keim, L= Langkeim (zusammengestellt nach (Patel et al., 1994) und (Tautz et al., 1994))

Mein Kurzkeim-Modellorganismus, *Tribolium castaneum*, stammt aus der Familie der Schwarzkäfer (Tenebrionidae). Neben *T. confusum* ist er einer der wichtigsten Vorratsschädlinge. Seit vor über 5000 Jahren die Menschen begannen, in größeren Siedlungen und Städten zu wohnen und dazu Vorräte anlegen mußten, sind Käfer als Vorratsschädlinge ein wirtschaftliches Problem. Sie treten dabei in hohen Populationsdichten auf, *T. castaneum* z.B. mit bis zu 450.000 Individuen in 100 l Reisfuttermehl. In Mesopotamien gab es eigene Keilschriftworte für Mehl-, Getreide- und Dattelfresser. *Tribolium castaneum* wurde auch in altägyptischen Grabbeigaben gefunden (Buckland, 1981; Klausnitzer, 2002). Wie andere Schädlinge sind viele Arten der Gattung *Tribolium* heute Kosmopoliten, die sich als Kulturfolger mit dem Menschen auf der Welt verbreitet haben. Das Hauptverbreitungsgebiet sind dabei die Tropen und Subtropen.

Auch als Forschungsobjekt hat *Tribolium* eine lange Tradition. Seit den 20er und 30er Jahren des vergangenen Jahrhunderts wurden Studien in Populationsökologie (Chapman, 1928), allgemeiner Biologie (Park, 1934) und Taxonomie/Morphologie (El Kifl, 1953; Good, 1936) durchgeführt. Nach dem Vorbild des *Drosophila Information Service* (DIS) wurde das *Tribolium Information Bulletin* (TIB) auf dem International Genetics Congress 1958 von Genetikern und Ökologen, die mit *Tribolium* arbeiteten, ins Leben gerufen und erschien 1959 zum ersten Mal. Der als Professor in San Bernardino, Kalifornien arbeitende Alexander Sokoloff war und ist bis heute der Editor dieses informellen Informationsdienstes. Er unternahm es auch 1972, eine erste Monographie über *Tribolium* zu erstellen. Diese faßt in 3

Bänden das biologische Wissen verschiedener Teilbereiche über diese Gattung zusammen, enthält aber auch praktische Anleitungen zur Kultivierung der Käfer im Labor.

Nachfolgende Aufstellung, zeigt welche Eigenschaften *Tribolium* als Labor-Modellsystem prädestinieren:

- Einfache Haltung auf Mehl mit 5% Bierhefe
- Tolerant für großen Temperatur- und Feuchtigkeitsbereich
- Einfache Trennung der Generationen und Stadien durch verschieden große Siebe
- Geschlechter können in Puppen und Adulten leicht unterschieden werden
- Relativ kurze Generationszeit, durch Temperatur regulierbar
- Langlebig (6 Monate – 1 Jahr)
- Sehr fertil, Weibchen können ca. 10 Eier pro Tag legen
- Kleines Genom von 0,21 pg (2×10^8 bp) (*D. melanogaster* 0,17 pg)
- Vorhandene Genomkarte mit morphologisch sichtbaren und molekularen Markern
- Verfügbarkeit genomischer, BAC und cDNA Bibliotheken
- Große Sammlung von morphologisch sichtbaren Mutanten
- Umfangreiches Wissen über Morphologie, Anatomie, Embryologie, Ökologie, Parasitologie, Physiologie, Geographische Verteilung, Insektizidresistenz und Verhalten

Molekulargenetisch wurde der Reismehlkäfer bisher hauptsächlich für die Erforschung der Evolution der Homöoboxgene genutzt (siehe Review (Beeman et al., 1993)). Da Hox-Mutanten oft dominante Phänotypen haben, konnten viele spontane Mutationen isoliert werden, weitere wurden durch radioaktive Bestrahlung und chemische Mutagenesen erzeugt. Der *Tribolium* Hox Komplex (HOX-C) ist nicht wie bei *Drosophila* zweigeteilt, sondern zusammenhängend wie bei Vertebraten. Im Gegensatz zur Fliegenmade hat die Käferlarve einen gut ausgebildeten Kopf mit insektypischen Kopfextremitäten, sowie Beine an allen 3 Thorakalsegmenten. Daher sind bei Mutationen in *labial* und *proboscipedia* Phänotypen erkennbar, während in *Drosophila* diese Gene offenbar keine embryonale Funktion haben. Entsprechende Mutanten haben nur als Adulte einen sichtbaren Phänotyp.

Molekulare Vergleiche von Entwicklungsgenen in verschiedenen Spezies wurden mit der Verbreitung der PCR-Technologie möglich. Mit anhand von bekannten Sequenzen erstellten redundanten Primern wurde es möglich, in weiteren Spezies nach Homologen und Orthologen zu suchen. Die ersten klonierten *Tribolium* Gene waren *hairy* und *Krüppel* (Sommer and Tautz, 1993), *fushi-tarazu* (Brown et al., 1994a), *Abdominal* (Brown et al., 1994b), *engrailed* (Brown et al., 1994c), und *wingless* (Nagy and Carroll, 1994), sowie *twist* und *snail* (Sommer and Tautz, 1994). Zur Zeit gibt es Einträge von 44 Genen in der Genbank, etwa 10-20 weitere dürften in verschiedenen Labors bekannt sein.

Der Reismehlkäfer ist, nach *Drosophila*, das beste Insektensystem für funktionelle Genomanalyse. Für einige Fragestellungen in der Entwicklungsbiologie ist es sogar besser geeignet als die Taufliege. Dadurch, daß die Larve, wie eben erwähnt, insektentypisch ausgebildet ist, mit Antenne, Augen, Mundwerkzeugen und 3 Paaren gegliederter Beine, können auch Projekte zur anterioren Musterbildung und zur Beinentwicklung bearbeitet werden. Neben den homöotischen Mutanten waren auch einige Beinmutanten im Verlauf anderer Untersuchungen aufgrund dominanter adulter Phänotypen identifiziert worden. Diese Mutanten stellten sich später als *distalless*-Allele heraus (Beermann et al., 2001). Ein erster Screen, bei dem speziell nach embryonalen Phänotypen gesucht wurde, wurde im Labor von K. Anderson durchgeführt (Sulston and Anderson, 1996). Wegen der mit maternalen Screens verbundenen technischen Probleme waren dabei aber nur 4 Mutanten mit embryonalem Phänotyp identifiziert worden. Daraufhin wurde in München von Martin Klingler ein EMS-Mutagenesecscreen nach dem Muster des *Drosophila*-Screens für embryonal letale Mutationen durchgeführt, an dem auch ich beteiligt war. Dabei wurden männliche Käfer mit EMS behandelt und mit unbehandelten Weibchen verpaart. Aus den Nachkommen (potentiell heterozygot für neuinduzierte Mutationen) wurden einzelne Männchen wieder mit Wildtyp-Jungfrauen verpaart und später mit je 20 ihrer eigenen Töchter rückgekreuzt. Ein Achtel der Eier in daraus resultierenden Eiablagen sind dann homozygot für eine so induzierte Mutation. Von diesen Eiablagen wurden Kutikulapräparate hergestellt und mikroskopisch von zwei verschiedenen Personen durchgesehen. Insgesamt wurden etwa 4000 Linien durchgesehen. Daraus gingen etwa 35 interessante Mutanten hervor, wovon momentan noch 29 im Labor gehalten werden. Darunter sind 9 Segmentierungsmutanten, 6 die Dorsoventralachse betreffende, 4 homöotische und 10 Mutanten mit Defekten an den Extremitäten. Jeweils ein Beispiel für diese Phänotypklassen ist in Abb. E.3) gezeigt.

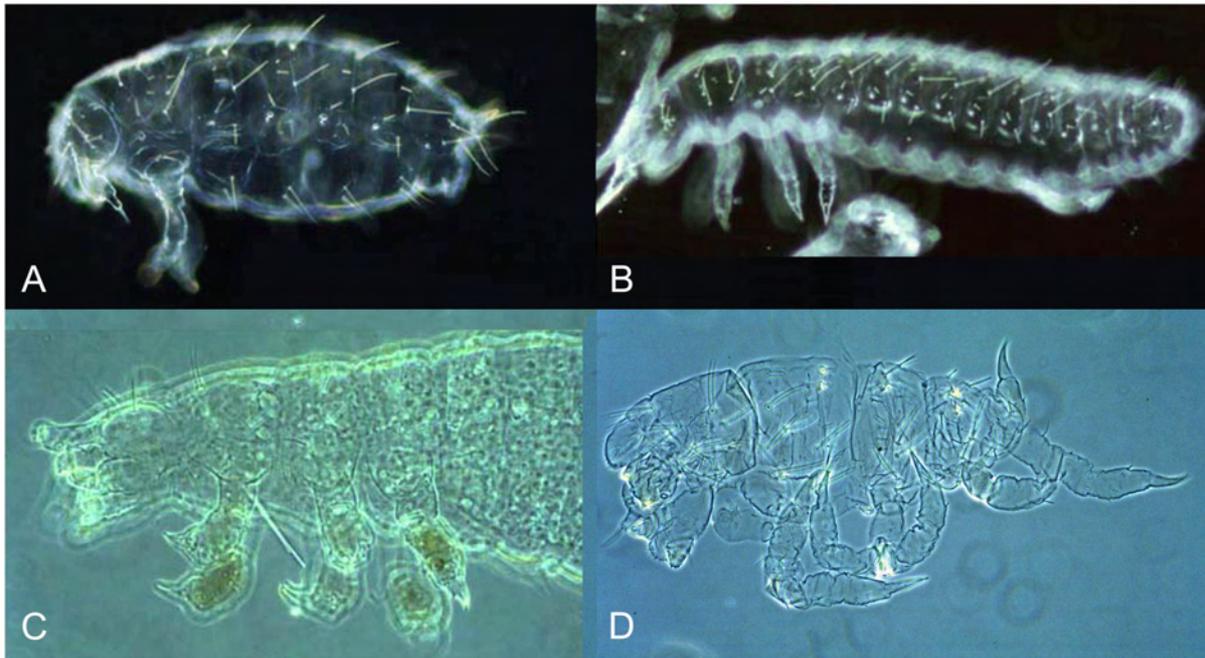


Abb. E.3 Kutikulaaufnahmen von EMS-Mutanten.

A) Paarregel-Mutante (T1, T3 und geradzahlige abdominale Segmente fehlen), B) Homöotische Mutante (Telson zu 3 zusätzlichen abdominalen Segmenten transformiert), C) Beinmutante (alle Beinlieder miteinander verschmolzen), D) Dorso-ventral-Mutante (ventrale Epidermis fehlt, weshalb die Extremitäten beider Körperhälften proximal miteinander fusionieren).

Tribolium castaneum ist also ein billiger, einfach zu handhabender Labororganismus mit relativ kurzer Generationszeit und großem Potential für die genetische Analyse. Es gibt viele verschiedene Stämme und mutante Linien, umfassende molekulargenetische Kenntnisse und vielfältige, etablierte Labortechniken. Für vergleichende evolutionäre Untersuchungen ist er hinreichend divers zu *Drosophila*. Er ist embryologisch wesentlich repräsentativer für Insekten als die Taufliege und stammt als Käfer aus der größten Tiergruppe überhaupt. Ca. 380000 rezente Arten sind beschrieben und Hochrechnungen gehen bis in die Größenordnung von mehreren Millionen Arten auf der Erde. Käfer sind seit etwa 250-300 Mio. Jahren als Fossilien nachweisbar und haben seit dieser Zeit eine kaum vorstellbare morphologische Diversität entwickelt. Neben den Schmetterlingen stellen Käfer die wichtigste Schädlingsgruppe und haben damit auch große agrarökonomische Bedeutung. *Tribolium* zu einem noch besseren Modellsystem weiterzuentwickeln, ist daher eine sinnvolle wissenschaftliche Anstrengung, die eine über Fragestellungen von Evolution und Entwicklung hinausreichende Bedeutung hat. Auch aus diesem Grund hatte ich mich zu Beginn meiner Arbeit dazu entschlossen, mich primär auf ein technisches Problem zu konzentrieren, die Entwicklung transgener Methoden für *Tribolium*, während ich embryologische Fragen erst in zweiter Linie verfolgte.

Transposons als universelle transgene Werkzeuge

Für die molekulare Analyse der Entwicklungsgene von *Drosophila* war die Entdeckung der *P*-Elemente als mobile Vektoren für DNA ein wesentlicher Durchbruch. Damit war es möglich, die genetischen mit den molekularbiologischen Methoden zu kombinieren und so deren Potenzial zu vervielfachen. Diese Methode zur gezielten Erzeugung transgener Tiere erlaubt es z.B., in einer mutanten Linie das vermutlich betroffene Gen über *P*-Element-Transformation wiederherzustellen. Eine "Rettung" des Phänotyps beweist dann, daß tatsächlich eine Mutation in diesem Gen die Ursache der Fehlbildung war. Jedes Gen kann auf diese Weise umfassend, als Ganzes oder in Teilaspekten, auf seine Funktion und Regulation untersucht werden, etwa indem der Promoterbereich zerlegt wird, die UTRs verändert werden oder das ursprüngliche Protein durch eine spezifisch veränderte Variante ersetzt wird.

Mit Hilfe des binären Gal4/UAS-Systems (Phelps and Brand, 1998) und einer Vielzahl von "*enhancer trap*"-Linien kann heute die ektopische Expression eines Gens nahezu beliebig gesteuert werden. Bei diesem aus der Hefe stammenden System wird der Transkriptionsfaktor GAL4 durch einen spezifischen Promotor oder Enhancer an einer bestimmten Stelle gebildet und aktiviert dort den Effektor, ein Reporter gen oder eine kodierende Sequenz unter Kontrolle eines Gal4-abhängigen Promotors (UAS-Promotor). Durch diese Zweiteilung sind beliebige Kombinationen möglich. *Enhancer traps* nennt man zufällige Insertionen von Elementen im Genom, deren Promotoren dabei unter die Kontrolle von regulatorischen Sequenzen in ihrer Umgebung geraten sind.

Auch bei der Generierung von neuen Mutanten waren *P*-Elemente sehr erfolgreich. Durch zufällige Insertionen im Genom werden, wie bei chemischen Stoffen, Mutationen gesetzt (Insertionsmutagenese). Die betroffenen Gene müssen dann jedoch nicht langwierig mittels Positionsklonierung molekular identifiziert werden, sondern sind durch die Sequenz des Transposons markiert (*gene tagging*) und können direkt, z.B. über inverse PCR, isoliert werden.

Unter Verwendung weiterer molekulargenetischer Hilfsmittel, wie des FLP/FRT Rekombinationssystems (Theodosiou and Xu, 1998), können sogar Eingriffe in die Organisation des Genoms gemacht werden. Chromosomenabschnitte können entfernt oder invertiert werden. Damit können z.B. gezielt Balancer-Chromosomen hergestellt werden, die nicht mehr mit Wildtyp-Chromosomen rekombinieren können, wodurch die Haltung von Mutanten erheblich erleichtert wird. Auch klonale Analyse über mitotische Rekombination kann auf diese Weise sehr viel effizienter durchgeführt werden. Mittlerweile sind für

Drosophila Tausende derartiger Linien in den Stockcenters abrufbar, die molekular funktionelle Versuche zulassen und die früher oftmals nur deskriptiven Projekte ersetzen.

Seit der ersten P-Element vermittelten Transformation in *Drosophila melanogaster* (Spradling and Rubin, 1982), hat es zahlreiche Versuche gegeben, diesen Vektor auch in anderen Insektenarten zu benutzen. Doch dies gelang lediglich in wenigen, nahe verwandten Arten wie *D. simulans* (Scavarda and Hartl, 1984) oder *D. hawaiiensis* (Brennan et al., 1984). Auch mit auf Plasmiden basierenden Mobilitätstests konnte festgestellt werden, daß P-Elemente außerhalb der Drosophilidae nicht funktionieren (O'Brochta and Handler, 1988), obwohl P-ähnliche Elemente auch in anderen Fliegenarten, z.B. *Lucilia cuprina* gefunden wurden (Perkins and Howells, 1992). Bei diesen Plasmidtests wird indirekt die Mobilität in einen Organismus gemessen. Dazu injiziert man, z.B. in einen Embryo, gleichzeitig ein Plasmid mit dem Gen der Transposase (Helper), eines mit dem entsprechenden Transposon (Donor) und ein drittes als Zielplasmid. Nach Inkubation und Reisolierung der Plasmide kann man durch eine geeignete Kombination von Resistenzmarkern feststellen, ob das Transposon aus dem Donorplasmid herausgesprungen ist bzw. in das Zielplasmid integriert wurde.

P-Elemente sind Transposons der Klasse II, die sich direkt von DNA zu DNA bewegen, ohne RNA-Zwischenform. In dieser Klasse gibt es noch weitere Familien, z.B. *hobo* oder *hAT*, *mariner*, *Tc1* und TTA-spezifische Elemente, von denen viele ebenfalls bereits in den 80er Jahren gefunden wurden (Emmons et al., 1983; Fraser et al., 1985; Jacobson and Hartl, 1985; McGinnis et al., 1983; Medhora et al., 1988). Alle gehören zu den „short inverted repeat type“ Transposons. Das heißt, sie bestehen aus 8-50 bp langen invertierten Sequenzen an beiden Enden und einem Leserahmen für die Transposase dazwischen. Beim Springen bindet die Transposase an diese invertierten Enden, schneidet die DNA und fügt das Element an anderer Stelle wieder ein.

In den letzten Jahren wurde weiter intensiv nach neuen Transposons gesucht, deren Mobilität keiner wirtsspezifischer Faktoren bedarf. Dennoch dauerte es noch lange, bis auch entsprechende Methoden, wie *in vitro* Transpositionstests, Exzisionstests (von Plasmiden) und Interplasmid-Transpositionsassays entwickelt waren, um das Potential der jeweiligen Elemente zu überprüfen. Die wichtigsten wirtsunabhängigen Transposons sind die *hobo*, *Hermes*, *mariner*, *Minos* und *piggyBac* Elemente, die im Folgenden etwas ausführlicher besprochen werden.

hobo (*hAT* Familie) kann in seinem Wirt *D. melanogaster* mit einer guten Transformationsrate von 20% verwendet werden (Blackman 1989). In Veröffentlichungen von 1993-96 zeigten Transpositionsassays die Möglichkeit der Mobilisierung in einigen anderen *Drosophila*-Spezies, der Hausfliege *Musca domestica*, den Mücken *Aedes aegypti*

und *A. australis*, *Bactrocera tryoni* (Fam. Tephritidae) und dem Schmetterling *Helicoverpa armigera*. Erst 1996 gelang auch die Transformation von Nicht-Wirt Organismen wie *D. virilis* (Lozovskaya et al., 1996) und *B. tryoni* (S. Whyard unveröffentlicht, erwähnt in (O'Brochta and Atkinson, 1996)). Jedoch konnten im Fall von *Bactrocera* keine stabilen Linien gehalten werden, möglicherweise weil *hobo*-ähnliche Elemente bei Insekten weit verbreitet sind und vermutlich auch in *Bactrocera* vorkommen. Daher ist ihre Anwendbarkeit stark limitiert. Ein anderes Transposon der *hobo* Familie ist **Hermes** aus *M. domestica*. Es zeigte ebenfalls Mobilität in einer ganzen Reihe von Insektenarten. 1996 wurde damit *D. melanogaster* bei einer hohen Transformationsrate von 35% gentechnisch verändert und es scheint auch weniger empfindlich für Kreuzmobilisierung durch andere *hobo* Elemente zu sein (O'Brochta et al., 1996).

mariner bzw. **MOS** ist wie *hobo* in vielen Gruppen der Arthropoden und Nicht-Arthropoden zu finden (Lidholm et al., 1991; Robertson, 1993). Die Anwendung in *D. melanogaster* gelang mit Transformationsraten von 4-16% (Garza et al., 1991; Lidholm et al., 1993), und auch bei den Mobilitätstests in *L. cuprina* und *B. tryoni* konnte Aktivität festgestellt werden. Ein Nachteil von MOS ist allerdings, daß die Transformationsraten drastisch abfallen, wenn zusätzliche DNA einkloniert wurde.

Zur *Tc1*-Familie gehört das aus *D. hydei* stammende **Minos** (Franz et al., 1994). Damit konnte bereits 1995 sowohl *D. melanogaster* als auch *Ceratitis capitata* erfolgreich transformiert werden, wobei stabile Linien erhalten wurden (Loukeris et al., 1995a; Loukeris et al., 1995b). Lediglich die Transformationsraten von 2% und 1,3% sind noch nicht zufriedenstellend.

Eine relativ spät entdeckte Transposon-Familie ist schließlich die noch kleine Familie der TTAA-spezifischen Transposons mit den beiden Elementen **piggyBac** und *tagalong*. Deren Fähigkeit zur Mobilität wurde entdeckt, als Fraser markierte, nicht autonome Elemente zusammen mit Wildtyp *piggyBac* und Baculoviren in Zellen von *S. frugiperda* injizierte und in den später rückisolierten Viren Insertionen feststellte (Fraser et al., 1995).

Zu Beginn dieser Arbeit waren also erst sehr wenige Laborinsekten innerhalb eines sehr engen phylogenetischen Spektrums erfolgreich transformiert (O'Brochta and Atkinson, 1996):

Transformierte Spezies	Mobiles Element
<i>Drosophila melanogaster</i>	<i>P</i> -Element (aus <i>D.m.</i>) <i>hobo</i> (aus <i>D.m.</i>) <i>Hermes</i> (aus <i>Musca domestica</i>) <i>Minos</i> (aus <i>D. hydei</i>) <i>mariner</i> (aus <i>D. mauritiana</i>)
<i>D. hawaiiensis</i> und <i>D. simulans</i>	<i>P</i> -Element
<i>D. virilis</i>	<i>hobo</i> *
<i>Bactrocera tryoni</i>	<i>hobo</i> *
<i>Ceratitis capitata</i>	<i>Minos</i>

* instabil wegen vermutlicher Interaktion mit endogenen Elementen

Wenn sich die Ergebnisse aus den Plasmid-Mobilitätstests bestätigten, so ließen sich transposon-vermittelte transgene Methoden auf weitere, phylogenetisch diverse Gruppen anwenden. Einerseits würden sich dann viele interessante *Evo-Devo* Projekte durchführen lassen; andererseits könnte man gentechnologische Verfahren, wie sie an Labororganismen entwickelt wurden, auch auf landwirtschaftlich oder medizinische relevante Tiere übertragen. Neben promiskuitiven Transposons bedarf es dazu noch einer weiteren wichtigen Voraussetzung, nämlich der Konstruktion eines "universellen Markers".

Um nach einem Transformationsversuch transgene Tiere identifizieren zu können, muß die Integration eines Transposons leicht erkennbar sein, da unter Umständen unter Tausenden von Nachkommen nur einige wenige transgen sind. Bei *D. melanogaster* wird dies etwa durch die *white* Mutante ermöglicht, die keine Augenpigmente bildet. Wird das *white*-Gen als Transformationsmarker auf einem mobilen Element in das Genom eingebracht, sind die Augen wieder rot. Weißäugige Mutanten sind auch in einigen anderen Insekten bekannt, allerdings ist es dann immer noch notwendig, das verantwortliche Gen aus der Gruppe der Augenpigmentsynthesegene zu bestimmen und molekular zu isolieren. Diese arbeitsaufwendige und langwierige Prozedur muss dabei für jeden neu zu transformierenden Organismus wieder erneut durchgeführt werden und ist daher für *Evo-Devo* Anwendungen oder medizinische bzw. landwirtschaftliche Biotechnologie kaum geeignet. Das Fehlen eines allgemein verwendbaren Selektionsmarkers war daher ein ganz wesentlicher Grund dafür, daß es bis weit in die 90er Jahre nur wenig Fortschritte bei der Generierung transgener Insekten gab.

Einen wichtigen Durchbruch brachte die Entdeckung eines grün fluoreszierenden Quallenproteins (GFP) als Expressionsmarker. Durch Anregung mit Licht einer bestimmten Wellenlänge kann das Molekül *in vivo* in verschiedenen Organismen zum Leuchten gebracht

werden, ohne daß ein zusätzliches Substrat oder Kofaktoren benötigt werden (Chalfie et al., 1994). Damit stand ein dominantes Signal zur Verfügung, das ohne spezielle mutante Linien auch in Wildtyp detektiert werden konnte. Als letztes Problem blieb damit noch die Notwendigkeit, für jede neu zu transformierende Spezies einen geeigneten Promotor zu finden, der GFP in genügender Stärke exprimieren kann. Viele Gruppen setzten dabei auf Promotoren von Genen wie *Aktin* und *Polyubiquitin*, die für basale Zellfunktionen verantwortlich sind und in fast allen Geweben konstitutiv aktiv sind. Selbst diese Promotoren sind jedoch nur in nah verwandten Arten ausreichend aktiv. Vermutlich liegt dies daran, dass auch konstitutive Promotoren recht komplex aufgebaut sind. Da in entfernteren Arten nicht alle beteiligten Transaktivatoren konserviert sind, nimmt die Aktivität solcher Promotoren mit zunehmendem phylogenetischem Abstand schnell ab. Daher ist in vielen Fällen immer noch die Klonierung der Homologen aus der zu transformierenden Art selbst erforderlich.

In Zusammenarbeit mit Ernst Wimmer gelang es schließlich, diese Problematik zu umgehen: der Gedanke war, artifizielle, nicht artspezifische Promotoren aus starken Enhancern aufzubauen und GFP als Transformationsmarker damit zu exprimieren. Wegen ihrer einfachen Struktur sollten solche Promotoren auch in phylogenetisch entfernten Spezies aktiv sein. Diese Strategie führte dann auch tatsächlich zum erwünschten Erfolg.

Terminale homöotische Gene in Tribolium

Da der Versuch der Etablierung eines Transformationssystems relativ risikoreich war und auch andere Gruppen seit längerem mit unterschiedlichen Ansätzen daran arbeiteten, habe ich parallel auch einige Entwicklungsmutanten aus dem Mutagenesecscreen untersucht. Dadurch ergibt sich der zweigeteilte Aufbau dieser Doktorarbeit:

Im ersten Teil, Kapitel 1 und 2, wird das Transformationssystem und seine Anwendung für erste funktionelle Experimente beschrieben. Darunter sind die *lacZ* Expression unter Kontrolle des *Tc'hunchback* Promotors und einige weitere Reporterkonstrukte in Verbindung mit *Drosophila* 3'UTR Lokalisierungssignalen oder Bicoid Bindungsstellen.

Der zweite Teil (Kapitel 3), enthält eine entwicklungsbiologische Analyse der homöotischen Mutanten *wurm* und *überlänge*, sowie die Klonierung und funktionelle Beschreibung des *Tribolium spalt* Genes (*Tc'sal*). Wie vorher erwähnt, waren HOX-Gendefekte unter den ersten in dieser Spezies untersuchten Mutanten und halfen *T. castaneum* als *Evo-Devo* Modellsystem zu etablieren. In unserem EMS-Screen wurden 2 Mutanten identifiziert, die in die HOX Klasse fallen, aber keinem bis dahin bekannten Gen zuzuordnen waren. Der betroffene Bereich, Abdominalsegment 9-11, fällt mit der Expressionsdomäne von *Abd-B* zusammen (Sue Brown, pers. Mitteilung). Die einzige bekannte *Tribolium Abd-B* Mutante *eu*

hat allerdings einen anderen Phänotyp: in der Puppe tritt ein zusätzliches Paar Urogomphi auf. Andere Kandidatengene sind die sogenannten regionspezifischen homöotischen Gene *spalt* und *forkhead*. Die Funktion von *spalt* in *Drosophila* ist die Begrenzung des eigentlichen Rumpfes in den subterminalen Bereich; *forkhead* ist in das terminale System eingebunden und u.a. für die Differenzierung der Analplatten und des Hinterdarms verantwortlich. Beide sind allerdings in den morphologisch reduzierten *Drosophila*-Embryonen nur schwer zu charakterisieren. Da Käferlarven einen wohl ausgebildeten Kopf und auch geeignete Kutikulamarker am Rumpfe besitzen bestand die Hoffnung, die embryonale Funktion dieser regionspezifischen Gene in *Tribolium* besser untersuchen zu können, und dabei möglicherweise noch weitere, in *Drosophila* noch nicht bekannte Faktoren zu finden.

Außer diesen beiden Hauptprojekten sind im Anhang noch stichpunktartig die vorläufigen Ergebnisse kleinerer Projekte aufgeführt, die aus Zeitmangel nicht mehr ausführlich behandelt werden konnten. Dazu gehört die Charakterisierung von Dorso-ventral-Mutanten (ein Projekt, das jetzt im Labor von S. Roth fortgeführt wird), sowie Versuche zur Spermienkonkurrenz, die für die praktische Arbeit mit Mutanten von Bedeutung sind.

1. Entwicklung eines Transformationssystems

Der Ausgangspunkt für den ersten Teil dieser Doktorarbeit war, eine Methode der Keimbahntransformation für *Tribolium* zu entwickeln, um damit eine noch bestehende Lücke zum etablierten Modellsystem *Drosophila* zu schließen. Ein Transformationssystem wie mit dem *P*-Element besteht aus zwei Komponenten, dem Helperplasmid und dem Plasmid mit dem mobilen Transposon. Das Helperplasmid trägt die Sequenz für die transiente Expression der Transposase, kann selbst aber nicht ins Genom integrieren, da ein oder beide Arme des Transposons fehlen. Es geht daher nach einiger Zeit verloren. Das mobile Transposon enthält die zum Einbau notwendigen Armsequenzen mit der dazwischen liegenden Fremd-DNA und einem Markergen. Die Transposasesequenz ist entfernt oder zerstört, damit das Transposon stabil im Genom erhalten bleibt. Die Notwendigkeit von sogenannten promiskuitiven Transposons und eines sicheren Transformationsmarkers wurde in der Einleitung bereits erläutert. Christian Wolff hatte zuvor in unserem Labor die regulatorischen Sequenzen von *Tribolium hunchback* kloniert und charakterisiert (Wolff et al., 1995). Dieser bis dahin einzig verfügbare Käferpromotor bot damit die erste Möglichkeit, einen, wenn auch nur embryonalen, Transformationsmarker zu erstellen. Als Reportergen waren GFP und LacZ vorgesehen, da Augenpigmentgene noch nicht bekannt waren. Als weiterer, evolutionär etwas weniger speziesspezifisch wirkender Promotor sollte *Dm'hsp70* im Reismehlkäfer erprobt werden.

Vorversuche

Zuerst war das Problem zu bewältigen, die Injektionsmethode an *Tribolium* anzupassen. Grundsätzlich orientierte ich mich an der Vorgehensweise bei *Drosophila*. Es war zwar möglich, Käfereier unter Öl zu injizieren, aber im Gegensatz zur Fliegenlarve mußten die geschlüpften Käferlarven anschließend auf trockenes Mehl transferiert werden, wo sie dann aufgrund des Öls mit dem Mehl verklebten und starben. Zusätzlich sind die *Tribolium*embryonen nach dem Dechorionieren mit dem Bleichmittel Klorix auch empfindlicher gegen Luftfeuchtigkeitsschwankungen als *Drosophila*embryonen. Deshalb wurde zuerst eine Methode mit einer wassergefüllten Kammer entwickelt, bei der die Eier nur zur Injektion unter Wasser gesetzt wurden, anschließend aber sofort wieder „getrocknet“ wurden (siehe Material & Methoden). Später wurde einfach trocken ("in Luft") injiziert. Dabei ist zwar die Sichtkontrolle während der Injektion deutlich schlechter, der große Vorteil ist aber, daß man auf den Heptankleber verzichten kann, da die gewaschenen Eier mit ihrem Restmehl/Chorion direkt auf der Glasoberfläche haften. Die Bedingungen für die Weiterentwicklung mußten so sein, daß einerseits eine hohe Luftfeuchte bei entsprechend hohen Temperaturen von 24° oder 32°C herrschte, andererseits aber kein Wasser an den Eiern kondensieren durfte, da dieses die Schlüpftrate stark senkte. Dies wurde dadurch

gelöst, daß die Deckgläser mit den Eiern auf Drosophila-Apfelsaftagarplatten gelegt wurden und zunächst abgedeckt in dichten Plastikboxen verstaut wurden. Erst ca. einen Tag vor dem Schlüpfen wurde die Luftfeuchte durch das Abnehmen des Deckels schließlich gesenkt (siehe Material & Methoden).

Die Transformationskonstrukte mit den Markergenen *Dm'hsp70-EGFP* und *Tc'hb-lacZ* wurden hergestellt und in Plasmide mit dem *Hermes* Transposon kloniert. *Dm'hsp70-EGFP* wurde zusätzlich auch in den häufig verwendeten Drosophilavektor pCaSpeR (Thummel et al., 1988) gesetzt. Beide Markergenkonstrukte wurden zuerst in *Drosophila* auf Funktion getestet, weshalb sie auch den Augenpigmentmarker *Dm'white⁺* enthielten. pCaSpeR[*Dm'hsp70-EGFP/w⁺*] war leider selbst nach Hitzeschocks nur schwer gegenüber der Eigenfluoreszenz in den Fliegenlarven zu erkennen. Für *Tribolium* wurden Ablagen der mit pHer[*Dm'hsp70-EGFP*] injizierten G₀ gewaschen und unter dem Fluoreszenzmikroskop untersucht. Bei der Durchsicht der Käferembryonen konnte kein Hinweis auf ein EGFP Signal gefunden werden. In, mit dem anderen Konstrukt pHer[*Tc'hb-lacZ/w⁺*] transformierten Fliegenembryonen läßt sich die *lacZ*-Expression mittels *in situ* Färbung nachweisen. Zum Testen dieses zweiten Konstruktes in *Tribolium* wurden die G₀-Käfer in Pools zur Eiablage gebracht, die Eier abgesammelt und fixiert. Testfärbungen mit verschiedenen α -LacZ Antikörpern zeigten, daß diese nicht zuverlässig in ganzen Embryonen funktionieren. Da zudem *in situ* Färbungen in Embryonen sensitiver sind, wurden diese Pools auch mit antisense Proben untersucht. Mit einer Reihe von Färbeversuchen konnte allerdings kein *hb*-typisches Muster gefunden werden. Da die Färbungen mit *Tribolium*embryonen im Gegensatz zu *Drosophila* wesentlich heterogener im Ergebnis sind, erwies sich auch dies als keine ausreichend effektive Methode. Alternativ dazu wurde überlegt, evolutionär stark konservierte Gene und dazugehörige *enhancer* zu benutzen, um ein diskretes und starkes Signal zu erzeugen, das leichter zu detektieren ist. Geeignet erschien *Distalless* oder das Minimalfragment aus dem 3,6 *Dm'eyeless enhancer* (Hauck et al., 1999).

Zu diesem Zeitpunkt ergab sich eine Zusammenarbeit mit Ernst Wimmer, Bayreuth, die schließlich zu dem „Universellen Marker“ führte. Dieser enthält den artifiziellen *enhancer* 3xP3 als kleine und kompakte Variante eines augenspezifischen Promotors, welcher von Pax-6 bzw. Eyeless aktiviert wird und keine weiteren Hilfsfaktoren benötigt (Sheng et al., 1997). Pax-6 ist eines der evolutionär am besten konservierten Gene und in fast allen Metazoa vorhanden. Dieses Markergen 3xP3-EGFP wurde in die verschiedenen zur Verfügung stehenden Transposons kloniert und auf Verwendbarkeit und Effizienz in *Tribolium* getestet. Im folgenden wird zunächst kurz der Aufbau dieser Vektoren beschrieben. In den weiteren Abschnitten werden die Ergebnisse mit den verschiedenen Transposons präsentiert und zusammenfassend diskutiert. Ziel war dabei auch, möglichst

viele quantitative Daten aus den Injektionsserien zu sammeln und auszuwerten, um Aussagen über das Verhalten und die Vor- und Nachteile der verschiedenen mobilen Elemente machen zu können.

1.0. Aufbau der Vektoren und Expression des Markergens 3xP3-EGFP

Das Universelle Marker Gen basiert auf den Ergebnissen von Wilson et al. (Wilson et al., 1993) und Sheng et al. (Sheng et al., 1997). P3 ist eine Homodimerbindestelle für Eyeless/Pax-6, einem Homöodomainprotein vom *paired* Typ. Pax-6 ist eines der zentralen Gene für die Augenentwicklung und evolutionär hoch konserviert. Die Consensusbindestelle ist 11 bp lang (TAATYNRATTA). Diese Bindestelle P3 ist im Markergen zur Verstärkung drei Mal hintereinander vorhanden und wird gefolgt von den basalen Promotorsequenzen von *Dm'hsp70* (Position -40 bis +70).

In den ersten Versuchen mit *Hermes* und *piggyBac*, die in der Nature Correspondence (Berghammer et al., 1999b) veröffentlicht sind, wurden die Testversionen pH[3xP3-EGFP] und pB-G #3 eingesetzt, die jeweils EGFP enthielten (siehe Material & Methoden). Die weiteren Versionen mit zusätzlichen Schnittstellen für ein einfaches und schnelles Klonieren von Fremd-DNA und ein dazu passender Zwischenvektor wurden von Carsten Horn im Labor von E. Wimmer hergestellt und in einem begleitenden Artikel veröffentlicht (Horn and Wimmer, 2000). Das Fluoreszenzfarbenspektrum wurde dabei auf drei Farben erweitert: neben EGFP auch EYFP und ECFP, um zwei verschiedene Konstrukte gleichzeitig verwenden zu können. Zudem wurden, aus Sicherheitsgründen, Teile des Transposasesgens entfernt, um eine Wiederherstellung des Gens durch Rekombination zu verhindern.

Parallel zu meinen Experimenten in *Tribolium* wurde das Markergen im Labor von E. Wimmer in der Fliege getestet. Es zeigte sich, daß in *Drosophila* das 3xP3 Markergen ab Stadium 16 im larvalen Auge, dem Bolwig Organ, exprimiert wird. In den folgenden Stadien und in den Larven ist die Fluoreszenz auch im Zentralnervensystem (CNS), im peripheren Nervensystem (PNS), dem Hinterdarm (HG) und den Analplatten (AP) zu sehen. Ab dem späten Puppenstadium leuchtet auch das Komplexauge (Horn and Wimmer, 2000). Im PNS, HG und AP müssen andere *paired* Homöodomainproteine den Marker aktivieren, da *eyeless* und das Ortholog *twin of eyeless* dort nicht exprimiert sind.

Nach der erfolgreichen Keimbahntransformation konnte ich feststellen, daß *3xP3-GFP* im Käfer ähnlich exprimiert wird. In *Tribolium* ist der Marker im schlüpfreifen Embryo und in der Larve in den Sinneszellen des larvalen Auges und im Nerv, der zum Gehirn führt zu sehen (Abb 1.1 B). Unterschiedlich stark schimmert im Hinterkopf und vorderen Thorax ein CNS Signal durch das Gewebe, ebenso wie der Hinterdarm im posterioren Bereich. In der Puppe

ist die Fluoreszenz, je nach Entwicklungsstand, in den sich bildenden Ommatidien der Komplexaugen und in dem dazwischenliegenden Gehirnbereich zu erkennen (Abb 1.1 C). Im adulten Käfer schließlich leuchten sind die Augen stark, während die Fluoreszenz im CNS durch die Kutikula kaum zu sehen ist (Abb 1.1 A).

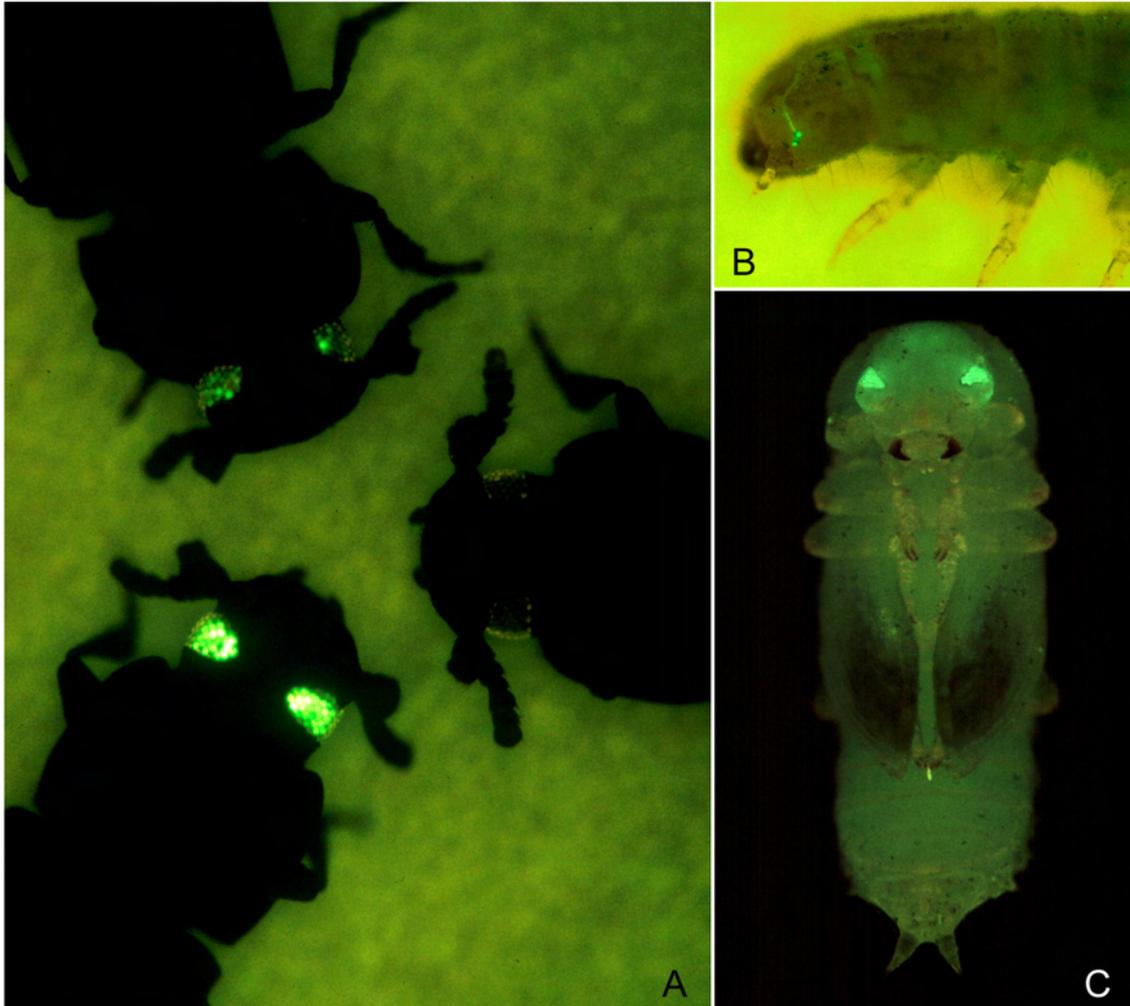


Abb. 1.1 3xP3 Markerexpression in *T. castaneum*.

A) Käfer mit starker Fluoreszenz in den Augen (links unten) und mit schwächerer, mosaikartiger Expression (links oben) im Vergleich mit einem nicht transgenen weißäugigen Käfer (rechts). B) Larve (vorderer Abschnitt) mit Markersignal in den Sinneszellen des larvalen Auges und dem afferenten Sehnerv. C) Puppe mit GFP in den Augenfeldern und im Gehirnbereich zwischen den beiden Augen.

1.1. Transformation von *T. castaneum* mit Hermes

1.1.1. Einleitung

Das Transposon *Hermes* stammt aus dem Genom von *Musca domestica* und wurde 1994 (Warren et al., 1994) als *hobo* ähnliches Element vom Typ „short inverted repeat“ beschrieben. Damit gehört es zur *hAT*-Familie, die sowohl tierische (*hobo*), als auch pflanzliche transposable Elemente umfaßt, wie z.B. *Ac* aus *Zea mays* (Calvi et al., 1991) und *Tam3* aus *Antirrhinum majus* (Feldmar and Kunze, 1991).

Hermes zeichnet sich aus durch

- eine Länge von 2749 bp,
- 17 bp lange Enden (imperfect inverted repeats),
- einen ORF von 613 aa Länge, der 55% identisch und 71% ähnlich zu *hobo* ist und durch
- Integrationen im Genom, die durch die Duplikation von 8 bp der Insertionsstelle gekennzeichnet sind.

Mit plasmidbasierten Mobilitätstests wurde die Aktivität von *Hermes* in den Embryonen verschiedener Fliegenfamilien festgestellt: Bei *Musca domestica* (Muscidae) (O'Brochta et al., 1994); *Aedes aegypti* (Culicidae) (Sarkar et al., 1997b), *Lucilia cuprina* (Calliphoridae), *Ceratitis capitata*, *Bactrocera tryoni* (beide Tephritidae) und *D. melanogaster* (Drosophilidae) (Sarkar et al., 1997a). *Hermes* wurde auch bereits erfolgreich als Vektor in *D. melanogaster* eingesetzt. Mit dem Helperplasmid pHSHH1.9 und dem *white*⁺ Marker wurde eine Transformationseffizienz von 34,6% der fertilen G₀ (43 von 124) erzielt (O'Brochta et al., 1996).

1.1.2. Transformationseffizienz

Verwendet wurde der weißäugige Stamm *p, Rd, mc, lod* (jeweils homozygot), da das dunkle Augenpigment die Detektion erschwert. Die Eiablagezeit betrug 4,5 h bei 24°C. Nachfolgend wurde bis zu 3 h 15' lang aufgereiht und unter Wasser bei RT injiziert. Bis zu diesem Alter sollten die Eier noch synzytial sein (Handel et al., 2000). Die weitere Entwicklung erfolgte bei 32°C. Zur Bestimmung der Transformationseffizienz konnten mit drei Injektionsserien folgende Ergebnisse gewonnen werden:

	gesamt	m	w
Eier injiziert	1234		
geschlüpfte Larven	790		
überlebende Käfer (G ₀)	560	265	295
Kreuzungen mit 2 G ₀		197	197
Kreuzungen mit 1 G ₀			32
davon fertile G ₀	426		
transgene Linien aus Kreuzungen mit 2 G ₀	6		
Transformationsrate	1,41%		

Clustergröße:	
Mittelwert der 6 Linien	6,97%
Minimum	1,82%
Maximum	17,86%

Tab. 1.2 *Hermes* Transformationsexperiment mit Helperplasmid pkHSHH1.9[§] (0,375 µg/µl) und Donorplasmid pH[3xP3-EGFP] (0,500 µg/µl).

[§] (O'Brochta et al., 1996). Die überlebenden Käfer wurden in 1+1 in Kreuzungen angesetzt; übrige Weibchen wurden mit dem Parentaltyp ausgekreuzt. Clustergröße = Anteil transgener Nachkommen zu Gesamtzahl je Kreuzung (bzw. G₀). m (männlich), w (weiblich).

Die injizierten Käfer wurden paarweise untereinander in Einzelkreuzungen angesetzt, also nicht mit dem Parentaltyp ausgekreuzt, um die Anzahl der angesetzten Kreuzungen geringer zu halten (nur die überzähligen Weibchen wurden ausgekreuzt). Die relativ hohe Zahl von Käfern ohne Nachkommen erklärt sich dadurch, daß auf den Rücken gefallene Käfer seltener durch den zweiten Käfer wieder umgedreht und damit gerettet werden, als dies bei Kreuzungen mit mehreren Individuen der Fall ist. Es handelt sich also in fast allen Fällen nicht um durch die Injektion verursachte, mechanische Beschädigungen während der Injektion. Die Transformationsrate von 1,41% errechnet sich aus der Annahme, daß nur jeweils ein Elter in der Kreuzung transgenen Nachwuchs produziert. Dies ist auf Grund der äußerst niedrigen Erfolgsrate (6/229 Kreuzungen) und der geringen Clustergröße (im Mittel 6,97%) am plausibelsten. Den Begriff Clustergröße verwende ich für den prozentualen Anteil transgener Nachkommen im Verhältnis zur Gesamtzahl aller Nachkommen in jeder Kreuzung (bzw. G_0). Die Clustergröße variierte in den transgenen Linien zwischen 1,82% und 17,86% (Zwischenwerten von 2,94%, 5,13%, 6,76% und 7,29%). Die Augenphänotypen des Fluoreszenzmarkers waren in der Regel im ganzen Komplexauge stark leuchtend und nur in einer Linie schwach mosaikhaft.

1.1.3. Stabilität der Integrationen

Wegen der niedrigen Transformationsrate erschien der *Hermes*-Transformationsvektor für praktische Zwecke uninteressant. Daher wurden die Integrationen nicht weiter molekularbiologisch untersucht. Die Linien wurden allerdings über 3 Jahre hinweg (4-6 Generationen pro Jahr) gehalten und blieben dabei stabil ohne Anzeichen von Auffälligkeiten. Eine der Linien wurde mit wt Käfern ausgekreuzt und verhielt sich entsprechend den Mendel'schen Vererbungsregeln (siehe Kap. 1.5).

1.2. Transformation von *T. castaneum* mit piggyBac

1.2.1. Einleitung

Das Transposon *piggyBac* oder *IFP2* wurde in den 80er Jahren bei der Analyse bestimmter Mutanten des Nuclear Polyhedrosis Virus (NPV; Fam. Baculoviridae) entdeckt und hauptsächlich in der Arbeitsgruppe von Malcolm J. Fraser charakterisiert. Dieser insektenpathogene Virus hat ein zirkuläres, doppelsträngiges DNA Genom von 80-130 kb Länge. Bei Vermehrung in Insektzellkulturen trat häufig eine Mutation auf, deren dominanter Phänotyp eine deutliche Verringerung der virusverursachten *Occlusion bodies* ist (FP Mutation). Je nach verwendeter Zelllinie gibt es jedoch unterschiedliche Ursachen dafür. So ist die FP Mutation in der Linie TN-368 aus dem Schmetterling *Trichoplusia ni* (engl. Cabbage looper; Fam. Noctuidae) oft mit der Integration von Fremd-DNA in das Virusgenom

verbunden. Nach Isolierung und Vergleich unabhängiger Mutanten wurde das anfangs *IFP2* genannte *piggyBac* Element wie folgt beschrieben (Cary et al., 1989; Elick et al., 1996; Wang and Fraser, 1993):

- Länge 2475 bp
- Die beiden Enden sind genaue inverted repeats von 13 bp Länge (TR), welche eine *snaphack* Struktur ausbilden können (ähnlich wie bei verschiedenen anderen eukariotischen Transposons)
- Ein weiteres Paar interner inverted repeats von 19 bp, welches asymmetrisch liegt (31 bp vom linken TR und 3 bp vom rechten TR entfernt); diese internen repeats und der 31 bp große Spacer sind unvollkommen spiegelsymmetrisch.
- In der Mitte liegt eine durchgehend kodierende Transposasesequenz von 1,8 kb, mit einem vermutlich für die RNA Polymerase II passenden Promotor, einem Polyadenylierungssignal und 2 möglichen DNA Bindedomänen.
- *piggyBac* inseriert immer in ein TTAA Tetranukleotid und dupliziert dieses dabei. Es sind offensichtlich aber nicht alle TTAA Sequenzen gleichmäßig betroffen. Die Autoren in (Cary et al., 1989) geben als zusätzliche strukturelle Voraussetzung eine AT-reiche Consensus Zielsequenz von 12 bp um dieses TTAA Motiv an.
- Das Element kommt einzeln verteilt im Genom von TN-368 in mäßiger Kopienzahl vor, ist aber nicht in allen Stämmen bzw. Zelllinien von *T. ni* enthalten und daher vermutlich erst in jüngerer Zeit auf diese Art übertragen worden.

Obwohl *piggyBac* aus Lepidopteren stammt, konnte es mit Erfolg zur Keimbahntransformation der Mittelmeerfruchtfliege *C. capitata* verwendet werden. Mit dem Helper p Δ Sac (ohne *hsp70*) und dem *Cc'white*⁺ Gen als Marker wurde dabei eine Rate von 3 - 5% erzielt (Handler et al., 1998). In einem Exzisionsassay und plasmidbasierten Mobilitätsversuch wurde die Funktionalität auch in *Pectinophora gossypiella* (Lepidoptera) festgestellt (Thibault et al., 1999).

1.2.2. Transformationseffizienz

Verwendet wurde auch hier im ersten Versuch der Stamm *p*, *Rd*, *mc*, *lod* (jeweils homozygot). Die Eiablagezeit betrug 3-3,5 h bei 24°C. Nachfolgend wurde bis zu 3 h lang aufgereiht und unter Wasser bei RT injiziert. Die weitere Entwicklung erfolgte bei 32°C.

Mit einer Injektionsserie konnten folgende Ergebnisse gewonnen werden (siehe auch Spalte 1 in der Tabelle 1.4):

	gesamt	m	w
Eier injiziert	506		
geschlüpfte Larven	222		
überlebende Käfer (G ₀)	152	80	72
fertile G ₀	146	77	69
transgene Linien	61		
Transformationsrate	ca. 56%		

Clustergröße:	
Mittelwert	29,79%
Minimum	1,82%
Maximum	76,74%

Tab. 1.3 *piggyBac* Transformationsexperiment mit Helperplasmid pBachsp[§] (0,375 µg/µl) und Donorplasmid pB[3xP3-EGFP#3] (0,500 µg/µl).
[§] (Handler and Harrell, 1999). Die überlebenden Käfer wurden in 1+1 in Kreuzungen angesetzt (2 G₀); übrige Männchen wurden mit dem Parentaltyp ausgekreuzt. Clustergröße = Anteil transgener Nachkommen zu Gesamtzahl je Kreuzung (2 G₀). m (männlich), w (weiblich).

Die Kreuzungen wurden, wie bei Hermes, paarweise aus einem männlichen und einem weiblichen G₀ angesetzt; die übrigen 8 Männchen wurden mit Weibchen des Parentaltyps ausgekreuzt. Durch die unerwartet hohe Anzahl unabhängiger transgener Linien wurde die Transformationsrate je G₀ wie folgt berechnet:

Von den 69 fertilen Doppel-G₀ Kreuzungen hatten 55 transgene Nachkommen, die entweder aus der Keimbahn eines oder beider G₀ stammen können. Bei einer Transformationsrate p (pro G₀) ist die Wahrscheinlichkeit dafür, daß keine der beiden G₀ transformierte Keimzellen haben = $(1-p)^2$. Für diese Doppel-G₀ Kreuzungen gilt also: $(1-p)^2 = 14/69$. Daraus ergibt sich $p = 55\%$. Mit den 8 Einzelkreuzungen (6 von 8 positiv, 75%) gewichtet kombiniert ergibt sich ein p_{ges} von 56%.

Zur Bestätigung der außergewöhnlich hohen Transformationsrate, und um das Verhalten des *piggyBac* Elementes und seine Einsetzbarkeit bei funktionellen Experimenten besser zu erforschen, wurden die weiteren Injektionsserien (Nr. 2-5 in der Tabelle 1.4) mit unterschiedlich großen zusätzlichen DNA Abschnitten ebenfalls quantitativ ausgewertet.

Konstrukt Nr.	1	2	3	4a	4b	4 ges.	5
Stamm	<i>p, Rd, mc, lod</i>						p^2 §
Konstrukt µg/µl	0,500	0,413	0,535	0,560			0,500
Helper µg/µl	0,375	0,388	0,400	0,465			0,375
Konstrukt/Helper	1,12	0,70	0,80	0,63			0,51
Mob. Element	3700	5700	6700	8200			12400
Anzahl Eier	509	314	459	334	278	612	392
Schlüpftrate %	43,61%	42,99%	48,58%	16,47%	14,75%	15,69%	36,99%
Anzahl Käfer (G ₀)	152	98	166	28	26	54	120
Traforate in % G ₀	57%	40,00%	23,68%	19,23%	29,17%	24,00%	21,82% *
Unabh. Linien	61 **	38	36	5	7	12	12 *
Ø Clustergröße	29,79% **	24,43%	6,37%	4,29%	6,48%	5,57%	8,16% *
SD		21,85%	5,94%			5,17%	6,55%
Minimum	1,82% **	0,97%	0,55%	0,46%	1,78%	0,46%	0,40% *
Maximum	76,74% **	90,29%	22,78%	9,68%	19,70%	19,70%	21,05% *

Tab. 1.4 Daten der verschiedenen *piggyBac* vermittelten Transformationen.

Versuche 4a und 4b sind unabhängig ausgewertete Injektionsexperimente desselben Konstruktes, die in 4 ges. zusammengefaßt sind. Konstrukt/Helper = stöchiometrisches Verhältnis von Konstruktplasmid zu Helperplasmid; Mob. Element = Gesamtlänge des inserierenden Transposons in bp; Ø Clustergröße = gemittelter Anteil transgener Käfer zu Gesamtzahl der Nachkommen. (§) Stamm homozygot für *pearl*, der durch Auskreuzen des Stammes *p, Rd, mc, lod* mit *wt* gewonnen wurde und noch *Rd, mc, lod* Allele segregiert; (*) nur aus männlichen G₀ berechnet; (**) Kreuzungen zwischen zwei G₀ (Doppel-G₀ Kreuzungen). Weitere Daten und Angaben hierzu befinden sich im Anhang Tabelle A.1.

Die Mortalität während der Eireifung ist bis auf das Konstrukt 4 relativ gering und untereinander vergleichbar. Die Schlüpftrate unbehandelter Eier beträgt etwa 80-85%. Nach Klorixbehandlung und Aufreihen sinkt diese auf ca. 60%. Die Injektionsprozedur senkt diese, je nach individueller Beschaffenheit der Glaskapillare, weiter. Die höhere Mortalität bei Nr. 4 hat wahrscheinlich nichts mit der Art des inklonierten Konstruktes zu tun, da es sich um ein kurzes, artifizielles Promotorstück und das *lacZ* Gen handelt. Vermutlich ist es ein Ausreißer, der mit der Konstitution der Eier legenden Käferpopulation zu tun hat und bereits öfters im Labor beobachtet wurde. Das Injektionsalter der Embryonen wurde möglichst einheitlich zwischen den verschiedenen Serien gehalten, damit dieses das Ergebnis nicht beeinflusse. Alle Werte für die Dauer bis zur Injektion befinden sich innerhalb der Zeit der frühen Mitosen, vor der Ausbildung von Zellwänden. Eine Abhängigkeit der Effizienz von der DNA Konzentration des Helpers wird, in der hier aufgetretenen Varianz, ebenfalls als unwahrscheinlich angesehen. Die Stöchiometrie, d.h. die Anzahl der Donorplasmide im Verhältnis zu der Anzahl der Helperplasmide ändert sich jedoch etwas stärker als die Helper-DNA-Konzentration, da die DNA-Menge im Injektionsvolumen nicht in gleichem Maße erhöht werden kann, wie die Länge der Donorplasmide zunimmt (Tab. 1.4 Zeile 5). Abb. 1.5 zeigt, daß der höchste Wert für die Transformationsrate und die Clustergröße mit dem höchsten Stöchiometriefaktor erreicht werden. Die Korrelation ist allerdings im Bereich der

Experimente 2-4 nicht besonders gut. Die Abhängigkeit der Effizienz von der Stöchiometrie kann hier nicht ganz ausgeschlossen werden; da jedoch die absolute DNA-Konzentration des Helpers (siehe oben) keine Korrelation zeigt, ist die Veränderung der Transformationsrate in Abhängigkeit von der Länge des gesamten mobilen Elementes überzeugender (Abb. 1.6). Die Trendlinie läßt vermuten, daß die Effizienz im Bereich von 3 kb – 7 kb deutlich abnimmt. Darüber hinaus ist sie weniger größenabhängig mit einer immer noch sehr guten Rate von um die 20% bei 12 kb. Die Werte von verschiedenen Injektionsserien können zwar stark variieren (siehe Experimente 4a und 4b), aber dennoch zeigt das Transposon *piggyBac* sein Potenzial, auch sehr große Fremd-DNA-Stücke effizient zu transportieren. Die Werte für die Clustergrößen je G_0 verhalten sich ähnlich wie die Transformationsraten in Bezug auf die Insertgröße. Das läßt vermuten, daß in großen Clustern mehrere verschiedene Insertionen und in kleinen nur eine oder wenige vorhanden sind.

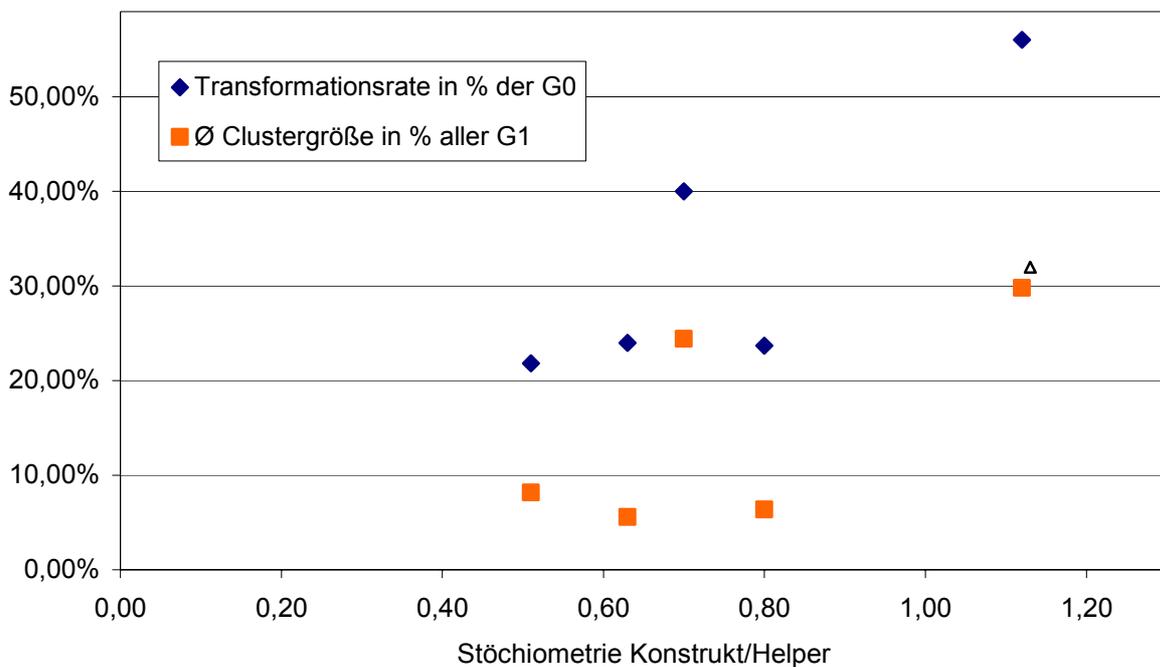


Abb. 1.5 Verhältnis der Transposition zur Stöchiometrie von Konstrukt- und Helperplasmid. „Δ“ Ø (mittlere) Clustergröße aus Kreuzungen zweier G_0 (Konstrukt 1 aus Tab. 1.4)

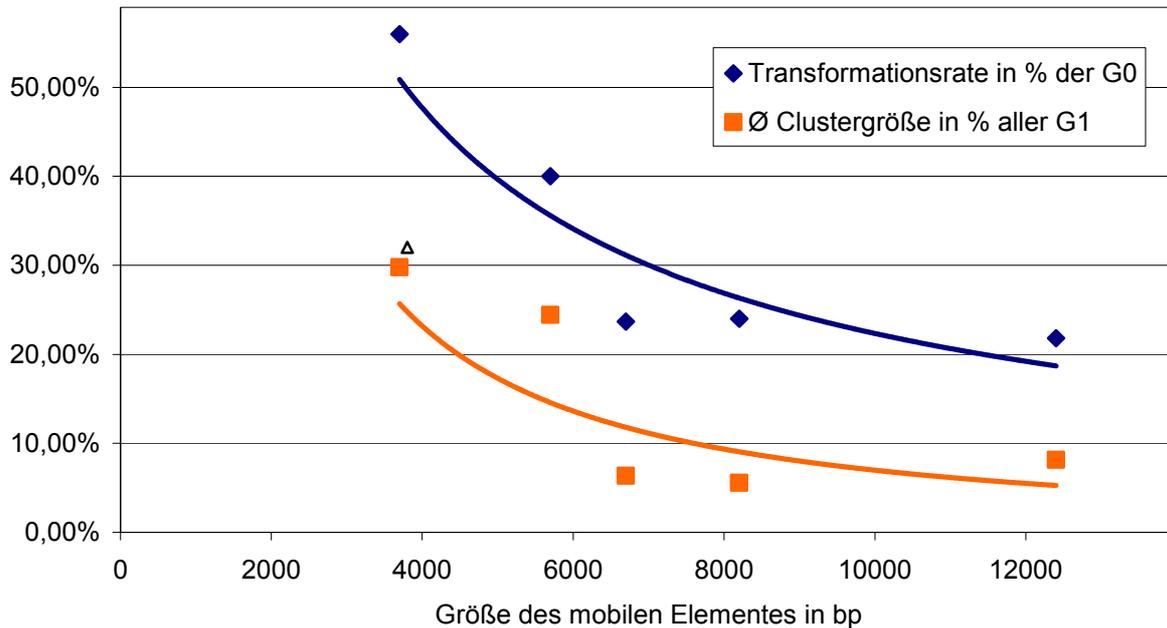


Abb. 1.6 Abhängigkeit der Transposition von der Größe der mobilen Elemente.

„Δ“ Ø (mittlere) Clustergröße aus Kreuzungen zweier G_0 (Konstrukt 1 aus Tab. 1.4); eingezeichnet sind die Trendlinien der potenziellen Regression ($R^2 = 0,81$ und $0,56$); die polynomische Regression hat zwar die höheren Werte des Bestimmtheitsmaßes ($R^2 = 0,94$ und $0,83$), ist aber biologisch unsinnig, da die Kurven am Ende bei 12 kb wieder ansteigen würden.

Tabelle 1.7 zeigt das Vorkommen der verschiedenen EGFP-Augenphänotypen der G_1 in den verschiedenen Clustern. Unterschiedliche Expressionsstärken treten sehr oft auf. Die häufigste Kategorie bei allen Konstrukten war „v“ (voll), gefolgt von den verschiedenen Kombinationen mit „v“ (siehe Legende Tab. 1.7). Die Anzahl unterschiedlicher Phänotypen pro Cluster nimmt mit steigender Länge des mobilen Elementes ab und korreliert daher vermutlich mit der Anzahl verschiedener Insertionen, die, je nach Locus, unterschiedlich starke Markerexpression aufweisen können. Passend dazu sind in den größeren Clustern auch die meisten unterschiedlichen Augenphänotypen zu beobachten.

Kategorie	bei Konstrukt #				Clustergröße		
	2	3	4	5	Min	Max	Ø
v,m,s	8	6	1		9,68%	90,29%	30,13%
v,m	10	1	3	3	1,78%	87,50%	23,10%
v,s	2	3		2	3,10%	16,39%	8,90%
v	13	17	5	6	0,55%	36,60%	7,27%
m,s	2	1			1,68%	21,93%	9,74%
m	2	3			1,35%	36,84%	14,08%
s	1	4	3	1	0,40%	4,05%	1,83%

Tab. 1.7 Anzahl und Verteilung der transgenen Linien auf die verschiedenen Augenphänotypkategorien und die dazugehörigen G₁-Clustergrößen.

Aufteilung nach den verschiedenen Konstrukten (#2-5). Bewertung der Augenphänotypen: „v“ (voll) Fluoreszenz gleichmäßig im gesamten Auge; „m“ mosaikhaft; „s“ schwache Fluoreszenz in einem bis wenigen Ommatidien. Max, Min, Ø: maximale, minimale bzw. mittlere Clustergröße je Kategorie über alle Konstrukte (# 2-5). Eine Linie bei #3 war nicht auswertbar. Hervorgehoben ist die Klasse mit der höchsten Häufigkeit.

1.2.3. Stabilität und Charakterisierung der Integrationen

Die verschiedenen Linien ließen sich problemlos über Jahre halten oder auskreuzen. Die Segregationsanalyse des größten Konstruktes (# 5) ergab, daß sich die Insertionen entsprechend den Mendel'schen Regeln verhielten. 24 G₁ Käfer aus 18 verschiedenen Linien (7 ♂ G₀ und 11 ♀ G₀) wurden dazu mit *pearl* Käfern ausgekreuzt und ihre Nachkommen auf Fluoreszenz untersucht. 22 dieser Kreuzungen segregierten in Übereinstimmung mit der Erwartung für eine Insertion, 2 mit der für 1-2 Insertionen. G₁ Käfer (= 1 Gamet) mit großen Konstrukten tragen damit in der Regel nur eine Insertion.

In vielen Linien traten *Enhancer-trap* Linien auf. Mindestens 10% der transgenen Linien weisen eine zusätzliche EGFP Expression in Larven, Puppen oder adulten Käfern auf, die nicht durch den 3xP3 Promotor verursacht ist. Abb. 1.8 zeigt einige davon, weitere Beispiele sind in der Veröffentlichung zu sehen (Lorenzen et al., 2003).

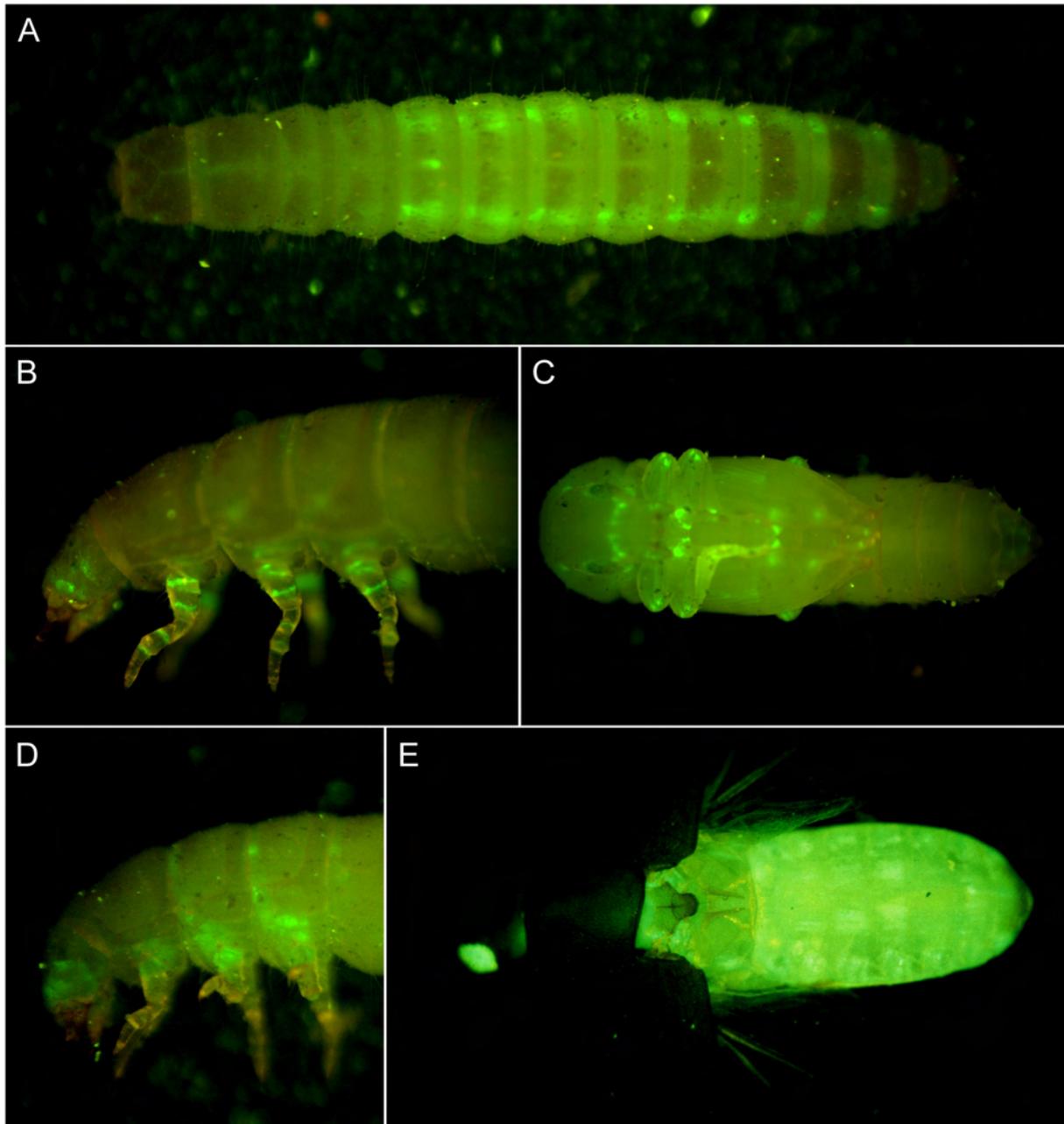


Abb. 1.8 *piggyBac* Linien mit zusätzlichen Expressionsdomänen.

A) Larve mit dorsolateraler längsgerichteter GFP-Expression in den abdominalen Segmenten (dorsale Ansicht; Linie 4xA3 A04+). B) Larve mit ringförmigen Domänen in den Beinabschnitten und den Mundwerkzeugen, sowie einem lateralen Punkt im 2. und 3. Thoraxsegment (seitlich; Linie wtlI 2+). C) Puppe dergleichen Linie mit dem Muster in den Beinen und den Mundwerkzeugen. D) Unabhängige Linie mit zusätzlicher larvaler Expression in ähnlichem Muster, aber wesentlich diffuser (seitlich; wtlI 9+). E) Muskelenhancerlinie pBA19 mit starker Fluoreszenz in den Muskelfasern des ganzen Körpers und in allen Stadien (adulte Käfer dorsal, mit geöffneten Flügeln und Flügeldecken).

Im Labor von R. Beeman, Kansas State wurden einige der Insertionen von Marcé Lorenzen molekular charakterisiert (Lorenzen et al., 2003). Mittels Southern Hybridisierung wurde festgestellt, daß der verwendete *Tribolium*stamm keine endogenen *piggyBac* Elemente enthält. Linien des ersten Transformationsexperimentes hatten zwischen zwei und vier Insertionen (aus zwei G₀ Eltern). Davon wurden drei Insertionen auf die Kopplungsgruppe

(LG) 3 (2x) und 5 gemappt. Von 13 Insertionen wurden die benachbarten Sequenzen bestimmt (7 aus dem ersten Versuch und 6 weitere mit längeren zusätzlichen DNA Abschnitten). Alle enthielten die vollständigen Transposonarme, keine Plasmidsequenzen und die duplizierte TTAA Tetranukleotid Zielsequenz. Außerhalb dieser 4 Basen war aber keine weitere Sequenzpräferenz erkennbar. Ein Vergleich der angrenzenden Sequenzen mit Datenbanken zeigte, daß mindestens 4 davon aus proteinkodierenden Abschnitten stammen.

Die vorhandenen unabhängigen Linien wurden auf rezessive Insertionen mit embryonal-lethaler Wirkung untersucht. Mit ein bis drei Männchen unterschiedlichen Augenphänotyps aus jeder der 56 Linien der ersten *piggyBac* Transformation, wurden 148 Kreuzungen nach dem Mutagenesescree-Schema angesetzt. Bei Durchsicht aller Ablagen konnte allerdings kein Kutikulaphänotyp gefunden werden. Die Wahrscheinlichkeit mit 56 bis maximal 148 verschiedenen Insertionen einen Defekt zu finden, ist jedoch nach den bisherigen Erfahrungen aus *Drosophila* und *Tribolium* gering. Ein EMS-Mutagenesansatz im Labor enthält 500 verschiedene Linien und man erwartet ca. eine Mutante je 100 Linien. Bei einer Insertionsmutagenese mit *P*-Elementen reduziert sich die Erwartung sogar auf ca. eine Mutante je 1000 Linien.

1.2.4. Remobilisierung

Eine der wichtigsten Voraussetzungen für die Anwendung von Transposons in der funktionellen Genomik ist, einmal integrierte Element wieder mobilisieren und an anderer Stelle im Erbgut neu inserieren lassen zu können, ohne dabei neue Injektionen machen zu müssen. So kann z.B. Insertionsmutagenese in großem Maßstab durchgeführt werden, indem man eine Linie, die entweder konstant oder keimbahnspezifisch Transposase exprimiert, mit einer anderen Linie kreuzt, die ein nicht autonomes Element trägt. Durch Kombination verschiedener Marker läßt sich dann feststellen, ob das Transposon an eine andere Stelle gesprungen ist. Nach Auskreuzung der Transposasequelle kann man die neuen Linien stabil halten und auf mutante Phänotypen testen. Mit den speziesunabhängigen Transposons gab es keine Daten über ihre Fähigkeit zur Remobilisierungen, die zu neuen Insertionen in der Keimbahn führten. Für *Hermes* zeigten O'Brochta et al. (O'Brochta et al., 1996) die Fähigkeit zur somatischen Remobilisierung. Dabei wurden Embryonen einer X-chromosomalen *Hermes w⁺* Insertion im Präblastodermstadium mit dem Helferplasmid pSHH1.9 (0,250 µg/µl) injiziert. Dies führte bei 80% der sich daraus entwickelten Männchen zu Veränderungen in der Augenpigmentierung, entweder Verlust oder Farbänderung. Neuinsertionen in der Keimbahn wurden nicht berichtet. Für *Minos* wurde somatische und Keimbahn-Exzision in *Drosophila* berichtet (Loukeris et al., 1995a)

Um festzustellen, ob eine Remobilisierung in der Keimbahn mit *piggyBac* möglich ist, wurde eine der *enhancer trap* Linien als Ausgangsstamm benutzt (siehe Abb. 1.8 E). Die Linie pBA19 hat neben der normalen Markerexpression im Auge und Teilen des Nervensystems auch noch eine sehr starke Expression in vermutlich allen Muskeln, die leicht zu erkennen ist, z.T. sogar durch die Kutikula von Adulten hindurch (Muskellinie, Abb. 1.9 A). Diese Zusatzexpression war über mehrere Generationen hinweg (1 Jahr Haltung und Amplifizierung; entspricht 6-8 Generationen) weder in der Stärke variabel, noch konnte eine spontane Reversion zum „Nur-Augen“ Phänotyp festgestellt werden.

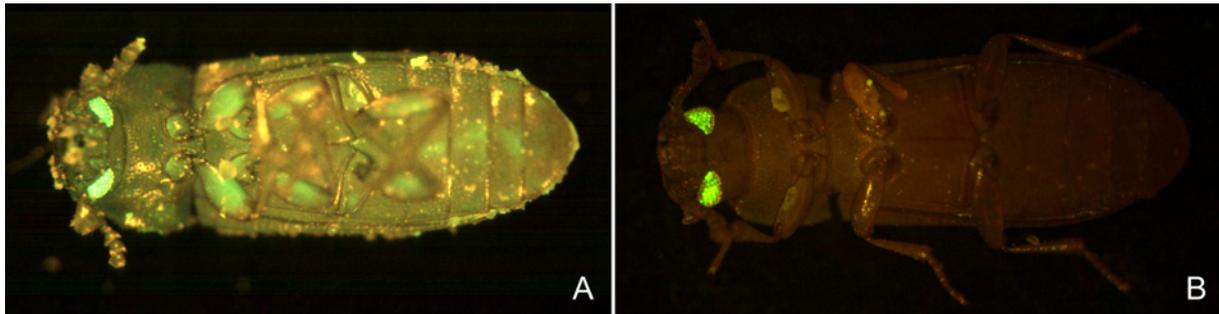


Abb. 1.9 Reversion der Markerexpression durch Remobilisierung.

A) Ein Käfer der Linie pBA19 mit dem Muskelenhancer (siehe auch Abb. 1.8). Die Fluoreszenz in den Muskeln ist so stark, daß sie auch durch die Kutikula hindurch in den Beinen deutlich sichtbar ist (ventrale Ansicht). B) Rekonstituierte Markerexpression nach Helper-Injektion. Nur die „normale“ Expression in den Augen ist noch sichtbar.

Eier dieser *enhancer trap* Linie pBA19 wurden genauso vorbereitet wie bei einer „normalen“ Transformation, mit einer Ablagezeit von 3 Stunden bei 24°C, nachfolgender Klorixbehandlung, Aufreihen und Injektion in Luft. Allerdings wurde diesmal nur das Helperplasmid injiziert. Wenn das dadurch gebildete Transposaseprotein in der Lage ist, das *piggyBac* Element aus dem Genom genauso herauszuschneiden und an anderer Stelle wieder zu integrieren, wie aus einem Plasmid, dann sollten unter den G₁ Käfern, neben denen mit Muskelexpression, auch solche zu finden sein, die nur noch die Augenexpression zeigen, da mit der Transposition auch der Kontakt mit dem muskelspezifischen enhancer verloren geht. In einem Vorversuch wurden 66 Embryonen mit einer Plasmid-DNA Konzentration von 0,600 µg/µl injiziert, was ca. 50% über den für neue Transformationen verwandten Konzentrationen liegt. Die Eiablagezeit betrug 3 h bei 24°C. Nachfolgend wurde bis zu 3 h aufgereiht und in Luft bei RT injiziert (Injektionsalter 2 h 15' – 5 h 50'). Die weitere Entwicklung erfolgte bei 32°C. Aufgrund des ungünstigen Injektionsverlaufs (schlechte Nadel) schlüpfen lediglich 9 Larven. Diese wurden zusammen auf Vollkornmehl belassen und deren Nachwuchs auf Fluoreszenz geprüft:

Unter diesen G₁ Käfern befanden sich 102 mit der ursprünglichen Muskelexpression, aber auch 22 Käfer, die nur die erhoffte markerspezifische Augenexpression hatten (Abb. 1.9). In der Kontrollablage für eine spontane Reversion des Markers (24 h Ablage direkt nach dem

Injektionsversuch) traten, wie erwartet, nur Muskelkäfer (545) oder weißäugige, untransformierte Käfer (207) des Parentalstammes auf. Diese weißäugigen Käfer entstehen dadurch, daß die Muskellinie zu diesem Zeitpunkt noch nicht für den Marker homozygot gemacht worden war, sondern hauptsächlich heterozygote Tiere enthielt. Damit war jedoch bewiesen, daß die Remobilisierung genomintegrierter *piggyBac* Elemente möglich ist.

In einem weiteren, umfangreicheren Versuch wurde die Remobilisierungsrate abgeschätzt. Die Bedingungen waren dieselben, bei einem Injektionsalter von 1 h 15' bis 5 h 45'.

	gesamt	m	w	Käferanzahl der remobilisierte Linien:				
Eier injiziert	364			#	A	A+M	ohne	A/(A+M)*
geschlüpfte Larven	109			1	1	68	66	1,5%
überlebende Käfer (G ₀)	66	34	32	2	1	72	53	1,4%
fertile G ₀	62	31	31	3	1	110	5	0,9%
- rein weißäugige G ₀	30	15	15	4	2	38	60	5,0%
fertile pB A19 G ₀	32	16	16	5	2	81	4	2,4%
remobilisierte Linien	9	4	5	6	4	74	63	5,1%
				7	4	36	59	10,0%
Remobilisierungsrate	28,13%			8	9	57	50	13,6%
				9	13	50	59	20,6%

Tabelle 1.10 *piggyBac* Remobilisierungsdaten.

Links die Zahlen zur Injektion. Die überlebenden Käfer wurden einzeln mit weißäugigen Käfern ausgekreuzt und die Nachkommen auf Fluoreszenz untersucht. Da unter den injizierten Embryonen auch solche ohne Marker waren (rein weißäugige G₀), wurden diese von der Gesamtzahl der Kreuzungen (fertile G₀) wieder abgezogen, um die Anzahl der Kreuzungen mit einem Muskelenhancer-tragenden G₀ zu erhalten (pBA19 G₀). In 9 dieser 32 Kreuzungen traten Käfer mit ausschließlich in den Augen vorkommendem Markersignal auf. Rechts daneben die Auswertung der 9 Linien mit remobilisierten Elementen. (*) Anteil der Käfer je Linie, die EGFP nur in den Augen exprimierten (A) in Bezug auf alle Käfer mit Markergen (Augen und Muskel-Expression, A+M). m (männlich), w (weiblich). hellgrau hervorgehoben sind die beiden Linien, deren G₀ aufgrund der Segregationszahlen offensichtlich homozygot für pBA19 waren, da der Anteil der Käfer ohne Marker (ohne) weit unter 50% liegt.

Die hauptsächlich heterozygote Ausgangspopulation von pBA19 führt dazu, daß auch rein weißäugige Embryonen injiziert werden und erst a posteriori ausgeklammert wurden. Andererseits können Remobilisierungsereignisse in einer heterozygoten Ausgangssituation leichter detektiert werden, da diese nicht von einem zweiten Muskelenhancer-Allel auf dem homologen Chromosom überdeckt werden.

Von den 32 Marker tragenden G₀ hatten 9 auch Nachkommen mit auf die Augen beschränkter Fluoreszenz (28%). Bei zwei dieser 9 Linien war der injizierte Embryo (G₀) offenbar homozygot für das pBA19 Allel (#3 und 5). Das Auftreten von rein weißäugigen Käfern in #3 und 5 zeigt, daß das Element ausgeschnitten wurde und entweder verloren ging

oder auf ein anderes Chromosom gesprungen ist, also nicht nur lokal gesprungen ist. Außerdem läßt sich mit pBA19 homozygoten G_0 zeigen, daß ein Chromosom, aus dem der Marker springt, weitergegeben wird und nicht verloren geht. Außerdem bestätigt es den *cut and paste* Mechanismus ohne Replikation. Die geringe Anzahl dieser weißäugigen Käfer in den beiden Linien, und der nahezu 50% Anteil bei den übrigen Linien aus den heterozygoten G_0 deutet darauf, daß remobilisierte Transposons sehr effektiv wieder inserieren. Die Clustergrößen der aus heterozygoten G_0 hervorgehenden G_1 betragen 1 – 21% bei einem Durchschnitt von 8,2%.

Die molekulare Charakterisierung der remobilisierten Transposons durch Marcé Lorenzen im Labor Beeman ergab, daß alle 6 der untersuchten Linien neue, unterschiedliche Insertionen enthielten, aber nicht mehr die alte pBA19 Insertion. Jene befanden sich auf unterschiedlichen Chromosomen. Von der *Linkage Group* 3 (LG 3 pBA19) sprangen sie auf die LG A, LG C, LG 3 je einmal und auf die LG 7 dreimal. Auch für drei dieser remobilisierten Linien wurden die benachbarten Sequenzen ermittelt, die ebenfalls die exakten Transposonenden und das duplizierte TTAA enthielten. Für eine der Linien wurde eine Proteinsequenzhomologie in der Datenbank gefunden (Lorenzen et al., 2003).

1.3. Transformation von *T. castaneum* mit Minos

1.3.1. Einleitung

In Kooperation mit Tassos Pavlopoulos aus der Arbeitsgruppe Averof (Institute of Molecular Biology & Biotechnology, Heraklion, Griechenland) wurde ein weiteres Transposon, nämlich *Minos*, auf seine Verwendbarkeit in *Tribolium* getestet. *Minos* gehört zur *mariner/Tc1* Überfamilie mobiler Elemente und wurde aus *Drosophila hydei* isoliert (Franz and Savakis, 1991).

Minos wurde folgendermaßen beschrieben (Franz et al., 1994):

- Größe 1773 bp
- Es wird begrenzt durch die beiden inverted terminal repeats, die mit 100 bp ungewöhnlich lang sind. Sie haben keine Ähnlichkeit mit denen anderer *Tc1* Elemente, mit Ausnahme des Hexanukleotids CAG TGC, welches oft nahe des Endes der ITR zu finden ist.
- Die Transposase liegt in 2 ORF vor, die durch ein 60 bp Intron getrennt werden. Der kodierende Abschnitt weist eine hohe Ähnlichkeit zu den entsprechenden Proteinen anderer *Tc1* Elemente auf (*Tc1* und *Bari-1*).
- Der Aminoterminus hat ebenfalls eine schwache, aber signifikante Ähnlichkeit zur *paired box*, der DNA-Bindungsdomäne des *Drosophila paired* Genes.

- Im *D. hydei* Genom es natürlicherweise 5-30 Kopien, die je nach Stamm unterschiedlich lokalisiert sind. Es gibt Hinweise auf eine bestehende Fähigkeit zur Transposition, obwohl die Transposase mRNA nicht nachweisbar ist.
- *Minos* ist häufig in AT-reiche Sequenzabschnitte von *D. hydei* integriert. Ansonsten ist aber keine Sequenzpräferenz ersichtlich.

Für das Element wurde bereits bewiesen, daß es ohne wirtsspezifische Faktoren in einem breitem Spektrum verschiedener Organismen funktioniert. So wurde es erfolgreich zur Keimbahntransformation in zwei Fliegenspezies, *D. melanogaster* und *Ceratitis capitata*, (Loukeris et al., 1995a; Loukeris et al., 1995b) und schließlich auch bei der Malaria-übertragenden Mückenart *Anopheles stephensi* eingesetzt (Catteruccia et al., 2000). Die Transformationsraten bei diesen Spezies liegen, bei Verwendung des *Dm'hsp70* Promotors im Helperplasmid, zwischen 3,2% und 7,2% der fertilen G_0 (Tabelle 1.11). Des weiteren wurde mit Hilfe von Mobilitätsassays die Transpositionsfähigkeit in Zelllinien von *Aedes aegypti* und *Spodoptera frugiperda* (Klinakis et al., 2000a), sowie in Embryos des Seidenspinners *Bombyx mori* nachgewiesen (Shimizu et al., 2000) (siehe Anhang Tabelle A.2).

Auch außerhalb der Insekten konnte die Aktivität in verschiedenen Geweben lebender Mäuse (Zagoraiou et al., 2001) und Humanzelllinien (HeLa) gezeigt werden (Klinakis et al., 2000b). Zur Produktion der Transposase wurde der Maus CD2 Promotor bzw. der CMV Promotor und der EF1a Promotor des Menschen verwandt.

Autor	Helper	Konz.	Organismus	Rate	Linien	Marker	Konz.	Remob.
1)	pHSS6hsMi2	100ng/ μ l	<i>D. melanogaster</i>	6,1%	2/33	<i>Dm'white</i> ⁺	400ng/ μ l	-
	stabil: <i>Dm'hsp70</i>	-		3,2%	5/154	<i>Dm'white</i> ⁺	stabil	Exzision
2)	pHSS6hsMi2	100ng/ μ l	<i>Ceratitis capitata</i>	1,3%	5/390 §	<i>Dm'hsp70</i> - <i>Cc'white</i>	400ng/ μ l	-
3)	pHSS6hsILMi20	100ng/ μ l	<i>Anopheles stephensi</i>	7,2%	5/69	<i>Dm'Actin5</i> <i>c-EGFP</i>	400ng/ μ l	-
4)	stabil: CD2-ILMi CMV-ILMi	Tandem *	Maus Maus Zellen	0,6%	Soma -	Donor stabil	Tandem Tandem	Exzision
5)	EF1a-ILMi	*	HeLa Zellen (Mensch)	4%	-	G418		

Tab. 1.11 Daten zu den Keimbahntransformationen mit *Minos* in der Literatur.

Angegeben ist das verwendete Helperplasmid, dessen Konzentration, der Zielorganismus, der benutzte Marker und dessen Plasmidkonzentration. Dazwischen sind die erzielten Transformationsraten und die absoluten Zahlen aufgeführt. (*) DNA mittels Transfektion eingeführt. „stabil“: Linie mit genomisch integriertem Element. (§) 5 verschiedene Insertionen in 3 positiven Pools von Massenkreuzungen. „Remob.“: berichtete Art der Remobilisierung. 1) (Loukeris et al., 1995a), 2) (Loukeris et al., 1995b), 3) (Catteruccia et al., 2000), 4) (Zagoraiou et al., 2001), 5) (Klinakis et al., 2000b)

In allen Fällen inserierte *Minos* konventionsgemäß in ein TA Dinukleotid bei Verdopplung desselben. Anhand der umgebenden Sequenzen konnte keine weitere Sequenzspezifität ermittelt werden (Klinakis et al., 2000a; Loukeris et al., 1995a; Shimizu et al., 2000). Die Transposons verteilten sich jeweils auf verschiedene Chromosomen im Genom und liegen in der Regel einzeln vor, lediglich bei den Experimenten von Loukeris (Loukeris et al., 1995a) wurden auch Tandemanordnungen mit dazwischenliegenden Vektorsequenzen gefunden. Dies wurde jedoch von den Autoren mit einer der Transposition vorhergehenden homologen Rekombination zwischen den Donorplasmiden erklärt. Dadurch entstehen Plasmide mit 4 inverted repeats, aus denen ein großes Tandemtransposon herauspringen kann. Stabil in das Genom eingebaute Elemente konnten durch Zugabe von Transposasequellen sowohl in *D. melanogaster* remobilisiert (Loukeris et al., 1995a), als auch in der Maus mobilisiert und an anderer Position reintegriert werden (Zagoraiou et al., 2001).

Entsprechend dem Schema der *piggyBac* und *Hermes* Vektoren wurde im Labor von C. Savakis, Athen das Markerplasmid pMi[3xP3-EGFP] (Donorplasmid) konstruiert (siehe Material & Methoden). Als Transposasequelle in Form eines DNA Helperplasmids zur Koinjektion mit dem Donorplasmid stehen zwei Plasmide (pHSShsMi2 und pHSS6hsILMi20) zur Verfügung. Das Plasmid **pHSS6hsMi2** ist ein modifiziertes *Minos* Element, dessen linkes ITR durch den *D. melanogaster hsp70* Promoter ersetzt wurde und dadurch nicht mehr mobil ist. Es enthält also noch den ursprünglichen *Minos* Terminator und das 60 Basenpaare lange Intron, das den Leserahmen der *Minos* Transposase in zwei Exons teilt (Loukeris et al., 1995a). Das Plasmid **pHSS6hsILMi20** enthält dagegen nur den intronfreien Leserahmen, welcher zwischen den *Dm'hsp70* Promoter und den *Dm'hsp70* Terminator kloniert wurde, daher fehlen beide Transposonarme (Klinakis et al., 2000a). Die Effizienz dieser prozessierten Version im Vergleich zur Wildtyp-Sequenz wurde bei Mobilitäts Assays in Zelllinien von *Drosophila melanogaster* (S2), *Aedes aegypti* (MOS20) und *Spodoptera frugiperda* (SF9) getestet (Klinakis et al., 2000a). Nach Transfektion der Zellkulturen mit der jeweiligen Kombination an Plasmiden konnte für alle Arten die Transposition von *Minos* Elementen von einem Donorplasmid auf ein Zielplasmid nachgewiesen werden. Dabei waren die Helperplasmide in den Zellen von *Drosophila* und *Aedes* in etwa gleich effektiv, während in den Zellen des Schmetterlings nur das Konstrukt mit der durchgehenden kodierenden Sequenz zur Transposition führte. Übereinstimmend dazu führte in Embryonen des Seidenspinners nur der intronfreie Helper zum Erfolg, nicht aber der mit dem unterbrochenen Leserahmen (Shimizu et al., 2000) (siehe Anhang Tabelle A.2). Nachdem auch bei den Versuchen in Maus und der humanen Zelllinie der prozessierte Helper erfolgreich eingesetzt worden war, wurde für die Versuche im Käfer *Tribolium castaneum* ebenfalls das intronfreie Plasmid pHSS6hsILMi20 gewählt, um eventuelle taxonspezifische Unterschiede bei der Reifung der mRNA sicherheitshalber zu umgehen. Zur *in vitro* Erzeugung von *Minos*

Transposase Helper mRNA wurde das Transkriptionsplasmid **pBSSKMimRNA** konstruiert (siehe Material & Methoden). Damit sollte getestet werden, ob es, wie beim *P*-Element, möglich ist, die Effizienz der Transformation zu steigern. Außerdem ist diese Art des Versuchs unabhängig von der Aktivität des im Helperplasmid benutzten Promotors und kann daher in einem noch weiteren Artenspektrum angewandt werden.

1.3.2. Transformationseffizienz

Für die Injektionen wurde der Stamm *p² (Rd, mc, lod)* verwendet. Die Eiablagezeit betrug jeweils 3 h bei 24°C. Nachfolgend wurde bis zu 3 h aufgereiht und in Luft bei RT injiziert. Die weitere Entwicklung erfolgte bei 32°C. Die adulten G₀ Käfer wurden mit je 3 Käfern des Parentalstammes ausgekreuzt. Zur Herstellung translatierbarer mRNA wurde pBSSKMimRNA mit *Not* I linearisiert und *in vitro* mittels T7 Polymerase transkribiert (Ambion Kit mMessage mMachine®, Protokoll III). Die RNA wurde als Isopropanolpräzipitat bei -20°C aufbewahrt. Für jede Injektion wurde ein Aliquot entnommen, pelletiert, gewaschen, getrocknet und gelöst. Vor der Injektion in die Tribolieneier wurde ein Mix entsprechend den angegebenen Konzentrationen mit Millipore bzw. RNase freiem Wasser und 20% Phenolrotlösung vorbereitet. Dabei sind die Konzentrationen denen aus den *piggyBac* Experimenten angelehnt. Die Injektionen wurden von T. Pavlopoulos in unserem Labor durchgeführt. In mehreren Injektionsserien wurden folgende Ergebnisse erzielt:

	DNA			mRNA		
	gesamt	m	w	gesamt	m	w
Eier injiziert	ca. 600			ca. 600		
überlebende Käfer (G ₀)	171	78	93	217	98	112
fertile G ₀	167	77	90	214	104	110
transgene Linien	19 von 167	8	11	67 von 207*	36 von 97*	31
Transformationsrate	11,38%	10,39%	12,22%	32,37%	37,11%*	28,18%

Clustergröße: **						
Mittelwert	10,34%	12,42%	8,83%	15,18%	16,81%	13,28%
SD	9,07%			14,70%		
Minimum	1,42%	1,42%	2,41%	1,15%	1,15%	2,33%
Maximum	35,01%	35,01%	27,56%	95,96%	95,96%	40,765

Tabelle 1.12 *Minos* Transformationsexperiment. mit Helperplasmid pHSS6hsILMi20 (0,280 µg/µl) bzw. *Minos* mRNA (0,280 µg/µl) und Donorplasmid pMi[3xP3-EGFP] (0,500 µg/µl). Die überlebenden Käfer wurden einzeln mit dem Parentaltyp ausgekreuzt. (*) 7 „positive“ G₀ wurden wegen Kontaminationsverdacht beim Aussieben der Eier sicherheitshalber aus der Berechnung ausgeschlossen. (**) Clustergröße = Anteil transgener Nachkommen an der Gesamtzahl je Kreuzung (bzw. G₀). m (männlich), w (weiblich).

Mit dem DNA Helper konnte eine Transformationsrate von 11,4% festgestellt werden, die sich durch Verwendung von Transposase mRNA auf 32,4% fast verdreifachen ließ. Der Chi-Quadrat Test bewertet diesen Unterschied als hoch signifikant ($p < 0,001$). Die Clustergrößen verhalten sich ähnlich. Mit dem DNA Helper ergibt sich im Mittel ein Anteil von 10,3% (SD 9,1%), der mit mRNA auf 15,2% (SD 14,7%) gesteigert werden kann. Die Clustergrößen reichen mit dem DNA Helper von 1,4% bis 35,0% und mit der mRNA von 1,2% bis 96,0% (Tabelle 1.12). Die beiden Klassen unterscheiden sich dabei nur wenig in der Fertilität. In DNA Kreuzungen sind durchschnittlich 253,2 Käfer (m: 306,0; w: 214,8) und in RNA Kreuzungen 236,2 (m: 263,4; w: 204,7). Abbildung 1.13 zeigt die Häufigkeitsverteilung der Cluster. Die Häufigkeit nimmt mit zunehmender Clustergröße exponentialartig ab.

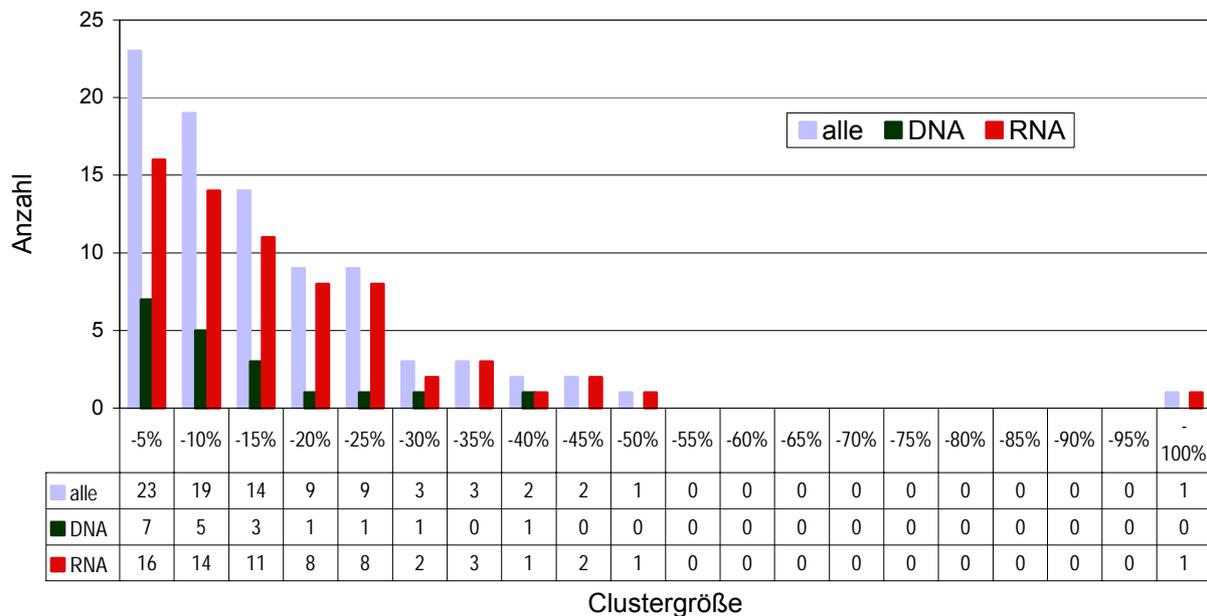


Abb. 1.13 Häufigkeitsverteilung der Clustergrößen mit DNA und RNA Helper. Die einzelnen Werte sind in Klassen von je 5% zusammengefaßt und die absoluten Zahlen darunter angegeben.

Auch bei *Minos* gibt es verschieden starke Ausprägungen des Markergens (Tab. 1.14). Wiederum ist die mit Abstand größte Kategorie diejenige mit der homogen starken Fluoreszenz in allen Ommatidien (v). Die Heterogenität der Augenphänotypen bei der mRNA vermittelten Transformation ist etwas größer als bei der mit dem DNA-Helper. Wie bei *piggyBac* deutet dies auf einen Zusammenhang von Insertionszahl und Augenphänotypen hin, bzw. daß größere Cluster aus mehreren Insertionen bestehen.

DNA				RNA				DNA + RNA
	♂ G ₀	♀ G ₀	gesamt		♂ G ₀	♀ G ₀	gesamt	
v,m,s	0	0	0		0	0	0	0
v,m	1	1	2		15	6	21	23
v,s	0	0	0		0	0	0	0
v	6	8	14		20	24	44	58
m,s	1	0	1		0	0	0	1
m	0	0	0		0	1	1	1
s	0	2	2		1	0	1	3

	Max	Min	Ø		Max	Min	Ø
v,m,s	-	-	-	v,m,s	-	-	-
v,m	35,01%	27,56%	31,29%	v,m	95,96%	2,51%	20,50%
v,s	-	-	-	v,s	-	-	-
v	20,20%	1,42%	8,63%	v	46,60%	1,15%	13,13%
m,s	4,59%	4,59%	4,59%	m,s	-	-	-
m	-	-	-	m	6,42%	6,42%	6,42%
s	6,06%	2,41%	4,24%	s	2,13%	2,13%	2,13%

Tab. 1.14 Anzahl und Verteilung der mit DNA oder RNA Helper erzeugten Linien auf die verschiedenen Augenphänotypkategorien und die dazugehörigen Clustergrößen (darunter). Aufgeschlüsselt nach weiblichen oder männlichen G₀ bzw. gesamt. Bewertung der Augenphänotypen: „v“ (voll) Fluoreszenz gleichmäßig im gesamten Auge; „m“ mosaikhaft; „s“ schwache Fluoreszenz in einem bis wenigen Ommatidien. Max, Min, Ø: maximale, minimale bzw. mittlere Clustergröße.

1.3.3. Stabilität und Molekulare Analyse der Transformationsereignisse im Genom

Bei keiner der 86 unabhängigen, transgenen Linien gab es bei Haltung (über mindestens 2-3 Generationen, teilweise 6-8 Generationen), Einzelkreuzungen oder Segregationsanalysen Hinweise auf instabile Integrationen oder gar episomale Weitergabe von Marker-DNA. Zur Bestätigung der Transformation wurden einige Linien ausführlich molekular untersucht (Southern Blots und die inverse PCR (iPCR) wurde von Tassos Pavlopoulos durchgeführt). Endogene Elemente konnten weder durch PCR mit minospezifischen Primern, noch mit spezifischen Sonden im Southern Blot festgestellt werden.

Sequenzierung der Integrationsstellen

Von drei Linien (einzelne G₁ Kreuzungen) wurde mittels iPCR die Integrationsstelle kloniert und sequenziert, um zu zeigen, daß die *Minos* Elemente entsprechend ihrer aus anderen Spezies bekannten Konvention in das Triboliumgenom eingebaut wurden. In allen Fällen begrenzt die TA Duplikation die Transposonenden links und rechts:

Linie		
3.2	TTGCATATAAGCAAATTTA	? (nicht amplifiziert)
4.2	TTTATTGGGTCCAATACTA	TATATTAGAAGAAAAGGA
6.1	ATATAAATAATCTTTAGTA	TACAATGTGTTTTTAAATG

Segregationsanalyse

In die Segregationsanalyse einbezogen wurden alle DNA Linien, sowie eine Auswahl von RNA Linien mit möglichst unterschiedlichen Clustergrößen. Aus den jeweiligen G_1 -Pools bzw. Linien grünäugiger Käfer wurden 1-4 Männchen zufallsmäßig entnommen und einzeln mit Weibchen des Parentaltyps (*pearl*) ausgekreuzt. Die Nachkommen wurden nach EGFP-positiven und EGFP-negativen Käfern ausgezählt. In den meisten Fällen (42 von 51) ergab sich ein Verhältnis von annähernd 1:1, was der Vererbung einer Insertion nach den Mendel'schen Regeln entspricht. Die jeweilige Verteilung wurde einem G-Test für eine, zwei oder 3 Insertionen unterzogen. Demnach wurde in den DNA Linien 15x eine Insertion, 1x wurden zwei Insertionen und 1x drei Insertionen weitergegeben. Für die RNA Linien ergab sich 27x eine einzelne Insertion, 5x zwei Insertionen und einmal 3 Insertionen (siehe Anhang Tabelle A.3).

Southern-Blot Analyse

Zur Validierung der Ergebnisse aus der G_1 Segregation und zum Test auf die Häufigkeit gekoppelter Insertionen, bzw. Tandemanordnungen, wurde genomische DNA der verschiedenen Linien gewonnen und in Southern Blots analysiert (siehe Material & Methoden; die Herstellung der Blots und die Hybridisierungen wurden von T. Pavlopoulos vorgenommen). Dazu wurden einerseits Pools von 10-12 G_1 Tieren entnommen, um die Gesamtzahl der Keimbahninsertionen in den Nachkommen eines G_0 zu ermitteln (G_0 Insertionen), andererseits wurden 12 Nachkommen eines G_1 Männchens verarbeitet, um die Art und Anzahl der integrierten Transposon je Gamet zu bestimmen (G_1 Insertionen). Dabei wurden möglichst unterschiedliche Augenphänotypen herausgesucht. Mit der DNA einzelner Käfer wurde vorher gezeigt, daß die Sensitivität der Bandenerkennung hoch genug ist, um Insertionen, die nur in einem Tier eines Pools auftreten, zu detektieren.

Tabelle 1.15 faßt die Ergebnisse der G_0 Pools, der G_1 Käfer und deren Markersegregation in den G_2 zusammen. In den 12 DNA G_0 Pools wurden 1 bis 3 verschiedene Insertionen gefunden (9x eine, 1x zwei, 2x drei). Das sind 1,4 Elemente pro Linie mit einer mittleren Clustergröße von 12,3% (durchschnittliche Anzahl der Nachkommen eines G_0 = 255). In den 24 RNA G_0 Pools befanden sich bis zu ca. 6 Insertionen (8x eine, 11x zwei, 4x drei, 1x mindestens vier bis sechs). Das ergibt 1,9 Elemente pro Linie mit einer mittleren Clustergröße von 22,3% (durchschnittliche Anzahl der Nachkommen eines G_0 = 248). In DNA Pools scheint die Größe der Cluster mit der Anzahl der Insertionen zusammenzuhängen, bei RNA hingegen ergibt sich eine sehr diffuse, breit gestreute Verteilung (Abb. 1.16). So kann man bei Verwendung von Helper mRNA mit einer einzigen Insertion eine Clustergröße von 1,5%, aber auch eine von 40,9% erzeugen. Andererseits

wurden in einem nur 3,2% großen RNA-Cluster drei verschiedene Insertionen gefunden. Die Clustergröße mit einer Insertion beim DNA Helper reicht nur von 1,4% bis 14,5%.

Die Nachkommen einzelner G_1 Käfer aus diesen Pools, die einen Gameten eines G_0 repräsentieren, bestätigen mit ihrem Bandenmuster die Segregationsanalyse, wonach die G_1 Käfer einer Linie sehr heterogen sein können. Es ergeben sich verschiedene Kombinationen von gemeinsamen und unterschiedlichen Insertionen, die aus verschiedenen Stammzellen oder aus verschiedenen meiotischen Verteilungen mehrerer Insertionen in einer Stammzelle resultieren können. Die maximale Anzahl von Elementen in einem G_1 war 3 mit dem DNA-Helper und 4-6 mit mRNA. Die meisten G_1 hatten jedoch nur eine Insertion (15 von insgesamt 24). Eine physikalische Kopplung, die durch die Diskrepanz der Ergebnisse der Segregation und der Southernanalyse zu Tage tritt, ist relativ selten. Bei den drei DNA-Linien mit multiplen Insertionen kommt ein gekoppeltes Element dazu (Linie C323), bei den untersuchten 7 RNA Linien mit mehreren Transposons erscheint zwei Mal ein weiteres Element (Linien F312 und H305) auf dem Blot. Es gibt also kaum auf einem Chromosom lokal gehäufte Ereignisse; die Integrationen sind in der Regel unabhängige und singuläre Vorgänge.

Illegitime Integrationen?

In 3 von 63 nachgewiesenen integrierten Elementen wurden im Southern Blot auch Plasmidsequenzen festgestellt. Diese traten immer im Zusammenhang mit multiplen, gekoppelten Insertionen auf (DNA Linie C323 und RNA Linien H305 und O04). Möglicherweise handelt es sich dabei um Kombinationen von Transposons, die zustande kommen, wenn ein Element zunächst in ein anderes Plasmid inseriert und dann in einem weiteren Schritt gemeinsam und mit dazwischen liegenden Plasmidsequenzen in das Genom integriert werden. Eine andere Möglichkeit besteht durch homologe Rekombination. In diesen Fällen würde es sich aber dennoch um korrekte Integrationsereignisse handeln, die Plasmidsequenzen mit sich tragen. Für *Hermes* wurden dagegen auch tatsächliche, nicht dem Typ II entsprechende, Falschinsertionen in *Aedes aegypti* beschrieben. In diesem Fall wird eine Interaktion mit anderen endogenen Transposasen oder mit der allgemeinen Rekombinationsmaschinerie der Zelle diskutiert, die zu Bruchpunkten im Plasmid führen (Jasinskiene et al., 2000). Für unsere Plasmidintegrationen liegen leider keine Sequenzinformationen vor.

DNA Linien						
#	Cluster- größe	G₀ Ins. Southern	Linie, G₁ X	G₁ Ins. Segregation	G₁ Ins. Southern	Art der Insertion
1	14,47%	1	A205,1	1		
2	1,42%	1	A308,1	1		
3	6,69%	1	B209,1	1		
4	20,20%	2	B315,1	1		
5	4,38%	1	C205,1	1		
6	4,59%	1	C206,1	1		gleiche Insertion
			C106,2	1		
7	12,58%	1	C207,1	1		
8	35,01%	3	C323,1	2	3	1 neu, 1 identisch mit ,2
			C323,2	1	2	2 gekoppelt (1x Plasmidseq.)
9	6,49%	1	I215,1	1		
10	27,56%	3	I224,1	3	3	
			I124,2	1		
			I124,3	1	1	
11	3,76%	1	K218,1	1		
12	10,87%	1	K224,1	1		

RNA Linien						
#	Clustergröße	G ₀ Ins. Southern	Linie, G ₁ X	G ₁ Ins. Segregation	G ₁ Ins. Southern	Art der Insertion
1	29,90%	1	D317,1	1	1	gleiche Insertion
			D317,2	1	1	
2	29,72%	2	E302,1	2	2	eine gemeinsame Insertion
			E302,2	1	1	
3	12,09%	1	E308,1	1	1	gleiche Insertion
			E308,2	1	1	
4	21,43%	2	E310,1	1	1	verschiedene Insertionen
			E310,2	1	1	
5	30,39%	2	E320,1	1	1	
6	40,91%	1	F305,1	1	1	gleiche Insertion
			F305,2	1	1	
7	95,96%	≥4	F312,1	3	4	2 gekoppelte gemeinsame Insertionen
			F312,2	1	2	
			F312,3	2	3	
			F312,4	1	1	
8	5,41%	2	G310,1	2	2	1 gemeinsame Insertion
			G310,2	1	1	
9	8,00%	2	G320,1	1	1	
10	46,60%	≥3	H305,1	1	1	2 gekoppelt (1x Plasmidseq.)
			H305,2	1	2	
11	1,82%	1	H12			
12	8,38%	2	N05			
13	4,30%	2	N14			
14	23,16%	1	O05			
15	22,34%	2	O24			
16	31,88%	2	P04			
17	4,12%	1	P07			
18	3,18%	3	D08			
19	35,27%	2	G05			
20	31,88%	3	O04			(1x Plasmidseq.)
21	4,10%	1	Q06			
22	40,76%	2	Q08			
23	2,53%	3	D16			
24	1,50%	1	D19			

Tab. 1.15 Anzahl der Insertionen pro Linie (G₀) und in einzelnen Gameten (G₁) für DNA und RNA Helper aufgrund von Southernanalyse und Segregation.

Clustergröße: Anteil transgener Nachkommen des G₀; G₀ Ins. Southern: Anzahl der Insertionen in der Keimbahn einer Linie (G₀) nach Bandenmuster auf dem Blot; Linie, G₁ X: Nummer der Linie und Auskreuzung eines männlichen G₁ mit dem Parentaltyp zur Segregation des Markers in G₂; G₁ Ins. Southern oder Segregation: Anzahl der Insertionen in einem G₁ Käfer (= ein Gamet) nach Segregation bzw. Bandenmuster auf dem Blot; gleich oder gemeinsame Ins.: identische Insertion in zwei verschiedenen G₁ Käfern einer Linie; Plasmidseq.: positives Hybridisierungssignal mit der Plasmidsequenz außerhalb des Transposons. Weitere Daten und Angaben hierzu befinden sich im Anhang Tabelle A.4.

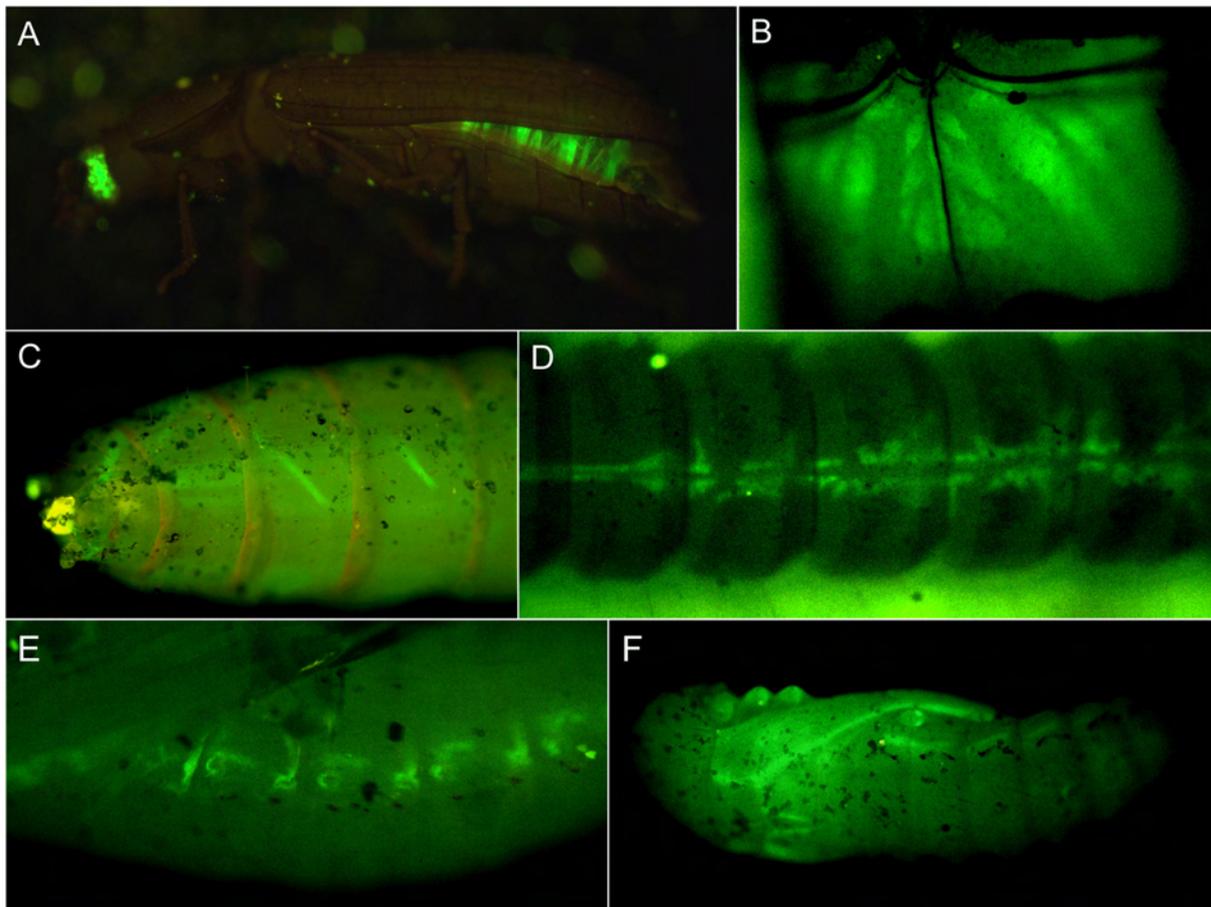


Abb. 1.17 *Minos* Linien mit zusätzlichen Expressionsdomänen.

A) Käfer von lateral mit GFP in dorso-ventralen Muskeln des Abdomens (Linie N22). B) Ventrale Ansicht fluoreszenz-gefärbter Muskelstrukturen im Thorax eines Käfers (ebenso in der Puppe; Linie D17). C) Linie (O05) mit ventro-lateralen, schrägen Streifen in der Larve (posteriorer Ausschnitt). D) Dorsales Muster entlang des Herzens einer Larve (mittlerer Ausschnitt; Linie G05). E) Laterale unregelmäßige Domäne, besonders um die Tracheenöffnungen bei Puppe (und Larve; mittlerer Ausschnitt; Linie D13). F) Linie (F23) mit starker Expression entlang der Hautfalten der pupalen Kutikula (dorso-laterale Ansicht).

1.4. Die Verwendung des 3xP3-EGFP Markers in wt Hintergrund

Einer der Hauptvorteile des 3xP3-Fluoreszenzmarkers ist, wie bereits beschrieben, seine universelle Einsetzbarkeit in verschiedensten Organismen. Dies bedeutet, daß man weder ein spezifisches Gen (z. B. für ein Augenpigment) klonieren muß, noch die zugehörige Mutante (z. B. *white* Mutante) isolieren muß. Um zu testen, ob die Fluoreszenz auch in pigmentierten Augen zu erkennen ist, d.h. ob damit Wildtypstämme generell zu benutzen sind, wurde eine der transgenen *Hermes* Linien mit Wildtyp Käfern (Stamm SB) ausgekreuzt. In den heterozygoten Nachkommen konnte der Marker in den verschiedenen Stadien gut erkannt werden (Abb. 1.18 A). In einem weiteren Kontrollversuch wurde das *piggyBac* basierte Markergen direkt in den wt SB Stamm injiziert. Die daraus hervorgehenden G₀ wurden einzeln rückgekreuzt und deren G₁ Nachkommen erfolgreich nach Transformanten durchsucht (Abb. 1.18 B-F). Die Transformationsrate betrug 17% (13 von 76 Linien). Die

Ergebnisse lassen sich aber nicht direkt mit den vorher beschriebenen Experimenten vergleichen, da die Injektionen von einer Praktikantin durchgeführt wurden.



Abb. 1.18 3xP3-EGFP Marker im wt-Hintergrund.

A) Heterozygoter SB/pearl pHer[3xP3-EGFP] Käfer (rechts) gegenüber einem SB Käfer ohne Marker. (B-F) aus Direktinjektionen in SB. Fluoreszenzsignal in der Puppe (B), in einem jungen Käfer (C), bei einem frisch geschlüpften Käfer (D) und in der Larve (E). In sehr vielen Linien ist in den Adulten zusätzlich zur Augenmarkierung lateral im hinteren Abdomen eine Linie zu sehen, die ebenfalls zur Identifizierung transgener Tiere benutzt werden kann (F).

Eine Einschränkung gibt es dennoch. Tribolien pigmentieren mit zunehmendem Alter stark nach, so daß der Fluoreszenzmarker in den Augen nur in den ersten Tagen gut sichtbar ist und dann immer mehr durch die Pigmente abgeschirmt wird. Schwache Augenphänotypen können dann nicht mehr erkannt werden, starke sind z.T. bei direktem, geradem Blick in das Ommatidium noch zu identifizieren. Dies ist auch abhängig vom Aufbau des Fluoreszenzbinokulars. Bei Anregung über einen der beiden optischen Strahlengänge ist die Fluoreszenz deutlicher zu sehen, als wenn über einen zusätzlichen dritten Kanal angeregt wird (z.B. das neue Leica Fluoreszenzstereomikroskop). Viele Arthropoden sind jedoch nicht so stark pigmentiert oder haben Ocelli, in denen der Marker gut zu sehen ist (Berghammer et

al., 1999b). Außerdem kann wegen der Expression im Nervensystem und im Larvalauge auch auf frühere Entwicklungsstadien (z.B. Larven, Puppen) ausgewichen werden, um transgene Tiere sicher zu erkennen.

1.5. Somatische- und Keimbahntransformation im Zebrafisch *Danio rerio*

Aufgrund der evolutionären Konservierung des Transkriptionsfaktors *Pax-6/eyeless* sollte der Universelle Marker auch außerhalb der Arthropoden, z.B. in Wirbeltieren funktionieren. In Vorversuchen im Labor von Dr. Laure Bally-Cuif, GSF München-Neuherberg, konnten erste erfolgversprechende Ergebnisse erzielt werden. Im Ein-Zellstadium mit pH[3xP3-EGFP] injizierte Embryonen von *D. rerio* zeigten als schlüpfende Fische eine transiente Expression in Zellen des Auges und des Nervensystems (Abb. 1.19).

Zur Keimbahntransformation stellte ich ein Plasmid für die *in vitro* Transkription der *Hermes* Transposase her (pBStIIISKHermes; siehe Material & Methoden). Dadurch wird der Einsatz des Systems bei Spezies möglich, in denen der *Drosophila hsp* Promotor nicht oder nur wenig aktiv ist. Die *Hermes* mRNA wurde zusammen mit pH[3xP3-EGFP] während des Ein-Zellstadien injiziert. Ein Großteil der Fischembryonen entwickelte sich allerdings nicht weiter. Das Projekt wurde dann nicht weiter verfolgt, da es für mich zu aufwendig gewesen wäre, die optimale Dosis der mRNA für die Fische zu ermitteln.

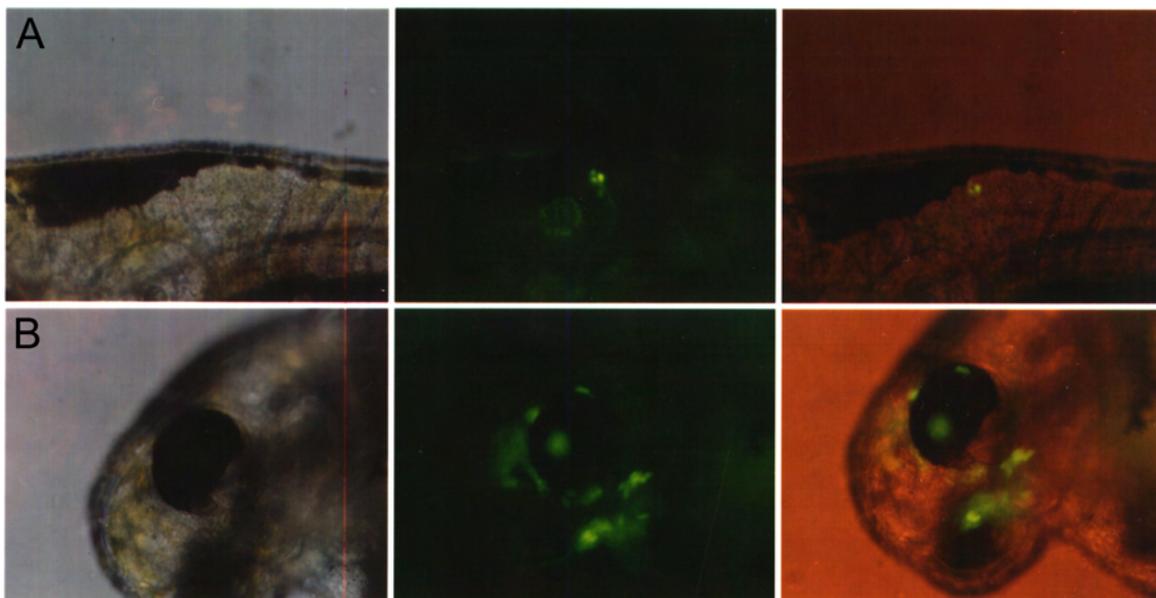


Abb. 1.19 Transiente 3xP3 Markerexpression in *Danio rerio* (72 h nach Eiablage). A) Fluoreszenz in einigen Zellen des Hinterhirns. B) Expression in Zellen des Auges und in der Umgebung des Auges (Kopfausschnitt). Die erste Spalte enthält die Durchlichtaufnahmen, die zweite die Fluoreszenzbilder und in der dritten sind beide überlagert dargestellt

1.6. Diskussion

Die hohen Erwartungen, die sich mit der Entdeckung des *P*-Element Systems und der nachfolgenden Umsetzung in einen DNA Vektor ergeben haben (Rubin and Spradling, 1982; Rubin and Spradling, 1983), haben sich nun endlich, ca. 20 Jahre später, mit anderen transposablen Elementen erfüllt. Nachdem *P* und *hobo* nur in Drosophiliden verwendet werden konnten (O'Brochta and Handler, 1988; O'Brochta et al., 1994), wurden in den weiteren Jahren viele neue, speziesunabhängige Transposons entdeckt, neue Transformationsmarker entwickelt und getestet und alle relevanten Methoden verbessert.

Mit dem hier vorgestellten universellen Marker wurde ein großer Schritt in Richtung genetischer Manipulation beliebiger Organismen getan, mit besonderem Nutzen für evolutionär-vergleichende entwicklungsbiologische Forschung. Speziesunabhängig können damit leicht und schnell transgene Tiere erzeugt werden. Neben der hier beschriebenen ersten Keimbahntransformation eines Käfers wurden in der Zwischenzeit in anderen Labors auch eine Vielzahl von Arten aus den Ordnungen Diptera und Lepidoptera mit diesem Marker genetisch verändert. Dazu gehören auch die Ersttransformationen von *Musca domestica* und *Anopheles stephensi*. Damit sind die Voraussetzungen für biotechnologische Schädlingsbekämpfung und die Abwehr von Krankheitsüberträgern gegeben (Handler, 2001). Ein Erfolg in Crustaceen wird demnächst erwartet, und selbst außerhalb der Arthropoden wurde der Marker inzwischen in Planarien erfolgreich eingesetzt, wo er ebenfalls in den Augen exprimiert wird (Emili Saló, Barcelona, pers. Mitteilung). Er hat damit sein Potenzial bewiesen, in allen augentragenden Organismen gleichermaßen zu funktionieren. Dieser Marker wurde in *Tribolium* in Kombination mit Vertretern dreier verschiedener Familien von Transposons auf Verwendbarkeit, Effizienz und molekulares Verhalten getestet. Sowohl mit *Hermes* (*hAT* Familie), als auch mit *piggyBac* (*TTAA* Familie) und *Minos* (*mariner/Tc* Familie) konnten transgene Käfer erzeugt werden.

Die **Transformationsraten** im Reismehlkäfer mit dem minimalen Transposon-Marker Konstrukt ohne zusätzliche DNA, sind relativ hoch: mit *Minos* 11,4%, mit *piggyBac* sogar 56%, nur *Hermes* transponiert wenig mit ca. 1,4%. Für *Minos* wurden in *Drosophila* vergleichbare 6,1% (Loukeris et al., 1995a) und in *Anopheles stephensi* 7,2% (Catteruccia et al., 2000) erreicht. Während die Werte mit *piggyBac* die höchsten in der Literatur berichteten sind (in *D. melanogaster* 35% (Berghammer et al., 1999b)), fällt *Hermes* im Vergleich zu entsprechenden Versuchen in *Drosophila* (34,6% bzw. ca. 50% (Berghammer et al., 1999b; O'Brochta et al., 1996)) stark ab. Durch die Verwendung von Transposase mRNA konnte bei *Minos* die Rate auf 32,4% gesteigert werden. Dies wurde inzwischen parallel auch für *D. melanogaster* und *C. capitata* gezeigt (Kapetanaki et al., 2002). Die Transformationsraten konnten von ca. 2% bzw. ca. 3,5% auf 23% bzw. 7% gesteigert werden. Für *Hermes* wurde

ebenfalls ein Plasmid für die *in vitro* Transkription der Transposase hergestellt, mit dem vielleicht gleichermaßen die Effizienz verbessert werden kann (pBStII SKHermes; siehe Material & Methoden). Zusätzlich kann mit der Direktinjektion von mRNA die Anwendung auf Arten ausgeweitet werden, in denen der *Dm'hsp* Promotor nicht oder nur schlecht funktioniert. Die *Hermes*-Linien, die in der Haltung ebenfalls stabil erschienen, wurden nicht weiter untersucht. Für *piggyBac* und *Minos* konnte durch Southernanalyse und Sequenzierung gezeigt werden, daß die Insertionen konventionsgemäß und helperabhängig in das Genom integriert wurden.

Die **Clustergröße**, das heißt der prozentuale Anteil transgener Nachkommen, korreliert mit der Transformationsrate. Demnach erreicht *piggyBac* im Durchschnitt Werte von 29,8%, *Minos* 10,3% für DNA und 15,2% für mRNA und *Hermes* 7,0% (Angaben jeweils für das Minimaltransposon mit dem Marker).

In den meisten Fällen, vor allem mit den größeren Konstrukten, enthalten die Linien nur eine Insertion. In den Clustern mit mehreren Insertionen segregieren diese in der Regel unabhängig voneinander: „hot spots“ sind nicht zu erkennen und Kopplung ist selten. Die G_1 Tiere eines solchen Clusters sind sehr heterogen mit unterschiedlichen Kombinationen von Insertionen. Die maximale Anzahl von Insertionen in einem Cluster bzw. G_0 ist, im Vergleich zu den relativ hohen Transformationsraten und Clustergrößen, relativ niedrig und beträgt ca. 4 Elemente bei *piggyBac* und bei *Minos* bis zu 3 Elemente mit dem DNA Helper und 4-6 Elemente mit der mRNA. In einem einzelnen G_1 -Tier bzw. Gameten wurden bei *Minos* bis zu 3 mit dem DNA-Helper und bis zu 4 mit mRNA-Helper gefunden. Die relative Größe des Clusters nimmt im Durchschnitt mit der Anzahl der Insertionen zu. Eine Ausnahme bildet die *Minos* mRNA Injektion, wo dieser Zusammenhang nicht gegeben ist. So war in einem Fall ein Cluster mit mindestens 3 Insertionen nur 3,2% groß, während in einem anderen Fall eine einzelne Insertion 40,9% der Nachkommen ausmachen konnte. Die Gesamtzahl der Nachkommen war dabei ähnlich groß mit insgesamt 292 bzw. 372 Käfern. Der Unterschied kann also nicht mit der Zerstörung von Keimzellen etwa bei der Injektion erklärt werden. Dieses unterschiedliche Verhalten könnte mit dem Zeitpunkt des Transpositionereignisses zusammenhängen. Die Helper-mRNA sollte, im Gegensatz zum DNA-Helper, schneller zur Produktion von Transposase führen, also früh nach der Injektion in einer Phase mit noch wenigen Zellkernen. Ein einzelnes Insertionsereignis würde so zu einem Klon von Kernen/Zellen führen, der auch Vorläufer für die Keimbahn enthalten kann. Je nach Bestimmung des getroffenen Kern, würde zufallsabhängig die gleiche Insertion am Ende dann in wenigen oder vielen der Keimbahnstammzelllinien vorhanden sein. Im Gegensatz dazu würde die Helper-DNA erst wirksam werden, wenn sie in einen Zellkern transportiert und dort transkribiert wurde. Die Transposase dürfte daher im Schnitt später zur Verfügung

stehen, so daß keine größeren Klone mehr entstehen können. Jede Insertion in Keimbahnstammzellen würde dann einen kleineren prozentualen Beitrag zur Nachkommenschaft leisten.

Verschiedene integrierte Transposons können sich in der Stärke und der Art der Fluoreszenz im Auge unterscheiden, wie dies auch für *white*⁺ in *Drosophila* bekannt ist (O'Brochta et al., 1996). Dies ist vermutlich auf den Einfluß der chromosomalen Umgebung zurückzuführen. Diese Augenphänotypen sind infolgedessen weniger variabel in Gelegen von G₀, die mit Konstrukten längerer Fremd-DNA injiziert wurden, da es hier weniger Insertionen gibt. Die Analyse der Drosophilatransformation mit beiden Markern 3xP3-EGFP und *white*⁺ zeigte dabei, daß der Fluoreszenzmarker sensitiver ist und bis zu 20% mehr transgene Linien anzeigt als das Augenpigmentgen *Dm'white*.

Rückschluß auf die Anzahl der Keimbahnstammzellen in *Tribolium*

Der Durchschnitt der geringsten Clustergrößen beträgt bei den verschiedenen *piggyBac* Transformationen 0,92%. Bei *Minos* liegen diese Werte ähnlich: Männchen 1,42% (DNA) und 1,15% (RNA) und Weibchen 2,41% (DNA) und 2,33% (RNA). Wenn im adulten Käfer nur eine diploide Keimbahnzelle ein Transposon trägt und dieses während der Meiose auf jeden zweiten Gameten überträgt, dann kommt man mit einer sehr einfachen Abschätzung auf ca. 50 Keimbahnstammzellen in Männchen und auf ca. 25 Keimbahnstammzellen in Weibchen.

Fremd-DNA Kapazität von *piggyBac*

In dieser Arbeit wurde nur für *piggyBac* gezeigt, daß das Element in der Lage ist, Fremd-DNA mindestens bis zu einer Länge von 9,5 kb (Gesamtlänge 12,4 kb) effektiv zu transferieren (21,8%). Die Werte für die verschieden langen Konstrukte legen eine deutliche Größenabhängigkeit nahe. Spradling (Roberts, 1986) faßt die Daten von 25 verschieden langen P-Transposons mit dem *rosy* Marker zusammen und folgert ebenfalls eine Abnahme der Effizienz mit der Größe. Während 8 kb noch mit 30-60% übertragen werden, sinkt die Rate bei 18 kb schon auf 5-14%. Als Maximalgröße werden 40 kb mit einer Rate von 1-2% angegeben. Während die maximale Kapazität für das *piggyBac*-Element erst noch ermittelt werden muß, transponiert es im Bereich bis 12 kb also, im Vergleich zu diesen Angaben, mindestens genauso gut oder sogar noch besser in *Tribolium* als *P* in *Drosophila*. Damit können sowohl größere regulatorische Abschnitte untersucht werden, als auch aufwendig verschachtelte Transposons konstruiert werden, die Bestandteile für mehrere Anwendungen gleichzeitig tragen, z.B. für eine Insertionsmutagenese mit *enhancer* Detektion, einem Reporter gen und einem zweiten Transposon zur Remobilisierung.

Insertionsorte

Für *piggyBac* wurde gezeigt, daß die Insertionen im ganzen Genom verteilt sind und auch in kodierenden Sequenzen vorkommen (bei 4 von 13 sequenzierten Insertionsorten). Die Analyse eines pB-Mutatorelements in *Drosophila* ergab für 18 gefundene lethale und semilethale Insertionen, daß 4 in einem Exon lagen, 7 in einem Intron und je eines in einem 5'UTR, einem EST oder im Anschluß an ein Gen (Horn et al., 2003). *Minos* scheint ähnlich weit über die verschiedenen Chromosomen verteilt zu sein, da in Linien mit mehreren Elementen diese meist unabhängig segregieren.

Enhancer-trap Effekte

Das zahlreiche Auftreten von *Enhancer-trap* Mustern des Markergens zeigt, daß Gene auf dem Transposon für regulatorische Einflüsse zugänglich sind. In mindestens 10% der primären *piggyBac* und *Minos* Linien sind zusätzliche Expressionsdomänen zu sehen. Ein speziell dafür konzipiertes Reporterkonstrukt mit einem basalen Promotor, nahe der Transposonenden, sollte daher noch besser funktionieren. Die in einem Pilotscreen bei *Drosophila* verwendeten Mutatorelemente enthalten zusätzlich einen direkten *enhancer*-Reporter oder einen *enhancer*-getriebenen GAL4 Δ Transaktivator. Damit konnten in ca. 50% der neuen Linien *enhancer* gefunden werden (Horn et al., 2003).

Auffällig ist allerdings, daß viele der identifizierten *enhancer* die Muskulatur oder das Nervensystem betreffen. Diese treten mit verschiedenen Transposons auf, beruhen also nicht auf einer Insertionspräferenz der Elemente. Die klar unterscheidbaren Muskelgruppen, sowie das Remobilisierungsexperiment sprechen gegen die Möglichkeit, daß es sich nur um allgemeine *Enhancer* handelt, die sonst nicht zu erkennende Muster sichtbar machen. Die in der Datenbank gefundenen Gene sind keine muskel- oder nervenrelevante Gene. Die Erklärung ist vermutlich, daß das 3xP3 Markergen für muskel- und nervenspezifische Einflüsse besonders sensibel ist.

Remobilisierung

Es ist möglich, das *piggyBac* Element in *Tribolium* mit einer Rate von 28,1% wieder zu mobilisieren und an anderer Stelle integrieren zu lassen. Die Kartierung derartiger neuer Insertionen zeigt, daß diese in der Regel nicht lokal in die Nähe des Primärlocus springen, sondern auf andere Chromosomen übergehen können. Sequenzdaten unserer pB Insertionen und in (Horn et al., 2003) belegen, daß eine Insertionsmutagenese möglich ist und dabei auch Loci getroffen werden, die in *Drosophila* bisher nicht von P-Elementen abgedeckt waren. Eine Besonderheit von *piggyBac* bei Remobilisierungen ist, daß es als einziges von den Typ II Elementen keine Spuren hinterläßt und somit durch Insertionen verursachte Mutationen rückgängig gemacht werden können. Die Duplikation der TTAA Zielsequenz wird wieder entfernt (Fraser et al., 1996). Somit kann leicht getestet werden, ob

eine Mutation tatsächlich durch das Transposon oder durch etwas Anderes verursacht wurde. Vor allem aber sollte die relativ hohe Remobilisierungsfrequenz von *piggyBac* eine Insertionsmutagenese möglich machen.

Auswahl der Transposons

Für eine gezielte Auswahl von Transposons entsprechend der unterschiedlichen Anwendungsmöglichkeiten fehlen bisher noch ausreichende Daten. Molekulare Analysen einer großen Anzahl von integrierten Elementen werden das Verhalten und die Vor- und Nachteile der einzelnen Transposons aufdecken müssen. Bei der Auswahl der Transposons für ein bestimmtes Projekt oder einen Zielorganismus ist auch deren phylogenetische Verbreitung und die Möglichkeit der Kreuzmobilisierung mit verwandten Elementen von Bedeutung. So kann das *hobo* Transposon *Hermes* kreuzmobilisieren, aber nur in geringem Maße umgekehrt mobilisiert werden, da die *Hermes* Transposase an den Armenenden eine längere spezifische Sequenz verlangt. *hobo*-ähnliche Elemente sind in Tieren, Pflanzen und Pilzen relativ weit verbreitet (Sundararajan et al., 1999) Mariner-ähnliche Transposons (*Minos*) sind ebenfalls in vielen Insektenarten und außerhalb dieser vorhanden. Da die meisten aber inaktiv sind, stellen sie eher selten ein Problem für die Erzeugung stabiler Linien dar, können aber die Analysen erschweren. *piggyBac* gehört zur kleinsten und heterogensten Familie. Nahe verwandte Elemente wurden in einem weiteren Schmetterling, *Spodoptera frugiperda* (Handler, 2002), aber überraschenderweise auch in der Diptere *Bactrocera dorsalis* und deren Schwesterarten gefunden (Handler and McCombs, 2000). Die meisten sind jedoch inaktiv. Bei *piggyBac* scheint demnach die Gefahr für Konflikte mit endogenen Transposons relativ gering zu sein.

Anwendungen des Systems

Für die molekularbiologische Verwendung stehen mehrere unterschiedliche Transposons mit den verschiedenen Farbvarianten fluoreszierender Proteine zur Verfügung und können in Kombination eingesetzt werden. Das im Käfer relativ schlecht zu erkennende ECFP Markerkonstrukt wurde mittlerweile durch eines mit Ds-Red ersetzt (Horn et al., 2002).

Aufgrund der einfachen und effektiven Nutzung im ganzen Genom, ist das Markergen geeignet für die verschiedensten Anwendungen in der funktionellen Genomik. Im Rahmen der **Grundlagenforschung** gehört dazu die Suche nach stadienspezifischen oder gewebsspezifischen Promotoren, vor allem in Nicht-Modellorganismen, mittels *enhancer-trap*. Desweiteren besteht damit die Möglichkeit, regulatorische Sequenzen evolutionär vergleichend zu untersuchen oder Insertionsmutagenesen zur funktionellen Analyse neuer Gene und weiterer Genome durchzuführen. Durch die Zufuhr von Fremd-DNA können verschiedene Gene mit *heat-shock* oder binären Systemen wie Gal4/UAS oder tTA/TRE kontrolliert mißexprimiert werden. Wenn die Sequenz eines Gens bekannt ist, aber Mutanten

dazu fehlen, kann über homologe Rekombination versucht werden, das Gen an dessen Locus zu mutieren oder zu deletieren, um dessen Funktion zu untersuchen (*reverse genetics*). Für eine diesbezügliche Methode von Rong und Golic (Rong and Golic, 2000) werden Transposons benötigt, über die eine induzierbare sequenz-spezifische Rekombinase, eine Endonuklease (I-Sce I aus Hefe) und ein Konstrukt mit Sequenzen des Zielgens eingebracht werden müssen. In einigen Fällen kann die Integration eines Transposons in oder nahe dem endogenen Gen aber auch durch den sogenannten *Homing Effekt* erreicht werden. Dabei führt die Sequenzübereinstimmung zwischen dem Vektor und dem wt-Gen zu einer signifikanten lokalen „Anziehung“ und bevorzugten Insertion (Hama et al., 1990).

Anwendungen zur Bekämpfung von Krankheitsvektoren und Schadinsekten

Die aus Mutagenesen und Enhancer-Screens hervorgegangenen Ergebnisse können in Strategien zur Verhinderung der Übertragung von Malaria, Dengue-Fieber, Gelbfieber oder anderen Krankheiten umgesetzt werden. Dabei soll der Transmitter, z.B. die Aedes- oder Anophelesmücke selbst so verändert werden, daß der Krankheitserreger sich nicht mehr vermehren kann oder nicht mehr weitergegeben werden kann. Eine der in der Landwirtschaft am häufigsten genutzten Methode nicht-chemischer Art zur Verminderung von Ernteverlusten ist die *sterile insect technique* (SIT). Dabei werden die Schädlinge (z.B. *Ceratitis capitata*) mit hohem Aufwand massenhaft gezüchtet und, nach Sterilisierung mit radioaktiver Strahlung, freigesetzt. Im Freiland verpaaren sich die sterilen Männchen dann mit den wildlebenden Weibchen und verhindern eine Nachkommenschaft. Die Kosten/Nutzenrelation kann erheblich verbessert werden, wenn mit geschlechtsspezifischer Genexpression nur noch Männchen aufgezogen werden müssen, die durch embryonal wirksame Lethalitätsgene Nachkommen verhindern. Ein weiterer Vorteil ist, daß selbst sterile Weibchen durch das Anstechen von Früchten einen gewissen Schaden verursachen können.

Notwendigkeit einer Risikoabschätzung

Machbare Technik begründet in keiner Weise deren tatsächliche Anwendung. Neue Technologien, die das Potential haben, Natur und Umwelt nachhaltig zu verändern, müssen erst auf ihre Sicherheit und Beherrschbarkeit untersucht werden. Dazu gehört, das Verhalten von genetisch veränderten Organismen in der Umwelt zu erforschen und unerwünschte oder nicht berücksichtigte Nebeneffekte, die zur unkontrollierten Ausbreitung oder zur Verdrängung anderer Arten führen, frühzeitig zu erkennen. Im Besonderen sollten auf diese Weise keine Resistenzgene verbreitet werden. Die Markierung von transgenen Tieren mit Fluoreszenzproteinen wird dabei immer wieder als geeignete und relativ risikolose Maßnahme hervorgehoben.

2. Anwendung des Transformationssystems zur Analyse maternalen Musterbildung

Eine der zentralen Fragen in der vergleichenden Entwicklungsbiologie, wie bereits in der Einleitung dargelegt, ist ob das hierarchische Segmentierungsnetzwerk, das aus *Drosophila* bekannt ist, auch in allen anderen Arthropoden vorhanden ist. Experimente mit transgenen Tieren aus verschiedenen Spezies waren bisher nicht möglich; daher gibt es nur indirekte Befunde durch die Klonierung homologer Gene und die Analyse derer Expression. Dabei besonders interessant ist das maternale System, das am Anfang die Segmentierungskaskade in Gang setzt, indem es bereits bei der Eireifung die Koordinaten für die Hauptkörperachsen setzt. Dies wird durch lokalisierte mRNAs und lokale Translationshemmung erreicht. Die Hauptfaktoren sind Bicoid (BCD), Nanos (NOS) und Caudal (CAD), sowie das terminale System mit Torso (Abb. 2.1).

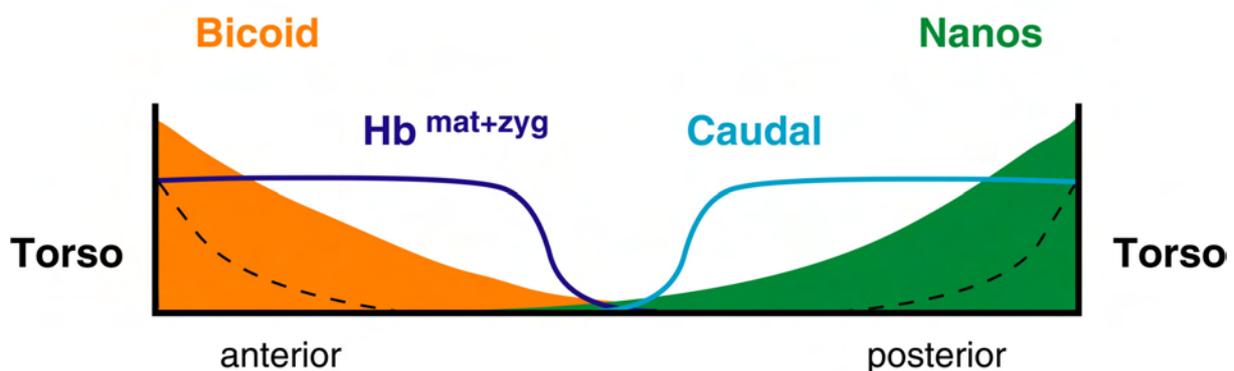


Abb. 2.1 Proteingradienten der maternalen Gene *bicoid*, *nanos*, *caudal* und *torso*. Hb^{mat+zyg} zeigt die Hunchbackverteilung durch maternale und zygotische Expression.

In *Drosophila* bestimmt das Gen *bicoid* (*bcd*) die Musterbildung in der anterioren Hälfte des Embryos. Dessen mRNA wird maternal in den Nährzellen exprimiert, in die Eizelle eingeschleust und dort über ein spezifisches Signal im 3'UTR der mRNA am anterioren Pol lokalisiert. Während der ersten 13 Kernteilungen im Synzytium entsteht durch Diffusion ein Proteingradient, der die verschiedenen Positionen des Blastoderm-Anlagenplans festlegt und damit maßgeblich die Segmentierung bestimmt. Das BCD-Protein hat eine Homöobox-DNA-Bindungsdomäne und wirkt als Transkriptionsfaktor, aber auch als Translationsrepressor. Seit seiner Entdeckung in *Drosophila* wurde vielfach versucht, dieses Gen auch in anderen Insekten zu finden. Trotz der Erfolge mit anderen Segmentierungsfaktoren, gelang es aber nur in wenigen sehr nahe verwandten Dipterenarten *bicoid* zu identifizieren. Daher wurde vermutet, daß es entweder zu schnell evolviert, um es mit redundanter PCR oder Hybridisierungen zu bekommen, oder aber eine „Neuerfindung“ der höheren Fliegen ist. Sein Hauptzielgen ist *hunchback*, dessen zygotische Aktivierung durch *bcd* vermittelt wird.

(Zusammenfassung in (St Johnston and Nusslein-Volhard, 1992) oder (Rivera-Pomar and Jackle, 1996))

Das *Drosophila* Gen *hunchback* ist ein Transkriptionsfaktor mit Zinkfingermotiv und nimmt eine Schlüsselrolle in der Segmentierungskaskade ein, indem es als eines der ersten Gene die maternale Information in zygotische Funktion umsetzt. Es bildet einen frühen morphogenetischen Gradienten und ist für die Regulation der abdominalen Lückengene verantwortlich. Seine mRNA ist bereits maternal exprimiert und homogen im Ei verteilt, unterliegt zunächst der Translationsrepression durch den posterioren maternalen Faktor *nanos*. Zusammen mit der zygotischen Expression führt dies zu einer starken mRNA- und Proteinexpression in der anterioren Hälfte des Blastoderms mit einem sich anschließenden Gradienten (Abb. 2.1). Später tritt eine weitere Expressionsdomäne am hinteren Pol des Eis auf (ca. Parasegmente 12-14), die durch die terminalen Lückengene *tailless* und *huckebein* erzeugt wird (Tautz et al., 1987). Christian Wolff hatte ca. 7,5 kb der genomische Region des *Tc'hb* Genes kloniert und sequenziert. Davon liegen 5,2 kb oberhalb des Startkodons (Wolff et al., 1995). Die vergleichende Expressionsanalyse dieses Gens zwischen *Tribolium* und *Drosophila* zeigt eine große Übereinstimmung trotz der unterschiedlichen Keimtypen. Im Käfer gibt es ebenfalls zuerst eine homogene Verteilung maternaler mRNA mit posteriorer Translationskontrolle. Im 3'UTR von *Tc'hb* ist in Übereinstimmung dazu ein putatives Nanos-Response-Element vorhanden. Zygotisch entsteht zunächst ein Streifen im Kopf-/Thoraxbereich und später eine weitere Domäne im posterioren Abdomen des ausgewachsenen Keimstreifs. Neu ist allerdings eine Expression in der Serosa, also dem nicht-embryonalen Gewebe, welches in *Drosophila* nicht vorhanden ist. Die Transkriptanalyse ergab 3 Promotoren: P1 und P3 sind hauptsächlich maternal, während P2 zygotisch aktiv ist (Wolff et al., 1995). In der Fliege gibt es nur 2 Promotoren: P1 maternal und zygotisch, und P2 früh zygotisch aktiv. Aus der Übereinstimmung des Musters ließe sich also folgern, daß vermutlich auch die Funktion des Gens in beiden Organismen, trotz der unterschiedlichen Keimtypen, annähernd gleich ist.

Zur weiteren Analyse wurde der *Tc'hb* Promotor zerlegt und in *Drosophila* wt und Mutanten analysiert (Wolff et al., 1998). Die Expressionsdomänen des Vollkonstruktes *Tc'hb* 5,2 kb in *Drosophila* entsprechen überraschenderweise denen im Käfer. Es gibt eine anteriore und eine posteriore Domäne im Blastoderm. Die anteriore wird durch Dm'BCD aktiviert. Im Promotorbereich von *Tc'hb* lassen sich dazu, ähnlich wie in *hunchback* von *Musca domestica* (Bonneton et al., 1997), mehrere *bcd* consensus Bindestellen finden, die auf ein BCD Homolog oder einen BCD-ähnlichen Faktor im Käfer hinweisen. In derselben Arbeit wird auch das *Tribolium* Homolog des *Drosophila caudal* Gens in *Drosophila* exprimiert. Dies ist ein weiteres maternales Gen, das einen zu *bcd* gegenläufigen, posterioren Gradienten

bildet und abdominale Gene aktiviert (Abb. 2.1). Dieser Gradient entsteht durch Translationshemmung, die durch eine Bindung von Bicoid an das 3' Ende von *Dm'caudal* mRNA verursacht wird. Genau das Gleiche passiert auch mit *Tc'cad* im Fliegenembryo. Diese Translationshemmung konnte auch in nicht fertilisierten Fliegeneiern gezeigt werden, in denen keine zygotischen Signale vorhanden sind, was wiederum auf eine direkte BCD Funktion hinweist. Die Schlußfolgerung aus diesen Ergebnissen ist, daß es in *Tribolium* eine Reihe starker Hinweise auf ein maternales System ähnlich dem in *Drosophila* gibt, in dem es einen anterioren *bcd*-ähnlichen Faktor gibt, der in *Tribolium* das *hunchback*-Gen aktiviert und *Tc'caudal* postranskriptionell reguliert. Daher wollten wir mit verschiedenen Konstrukten versuchen im Käfer dieses System nachzuweisen:

(1) Nachweis der BCD Funktion als Transkriptionsaktivator (2.1)

Ähnlich den Versuchen mit den Käfergenen in der Fliege, sollte der BCD-ähnliche Faktor mit einem Reporter gen mit spezifischen *bcd*-abhängigen Promotor in *Tribolium* selbst nachgewiesen werden.

(2) Konservierung der *Drosophila* Lokalisierungssignale in *Tribolium* (2.2)

Um antero-posteriore Positionsinformationen zu speichern und während der Embryogenese wiedergeben zu können, werden viele maternale Signale während der Oogenese mittels spezifischer Strukturen in der 3'UTR der mRNAs im Ei lokalisiert. Durch Einbringen der entsprechenden Sequenzen von *Dm'bicoid* und *Dm'oskar* sollte getestet werden, ob dieser Mechanismus in *Tribolium* konserviert ist.

(3) Verhalten der *hb-lacZ* Konstrukte in *Tribolium* (2.3)

Die in *Drosophila* untersuchten Promotorkonstrukte (Wolff et al., 1998) sollten mit Hilfe des neuen Transformationssystems auch in *Tribolium* selbst genauer analysiert werden.

2.1. Anteriorer BCD-Protein Gradient

Entsprechend dem Nachweis der Aktivierung der anterioren Domäne von *Tc'hb* durch Bicoid in *Drosophila* (Wolff et al., 1998), sollte umgekehrt in einem funktionellen Ansatz untersucht werden, ob ein Protein im frühen Käferembryo existiert, welches eine konservierte Bindungsdomäne für *bcd*-Bindungsstellen enthält und damit als Transkriptionsaktivator für die anteriore *Tc'hb*-Domäne wirkt. Dies könnte entweder ein *bicoid*-Homolog sein, das sich auf Sequenzebene so weit verändert hat, daß es bisher nicht gefunden werden konnte, oder aber ein anderes Gen, das womöglich eine dem *Drosophila bcd*-entsprechende Funktion erfüllt. Als geeignet dafür erschien ein Minimalkonstrukt von W. Driever. Es enthält die hoch-affine BCD-Bindungsstelle A3 aus dem *Dm'hb*-Promotor (-67 bis -59; TCT AAT CCC),

welche in 4 Kopien vor einen *Dm'hsp70*-Promotor mit nachfolgender *lacZ*-Sequenz gesetzt wurde. Dieses Reporter-gen wird in *Drosophila* ähnlich dem endogenen *hunchback*-Gen exprimiert (Driever et al., 1989).

Das Konstrukt pB[4xA3-*lacZ*] (siehe Material & Methoden) wurde zuerst in *D. melanogaster* getestet. Dieses Kontrollexperiment zeigt die erwartete Färbung mit einer *lacZ*-antisense Sonde: Früh eine anteriore Kappe ab ca. 60% Eilänge, die sich dann etwas später wieder von der Spitze zurückzieht (Abb. 2.2).

Von diesem Konstrukt wurden 12 unabhängige Linien in *Tribolium* erzeugt. Davon wurden 5 der *in situ* Hybridisierung unterzogen. Im Gegensatz zu *Drosophila* konnte aber keinerlei *lacZ*-Expression festgestellt werden. Ein Protein, das über *bcd*-DNA-Bindestellen transkriptionsaktivierend wirkt, konnte also auf diese Weise nicht nachgewiesen werden. Eine negative Evidenz dieser Art läßt zwar keine eindeutigen Schlußfolgerungen zu, dieses Ergebnis spricht aber dafür, daß anteriore maternale Determinanten in *Tribolium* andere DNA-Bindungsspezifitäten haben als *Dm'bcd*.

2.2. anteriore (*bcd*) und posteriore (*osk*) mRNA-Lokalisierungssignale

Die erwähnten Versuche (Wolff et al., 1998) zeigen jedoch, daß es zumindest ein anterior lokalisiertes Gen mit Translationsregulationsaktivität geben muß. Die für die Lokalisierung von *Dm'bcd* verantwortliche 3'UTR wurde von Macdonald (Macdonald and Struhl, 1988) untersucht und eine 630 nt lange Sequenz identifiziert. In einem anschließenden Projekt wurden die Sequenzen von 6 weiteren *Drosophila* Arten ermittelt und verglichen. Obwohl die Sequenzen bis zu 50% verschieden sind und nur einige kleinere Abschnitte invariabel sind, ist die Sekundärstruktur für alle konserviert. Um dies funktionell zu testen, wurden die 3'UTR von *D. simulans*, *D. teissieri* und *D. virilis* anstatt der ursprünglichen UTR an das *Dm'bcd* Gen gehängt und nach *D. melanogaster* gebracht. In allen 3 Fällen reichte 1 Kopie für eine vollständige Wiederherstellung einer *bcd* Mutante. Die *bcd* und *hb* Proteingradienten sind nahezu wie in wt. Die evolutionären Distanzen sind 2,5 – 17 Mio. Jahre zu *D. simulans* und *teissieri* und immerhin 40 – 60 Mio. Jahre zu *D. virilis* (MacDonald, 1990).

Es stellte sich daher die Frage, ob ein ähnliches mRNA-Lokalisierungssystem auch in *Tribolium* aktiv ist. Daß mRNAs grundsätzlich in *Tribolium* Embryonen lokalisiert vorliegen können, wurde schon mehrfach gezeigt. Die klonierten Gene *Tc'knilch* und *Tc'pangolin* liegen als mRNA früh im Blastoderm vor und sind in unbefruchteten Eiern an der anterioren Spitze des Eis lokalisiert (pers. Mitteilung Gregor Bucher, pers. Mitteilung Sue Brown). Für das posteriore Ende konnte *Tc'vasa* nachgewiesen werden (pers. Mitteilung Reinhard Schröder). Um zu prüfen, ob die mRNA-Lokalisierungsmaschinerie in *Tribolium* konserviert ist, und ob *Drosophila*-Lokalisierungssequenzen erkannt werden, wurde ein anteriores und

ein posteriores Lokalisierungssignal in den Käfer gebracht. Grundlage des anterioren Konstruktes ist das *Dm'hb* Gen mit der *Dm'bcd 3'UTR* (Schulz and Tautz, 1994). Es enthält den maternalen *Dm'hb*-Promotor, von dem wir hofften, daß er auch im Käfer aktiv sei. Um eine nachteilige Wirkung des *Dm'hb* Proteins auszuschließen wurde die DNA *Nco I* verdaut und religiert, um die Sequenzbereiche von Position 4892 bis 6305 zu entfernen (Tautz et al., 1987). *pB[Dm'hbΔNco I-3'bcd]* fehlen damit fast die gesamte konservierte Box B und die vier zentralen Zinkfinger. Die Box A nahe des N-Terminus und die beiden C-terminalen Zinkfinger bleiben im ursprünglichen Leseraster erhalten (siehe Material & Methoden). Als Testfall für das posteriore Lokalisierungssystem wurde die *oskar 3'UTR* als aussichtsreichste gewählt, da von ihr auch die *nanos* Lokalisierung abhängt. Diese UTR wurde an ein *Dm'hsp70-lacZ* Reporter gen kloniert, wobei das *lacZ*-Gen dabei verkürzt wurde. Das genaue Konstruktionsschema ist in Material & Methoden beschrieben. Von diesen beiden Konstrukten wurde das *3'oskar* Konstrukt in *Drosophila* auf seine Funktion überprüft. Verschiedene Pools transformierter Fliegen wurden über einige Tage hinweg mit Hitzeschocks behandelt und dazwischen mehrfach zur Eiablage gebracht. *hs-lacZ-3'oskar* wird wie erwartet exprimiert und am posterioren Pol der Embryonen in der Nähe der Keimzellen lokalisiert. Das Signal wird allerdings, im Unterschied zum endogenen *oskar*-Transkript, erst im Blastoderm detektierbar (Abb. 2.2 C und D im Vergleich mit wt in E und F).

In *Tribolium* wurden 36 transgene Linien für *pB[Dm'hbΔNco I-3'bcd]* und 38 transgene Linien für *pB[Dm'hsp70-lacZΔ-3'osk]* erzeugt. Eine Expressionskontrolle zu *Dm'hb-3'bcd* steht noch aus, da die entsprechenden Fliegen als Kontrolle noch nicht vorhanden sind. Leider konnte für das *3'oskar* Konstrukt in verschiedenen Färbungen keine Expression oder Lokalisierung festgestellt werden. Die Hitzeschockbedingungen für *T. castaneum* waren natürlich nicht bekannt. Deshalb wurde in einem Vorversuch über die Hitzetoleranz der adulten Käfer der Annäherungswert von 46°C ermittelt (siehe Material & Methoden). Um die Expression von *hs-lacZ-3'oskar* während der Eientwicklung zu steigern bzw. zu induzieren, wurden die Käfer von 9 der *hs-lacZ-3'oskar* Linien zwei Mal pro Tag jeweils einstündigen Hitzeschocks im 46°C Wasserbad ausgesetzt. Über mehrere Tage hinweg wurden so die Eiablagen gesammelt, fixiert und auf *lacZ* mittels *in situ* Hybridisierung getestet. Trotzdem konnte kein *lacZ* – lokalisiert oder unlokalisiert – nachgewiesen werden.

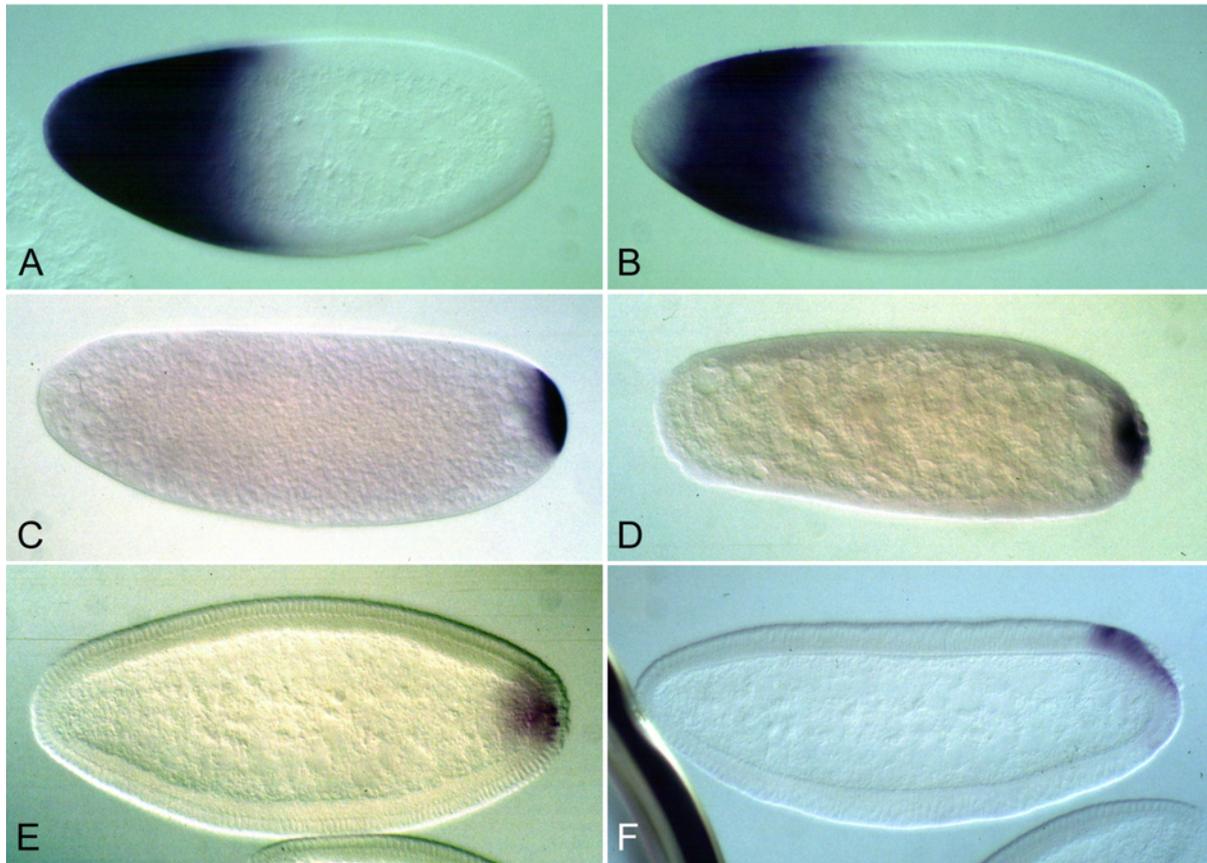


Abb. 2.2 *in situ* Kontrollfärbungen in *Drosophila melanogaster*.

Konstrukt *4xA3-lacZ*, früh als anteriore Kappe (A), späteres Stadium mit freiem anterioren Ende aufgrund terminaler Repression (B). Anfärbung posterior lokalisierter mRNA (C-F): C) frühes endogenes *Dm'oskar* Signal im Synzytium, D) *Dm'oskar* etwas später, wenn die Keimzellen bereits separiert sind. E) Konstrukt *hs-lacZ-3'oskar* posterior im Blastoderm, F) *hs-lacZ-3'oskar* etwas später mit deutlich sichtbaren Keimzellen.

2.3. Promotoranalyse *Tc'hb*

Um die von Christian Wolff in *Drosophila* gewonnene Interpretation der *Tc'hb upstream*-Region zu überprüfen, subklonierte ich das größte Konstrukt, *Tc'hb 5,2-lacZ*, mit der gesamten bekannten regulatorischen Sequenz in den Vektor mit dem universellen Marker (siehe Material und Methoden). Die Expression von LacZ in *Tribolium* sollte zeigen, ob die *Drosophila*-Ergebnisse zutreffend sind, wonach dieses Fragment alle für die wt Expression notwendigen regulatorischen Elemente enthält (Wolff et al., 1998).

Es wurden 34 unabhängige Linien in *Tribolium* erzeugt. Eine gemischte Ablage von mehr als der Hälfte der Linien wurde mit *in situ* Färbungen auf *lacZ*-Expression analysiert. Tatsächlich reproduziert das große Konstrukt, *Tc'hb 5,2-lacZ*, gut das endogene Muster von *Tc'hunchback*. Nach der vorläufigen Auswertung und Beschreibung aller Stadien ist die früheste deutliche Färbung im Pantoffelstadium zu sehen (zu Beginn des Keimstreifwachstums und der Gastrulation bildet der Embryo eine Pantoffel-artige Form). Es handelt sich um eine breite Domäne in der Mitte des Keims, die sich, wie im wt, in 2 Streifen

aufspaltet (Abb. 2.3 C und K). Das Signal in den mesodermalen Zellen in der Mitte entlang des Embryos scheint stärker als im wt. Einige gefärbte Zellen im übrigen Bereich gehören wahrscheinlich zur extraembryonalen Serosa, die ebenfalls *hb* exprimiert (Wolff et al., 1995). Wenn der Keimstreif das Längenwachstum beginnt verblaßt die vordere Domäne und eine endständige, posteriore Domäne tritt auf. Im Unterschied zum endogenen Transkript taucht diese mit dem Konstrukt früher auf (Abb. 2.3 E und L). Im weiteren Verlauf ist in den transgenen Embryonen und dem wt eine segmentale und die terminale, in zwei Punkte aufgeteilte Färbung zu sehen (Abb 2.3 F,G und M). Das Nervensystemmuster ist zunächst mit dem *lacZ* Reporter nicht zu erkennen (Abb. 2.3 I und N), nach der Keimstreifverkürzung aber vorhanden. Die Kopfexpression ist mit dem Konstrukt 5,2 *kb* ebenfalls reduziert und einfacher (Abb. 2.3 H-J und O). Von den Hauptkomponenten der *Tc'hb* Expression, extraembryonal, kopfspezifisch und terminal, konnte die frühembryonale Expression in der Serosa und in der Keimanlage (wie in wt Abb. 2.3 A und B) nicht nachgewiesen werden. Die Färbung im Kopfbereich der Keimanlage entspricht aber der späteren breiten Domäne im Keimrudiment und ist daher lediglich verzögert. Die terminale Färbung des wachsenden Keimstreifs ist vorhanden.

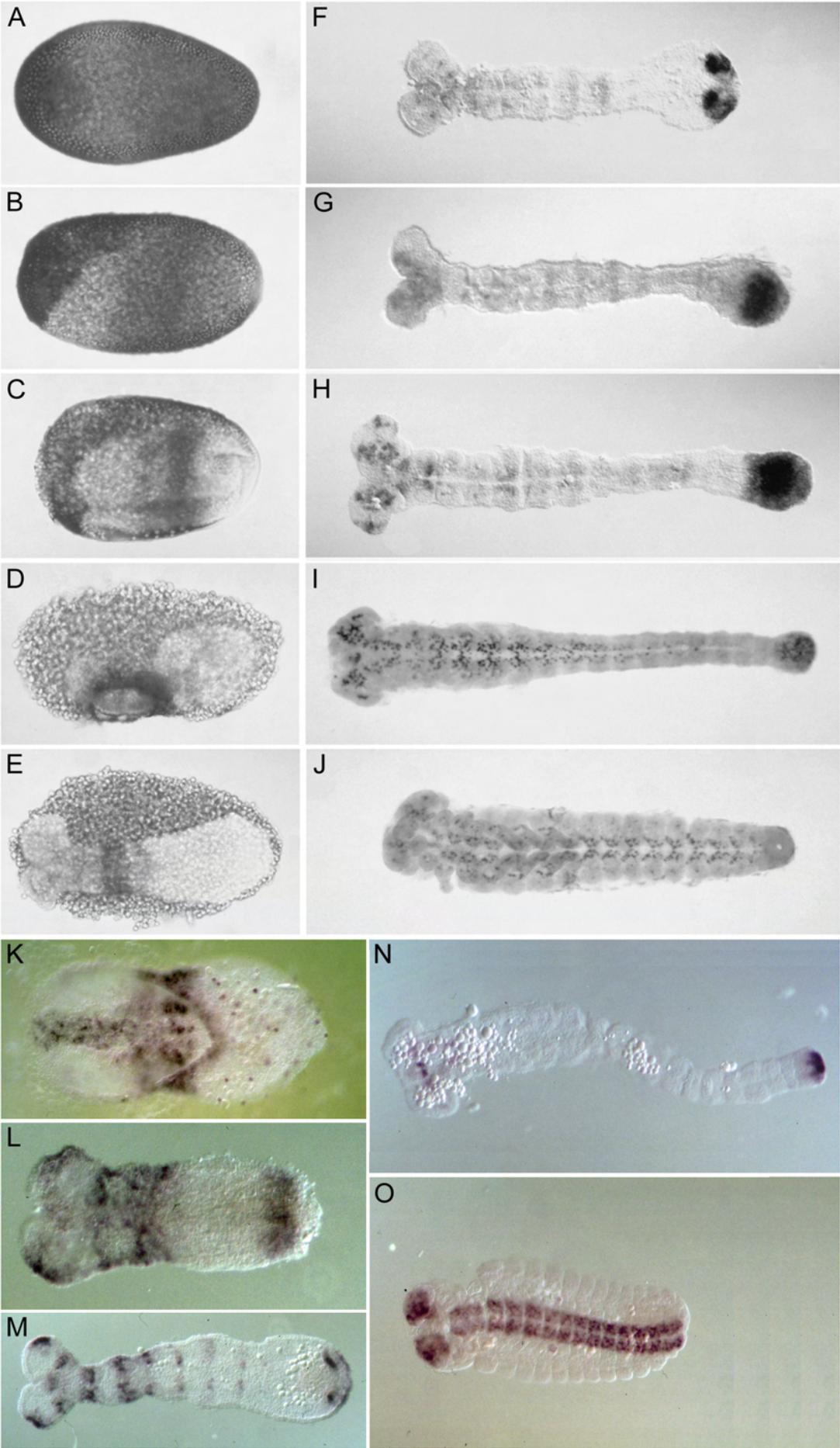


Abb. 2.3 Endogenes *Tc'hb* (A-J) (aus (Wolff et al., 1995)) und *Tc'hb 5,2lacZ* Reporter-Muster (K-O) in *Tribolium castaneum* anhand von RNA *in situ* Hybridisierungen.

A) Früheste zygotische Expression als anteriore Kappe und in den hinteren $\frac{2}{3}$ des Eis. B) Während der Bildung der Keimanlage breitet sich die anteriore Kappe dorsal nach hinten aus. C) Keimscheibe mit breiter Domäne in der Mitte zu Beginn der Gastrulation und weiterhin in der extraembryonalen Serosa. D) *hb*-Expression rund um das sich schließende Amnion. E) Zu Beginn des Keimstreifwachstums ist nur noch die breite Domäne im Embryo zu sehen. F) Die posteriore Domäne am Ende des Keimstreifs erscheint und verstärkt sich in G); zusätzlich ist ein transientes segmentales Muster zu erkennen. Von anterior nach posterior entwickelt sich die Expression im ZNS (H-J), während die posteriore Expression zum Abschluß des Keimstreifwachstums nachläßt (I). J) Verkürzter Keimstreif mit invaginiertem Enddarm. K) Erste sichtbare Färbung in der Mitte des Keims. L) Nach Beginn des Keimstreifwachstums kommt eine terminale Domäne hinzu. M) Keimstreif mit segmentalem Muster und terminaler Domäne aus zwei ventro-lateralen Punkten. N) Ausgewachsener Keimstreif mit terminaler Domäne. O) Verkürzter Keimstreif mit Kopf- und Nervensystemexpression.

2.4. Diskussion

Die Expression von *Tc'hb 5,2-lacZ* in *T. castaneum* zeigt, daß das System aus universellem Marker, dem *piggyBac* Transposon und zusätzlicher Fremd-DNA sehr gut für eine heterologe Genexpression im Käfer geeignet ist. Die hier vorgestellten Experimente sind ein erster Ansatz zur Untersuchung der frühen Musterbildung, bzw. des Vorhandenseins maternaler Faktoren in einem Kurzkeimer. Bekannt war die Existenz lokalisierter mRNAs und eines terminalen Systems. Letzteres wurde mit einem Antikörper gegen aktivierte MAP-Kinasen gezeigt. Dieser Signalweg wird zuerst posterior und wenig später auch anterior im frühen Käfer benutzt (R. Schröder pers. Mitteilung).

Eine Lokalisierung mittels des 3'UTRs von *oskar* aus *D. melanogaster* konnte, unter dem Vorbehalt weiterer Kontrollexperimente, nicht festgestellt werden. Möglicherweise war die Expression des Konstruktes zu schwach, um ein nicht exakt passendes Signal nachzuweisen. Zum Zeitpunkt der Experimente war nicht klar, ob der *Dm'hsp70* Promotor ausreichend gut in *Tribolium* funktioniert. Im Prinzip war dies durch die Transformationsergebnisse gezeigt, bei denen der Helper mit demselben Promotor arbeitet. Aber ob sich der Promotor im Genom genauso verhält wie im extra-chromosomalen Plasmid und ob mit den gewählten Bedingungen eine ausreichend starke Induktion durch Hitzeschocks möglich ist, war unsicher. Inzwischen hat Ivana Viktorinova (Labor E. Wimmer) mit einer hs-EGFP Linie bestätigen können, daß bei 47°C eine Induktion in *Tribolium* möglich ist. Ein ähnliches Problem besteht bei dem für 3'*bcd* verwendeten *Dm'hb* Promotor. Er enthält den maternal aktiven Fliegenpromotor (Schulz and Tautz, 1994). Wie stark dieser im Käfer transkribiert wird und ob er früh genug arbeitet, muß zusammen mit der möglichen Lokalisierung überprüft werden.

Etwas enttäuschend ist, daß auch das Konstrukt mit 4 hintereinanderliegenden *bicoid*-Bindestellen (A3) nicht zu einer Expression des lacZ-Reporters geführt hat, obwohl das Verhalten von *Tc'cad* und *Tc'hb* die Existenz eines solchen Proteins fordern. Im Labor von E.

Wimmer, Bayreuth, verlief ein ähnliches Experiment ebenfalls negativ, bei welchem ein Konstrukt mit einer 6-fach wiederholten idealen *bicoid*-Bindestelle (Ronchi et al., 1993) in *Tribolium* eingesetzt wurde (pers. Mitteilung Frank Pogoda). Dieses unabhängige Ergebnis und die noch fehlende Erfahrung über verlässliche Promotoren im Käfer, hat mich dann dazu veranlaßt, diesen Weg vorerst nicht weiter zu verfolgen, sondern erst weitere Daten z.B. aus der Analyse regulatorischer Abschnitte von *Tc'hb* und anderer *Tribolium*-Gene zu sammeln.

Das Konstrukt *Tc'hb 5,2-lacZ* bildet das zygotische Muster des wt *hunchback*-Gens vom Zeitpunkt der Bildung des Keimrudiments bis zum Ende der Embryonalentwicklung mit einer starken Expression gut nach. Die posteriore, früh-zygotische Domäne im Kopfbereich des Embryos, die in *Drosophila* von *Dm'cad* aktiviert wird, ist vorhanden. Hingegen ist die Serosaexpression, die in *Drosophila* von *bicoid* abhängt, bisher nicht detektiert worden. Dies könnte entweder daran liegen, daß die Expression über das 5,2 kb Konstrukt früh relativ schwach ist. Auch das endogene *hunchback* ist im Blastoderm nicht besonders deutlich zu sehen. Andererseits ist es möglich, daß die Zuordnung anteriore Domäne in *Drosophila* = Serosa im Käfer und posteriore Domäne in *Drosophila* = Kopfstreifen in *Tribolium* nicht zutreffend ist und der *Tc'hb* Promotor doch nicht vollständig ist, sondern notwendige Sequenzen für die Serosaexpression fehlen. Eine genauere Analyse der Linien und die Untersuchung der übrigen *Tc'hb* Deletionskonstrukte von Christian Wolff im Käfer wird die Frage klären können. Mittlerweile ist die Frage des BCD Homologs in anderen Insekten durch die Arbeiten von Urs Schmidt-Ott geklärt (Stauber et al., 1999). Danach ist *bicoid* aus einer Duplikation des *Hox3/zen* Gens hervorgegangen, die sich in einem Vorläufer der cyclorraphen Fliegen ereignet hat. Es stellt sich nun die Frage, welcher andere Faktor außerhalb der höheren Fliegen für die Aktivierung von *hunchback* oder die Kontrolle von *caudal* verantwortlich ist.

3. Terminale homöotische Mutanten und molekulare Analyse des *Tribolium spalt* Gens

3.1. Analyse der homöotischen Phänotypen *wurm*^{10b17} und *überlänge*^{10d21}

In der AG Klingler wurden während der letzten Jahre EMS-Mutagenesescrines durchgeführt und Musterbildungsmutanten isoliert, die anhand von Kutikuladefekten identifiziert wurden.

Zwei dieser Mutanten, *wurm* und *überlänge*, werden hier beschrieben. Dabei handelt es sich um neuartige homöotische Phänotypen, bei denen hauptsächlich das Abdomenende ab A9 (PS14) betroffen ist. Diese Segmente behalten eine abdominale Identität und werden nicht oder nur teilweise zu einem Telson umgeformt. Zusätzlich treten bei *überlänge* anteriore Veränderungen auf, während bei *wurm* auch das Haarmuster und die Segmentierung gestört sind. Um Phänotypen genauer beschreiben zu können und sie entsprechend ihren Abweichungen vom Wildtyp einzuordnen, mußte zunächst eine detaillierte Beschreibung aller epidermalen Landmarken im Wildtyp gemacht werden. Anschließend wurde versucht die Mutation auf eine Klasse von Genen oder sogar auf ein bestimmtes Gen, das „Kandidatengen“ einzugrenzen.

3.1.1. Karte der Wildtyp-Kutikula

Es wurde ein möglichst vollständiges Verzeichnis aller lichtmikroskopisch sichtbaren Strukturen der dorsalen Epidermis vom ersten Thoraxsegment bis zum Telson erstellt, um vor allem Segmentierungsphänotypen, aber auch subtile dorso-ventrale Phänotypen beschreiben zu können. Dabei sind auf dem Rücken der Larve weitaus mehr Strukturen zu finden als auf der ventralen Seite (Abb. 3.1). Ergänzend wurde aber auch die ventrale Epidermis ab dem 1. Abdominalsegment kartiert (Abb. 3.3). Als Grenze zwischen der dorsalen und der ventralen Epidermis wurde die Tracheenöffnung (Stigma) definiert. Der Begriff Telson wird hier für den hintersten Abschnitt der Larve verwendet, der auch die zunächst normal angelegten, aber später mit dem eigentlichen Telson fusionierten embryonalen Segmente 9, 10 und 11 beinhaltet. Die gefundenen Elemente wurden nicht im Detail ultrastrukturell oder sinnesphysiologisch charakterisiert, sondern nur nach lichtmikroskopischer Morphologie unterschieden und in vier Kategorien unterteilt:

Beschreibung der Struktur	Bezeichnung	
kreisförmige Erhebung (Basalring)	campaniforme Sensille	c
Basalring mit einem kurzen Haar, das kaum länger als der Durchmesser des Basalrings ist	Seta (kurz)	s
Basalring mit deutlich längeren bis sehr langen Haaren (bis zu einer Segmentbreite), die auch entsprechend dicker sind	Seta (mittel bis lang)	S
wie S, aber mit verstärkter Basis und dornartigem Auswuchs am Basalring (bract)	Seta (mittel bis lang) mit Dorn	Sd

Dorsale Kutikula

Dorsal wurden auf einer Halbseite vom 1. thorakalen Segment bis zu den Urogomphi insgesamt 213 dieser Strukturen kartiert (siehe Abb. 3.1). Dabei handelt es sich um 94 lange Setae, 50 kurze Setae und 69 campaniforme Sensillen. Pro Hemisegment sind dies dann 16-26 Elemente, und 10 + 2 für Telson und Urogomphi. Die Anzahl pro Segment nimmt dabei nach posterior immer mehr ab. Sie sind auf den entsprechenden Abschnitten mehr oder weniger in 3 Reihen angeordnet; eine anteriore (a), eine mediane (m) und eine posteriore (p). Diese Reihen liegen auf den Segmenten, mit Ausnahme von T1, ungefähr äquidistant zueinander, wobei das letzte Viertel jedes Segments nur aus glatter Kutikula besteht. Die anteriore Reihe besteht aus 3 oder 4 s (Ausnahme: T1). In der zweiten, mittleren Reihe befinden sich hauptsächlich mittellange S (Ausnahme: Telson), und in der hinteren Reihe erscheinen alle Typen, also auch die langen S mit und ohne Dorn an der Basis.

Um Mutanten möglichst einfach beschreiben zu können, wurde für jedes Element eine eindeutige Bezeichnung gewählt, die nach einem Koordinatensystem aufgebaut ist:

Am Anfang steht das entsprechende Segment (z.B. T3), gefolgt von a, m oder p, um die Reihe anzugeben. Danach erscheint die Abkürzung für die Art des Elementes (c, s, S oder Sd) mit der Positionsnummer, die von der Mittellinie ab gezählt wird. Falls notwendig kann dieser Folge noch ein l oder r, für linke oder rechte Hälfte vorangestellt werden (Orientierung: Aufsicht auf Dorsal, Kopf nach oben).

Also z.B. r T3 p Sd 3

in der rechten Hälfte für die lange **S**eta mit **D**orn an der Basis, die in der **p**osteriore Reihe des **3.** thorakalen Segments an Position **3** steht. Zu beachten ist, daß die Positionsnummer keinerlei Wertung in Bezug auf eine Homologie der Elemente verschiedener Segmente wiedergibt.

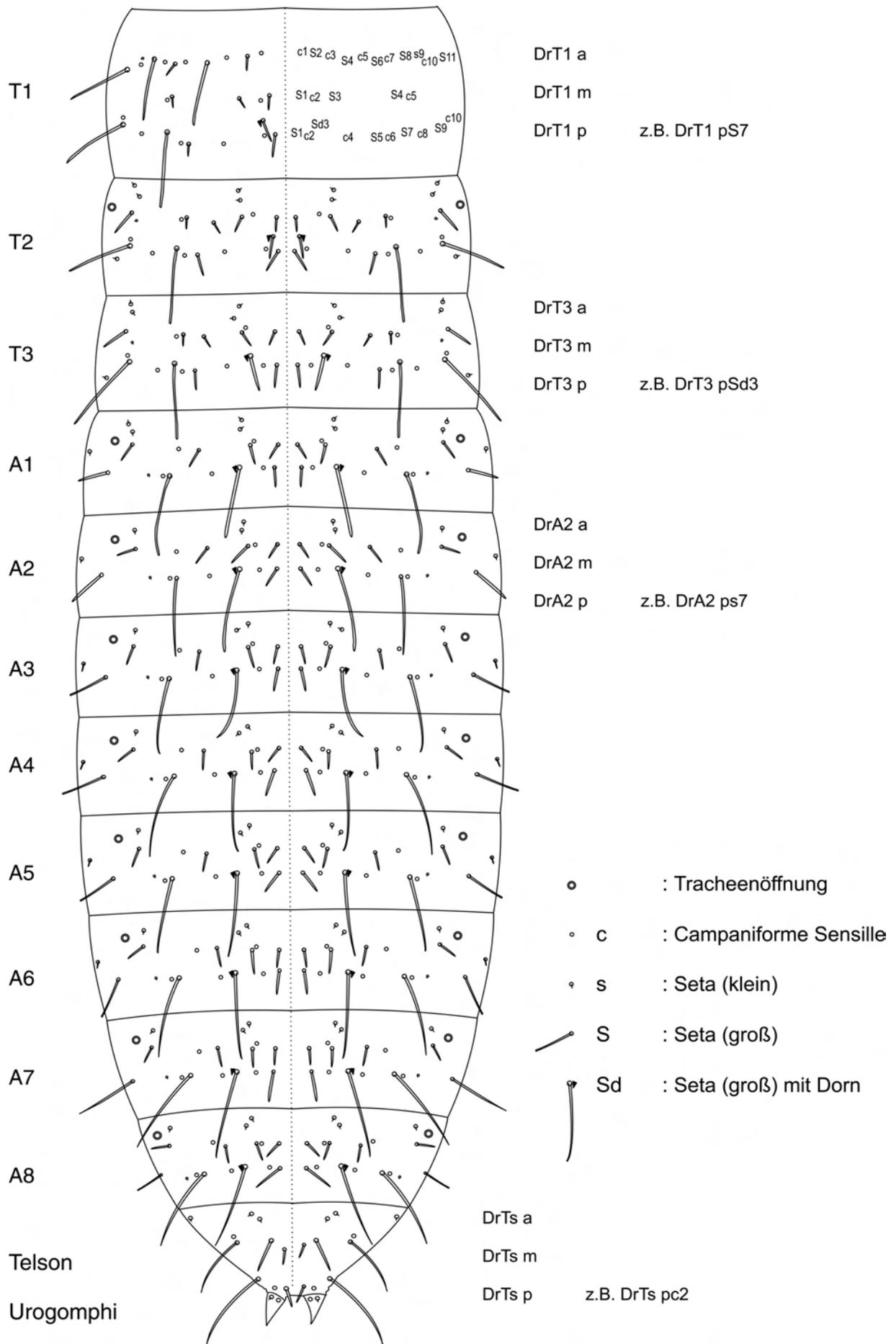


Abb. 3.1 Dorsale Ansicht der Kutikula des ersten Larvenstadiums (L1) zum Zeitpunkt des Schlüpfens.

Verzeichnet sind alle lichtmikroskopisch unterscheidbaren Strukturen der thorakalen und abdominalen Segmente und des Telsons. Beschreibung der Elemente siehe vorheriger Absatz. Zur besseren Orientierung, bzw. Übereinstimmung mit der ventralen Seite, sind links und rechts außen noch die ventrolateralen Setae eingezeichnet (siehe ventrale Kutikula, Abb. 3.3). T = Thorakalsegment, A = Abdominalsegment, Ts = Telson, a = anteriore Reihe, m = mittlere Reihe, p = posteriore Reihe, D = dorsal, r = rechte Seite, l = linke Seite.

Mit Hilfe dieser Karte ist es nun möglich auch Segmente eindeutig voneinander zu unterscheiden, die sich sehr ähneln, etwa T2 und T3, aber erstmals auch A1 von den restlichen abdominalen Segmenten A2-A8. Das erste thorakale Segment unterscheidet sich von allen anderen durch seine ca. 50% größere Breite, und weil in der anterioren Reihe nicht nur wenige kleine Setae, sondern auch große Setae und campaniforme Sensillen zu finden sind, wie sonst nur in der posterioren Reihe. Es hat auch als einziges zur anterioren Grenze (Kopf) hin einen größeren Bereich mit nackter Kutikula. Neben diesem ersten Segment lassen sich auch weitere eindeutig beschreiben: T2 unterscheidet sich von T3 vor allem durch die vorhandene Tracheenöffnung, aber auch dadurch, daß die rechte und linke Sd3 nach anterior aus der Reihe, und zur Mittellinie hin, verschoben sind. Im Gegensatz zu den abdominalen Segmenten, die ja ebenfalls Stigmen besitzen, hat T2 median eine zusätzliche S und auch posterior zwei weitere S. Zudem stehen die deutlich kleineren Sd mehr antero-ventral zwischen der m und der p Reihe. Das Abdomen erscheint zunächst gleichmäßig, aber A1 unterscheidet sich von den übrigen dadurch, daß anterior außen zwei s vorhanden sind, nicht nur eines wie in A2 – A8. Wie die Auswertung der Variabilität (nächster Abschnitt) zeigt, ist dieser winzige Unterschied dennoch ein sehr verlässliches Merkmal. Das Telson schließlich ist dadurch charakterisiert, daß keine Stigmen gebildet werden und in der medianen Reihe nur 3 S zu sehen sind, von denen die 2. und 3. allerdings wesentlich länger ist. Posterior fehlen die Sd. Die Urogomphi tragen jeweils eine campaniforme Sensille und eine kurze Seta.

Variabilität des Wildtyp-Musters:

Um die Verlässlichkeit dieser Landmarken zu validieren, wurden 10 Embryonen ausgezählt, wobei die rechte und die linke Seite jeweils als unabhängig betrachtet wurde. Symmetrische Abweichungen vom Grundtyp traten nur für das Element mc4 im Telson auf, welches in 4 Embryonen beidseitig absent war. In der Tabelle 3.2 stehen somit Daten von 20 Halbseiten. Insgesamt fehlten 46 Strukturen und nur 2 traten zusätzlich auf. Hauptsächlich handelte es sich um die campaniformen Sensillen (36x). Teilweise ist dies vermutlich auch darauf zurückzuführen, daß diese in den Präparaten manchmal schwer zu erkennen sind und somit der Beobachtung entgehen. Ansonsten fehlten keine kurzen Setae, aber einige der mittleren bis langen Setae (10x).

Zusammenfassend läßt sich also feststellen, daß die Verteilung der Kutikulamarker außerordentlich zuverlässig ist: Durchschnittlich fehlen pro Embryo 4,6 von den insgesamt 426 Elementen (1,1%). Ektopische Strukturen sind fast nie vorhanden (0,2 pro Embryo).

Abschnitt	zusätzliche	Struktur	fehlende
T1		s S c	mS1, aS2, aS2 mc2, ac1, ac5, ac3, pc10
T2		s S c	mS4 mc2, pc6
T3		s S c	mc6, pc6
A1	pSd1/2	s S c	mS1, pS5 pc4, pc4, pc4
A2		s S c	pS5
A3		s S c	pS5 pc4, pc4, mc2, pc4
A4		s S c	mc2, mc5, pc4
A5		s S c	pS1 mc5, pc4, pc4
A6		s S c	pS5 mc5
A7		s S c	mc2, mc5, pc4
A8		s S c	mc5
Ts		s S c	mc4, mc4, mc4, mc4, mc4, mc4, mc4, mc4, mc4
Ug	s1/2	s S c	
Summe	2		46

Tabelle 3.2 Abweichung vom Wildtyp.

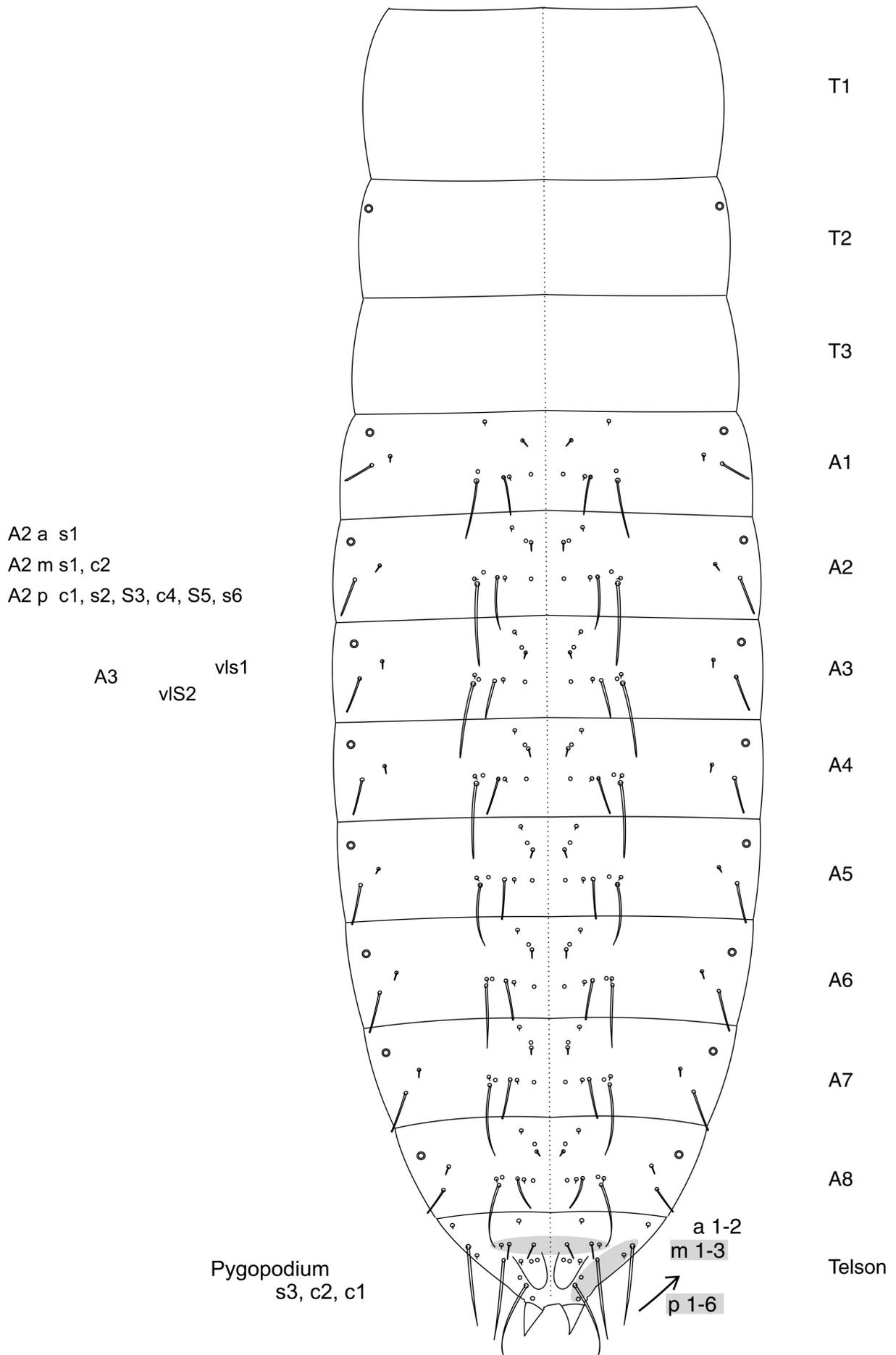
Beobachtete zusätzliche (2. Spalte) und fehlende (4. Spalte) Elemente sind für jedes Segment und die entsprechenden Elementtypen aufgelistet. „pSd1/2“ bedeutet, daß zusätzlich eine große **S**eta mit **D**orn zwischen Position **1** und **2** in der **p**osterioren Reihe aufgetreten ist. Unter den fehlenden Strukturen sind 36 c, keine s, 10 S und keine Sd.

Ventrale Kutikula

Die ventrale Kutikula läßt sich in einen ventrolateralen und einen ventralen Bereich unterteilen. Insgesamt ist sie weniger sklerotisiert, und vor allem campaniforme Sensillen sind in Hoyers-Milchsäure Präparaten noch schlechter zu erkennen als dorsal. Sie hat mit 99 Elementen pro Halbseite (A1 bis Telson) eine deutlich geringere Anzahl an Landmarken. Ventrolateral verläuft kurz vor den Stigmen eine Doppelreihe mit einer kurzen und einer langen Seta das Abdomen entlang (vls1 und vls2). Der ventrale Abschnitt ist schwieriger zu katalogisieren, da die Kutikulastrukturen hier näher zusammenliegen und auch variabler in ihrer a/p Ausrichtung sind. Ihre Position ist daher manchmal von ventral nach lateral nicht eindeutig in Reihe zu bringen. In Analogie zu der dorsalen Kutikula kann man sagen, daß es anterior von A1 bis zum Telson nur eine s pro Hemisegment gibt. Median finden sich, außer in A1 (nur s1), die zwei Strukturen ms1 und mc2. Posterior sind die meisten Merkmale, nämlich in der Regel: c1, s2, S3, c4, S5, s6. Dabei fehlt in A1 wiederum eines (s6). Wie auf der dorsalen Kutikula, unterscheidet sich also A1 von A2-A8 auch ventral. Das Telson wird in den meisten Präparaten durch die dreidimensionale Struktur der Pygopodien sehr unübersichtlich. Anterior sitzt, wie gesagt, eine s und median folgen S1, S2 und s3 (grau unterlegt). Auf den Pygopodien sind anterior 2 campaniforme Sensillen und eine kurze Seta (s3). Die restlichen Elemente sind einfach als „p“ Reihe von ventral (posterior) nach lateral (anterior) durchnummeriert (S1, s2, S3, c4, S5, c6) (grau unterlegt). Auf den Urogomphi befinden sich ventral keine Merkmale.

Abb. 3.3 Ventrale Ansicht der Kutikula des ersten Larvenstadiums (L1) zum Zeitpunkt des Schlüpfens.

Verzeichnet sind alle lichtmikroskopisch sichtbaren Strukturen der abdominalen Segmente und des larvalen Telsons. Beschreibung der Elemente siehe Text. T = Thorakalsegment, A = Abdominalsegment, Ts = Telson, Ug = Urogomphi, Pp = Pygopodien, a = anteriore Reihe, m = mittlere Reihe, p = posteriore Reihe, vl = ventrolateral, V = ventral, r = rechte Seite, l = linke Seite.



3.1.2. Beschreibung der Mutanten *überlänge*^{10d21} und *wurm*^{10b17}

Die beiden Linien wurden in die Kategorie homöotische Mutanten eingestuft, da ihr auffälligstes Kennzeichen eine Änderung der Segmentidentität ist. Diese befindet sich im Bereich von A9-A11. Im Wildtyp werden diese Segmente embryonal angelegt, verschmelzen dann aber im weiteren Verlauf miteinander und mit dem eigentlichen Telson zum – in Analogie zur *Drosophila* Literatur – larvalen Telson. Dieses larvale Telson bildet spezifische Anhänge aus; dorsal die Urogomphi (Ug) und ventral die Pygopodien (Pp). Dabei ist nicht klar, ob A11 ein vollständiges embryonales Segment ist, da bei *engrailed in situ* Färbungen an dieser Stelle kein Streifen zu sehen ist, also der posteriore Abschnitt offenbar nicht vorhanden ist. Dieses A11 fusioniert während des Rückenschlusses mit A10 (Shippy et al., 1998).

wurm^{10b17}

wurm hat seinen Namen durch seine, im Vergleich zum Wildtyp, deutlich verlängerte Körperform mit zusätzlichen Abdominalsegmenten auf Kosten des Telson. Am Kopf, den Mundwerkzeugen und am Thorax konnten keine weiteren homöotischen Veränderungen festgestellt werden. Der Phänotyp von *wurm* ist aus 4 Aspekten zusammengesetzt:

In keiner der untersuchten Larven finden sich posterior terminale oder telsonspezifische Strukturen, wie Urogomphi, Pygopodien oder die entsprechenden Setae (siehe zum Vergleich wt in Abb. 3.4 A). Die Segmente ab A9 erscheinen als normale Abdominalsegmente, fusionieren nicht miteinander und laufen am Ende auch nicht spitz zu (Abb. 3.4 B). Orientiert man sich an den Stigmen, so haben symmetrische Embryonen 10-11 Segmente, wobei die letzten Stigmen oft schlecht ausgebildet oder schlecht erkennbar sind. Dorsale und ventrale Marker bestätigen dies. Bis A10 sind sie in der Regel vollständig vorhanden. In A11 fehlen oft die posterioren Setae oder sind auf einer Seite reduziert. Dieses letzte Segment erscheint durch eine Art Einschnürung oder Trennlinie oft als ein Nebeneinander von zwei Halbsegmenten. Weiteres Gewebe, z.B. ein Telson im engeren Sinne, ist nicht erkennbar.

Zweitens treten häufig Asymmetrien bei der Segmentierung auf (Abb. 3.4 C und 3.5). In 10 von 17 Embryonen fehlen halbseitig Segmente bzw. sind 2-3 Segmente halbseitig fusioniert (Abb. 3.4 D und 3.5 C). Die Deletionen können genau halbseitig mittig sein (Abb. 3.5 A) oder kleiner, so daß entweder einzelne dorsale Marker noch erhalten sind oder schmale Gewebebrücken ohne Marker bis zur anderen Seite durchgehen (Abb. 3.5 B). Betroffen ist immer das 7. (3x) oder das 8. abdominale Segment (5x), bei zwei Embryonen ist die Zuordnung unklar. Die Segmentierung in A1-A6 ist immer regelmäßig, posterior von der Segmentierungsstörung ebenso. Selbst bei den symmetrischen Larven sind die

Segmentgrenzen A7/A8 und A8/A9 manchmal morphologisch schwächer ausgeprägt. Bei 6 der 10 Embryonen ergibt sich folgerichtig eine einseitig verringerte Anzahl an Stigmen. In zwei Embryonen sind jedoch, trotz eines fehlenden Halbsegmentes beidseitig 11 Stigmen vorhanden. Auf der Seite der Deletion wird am Ende ein zusätzliches Halbsegment angehängt. Bei weiteren zwei ist sogar deutlich ein 12. Stigma zu erkennen; also nicht nur ein zusätzliches Halbsegment, sondern ein ganzes Segment, welches in Wildtypen nicht vorhanden ist (Abb. 3.4 D). Damit ist *wurm* die erste Mutante, die eine Störung des Zählmechanismus während der Segmentierung aufweist und dadurch wenigstens halbseitig mehr als 11 Segmente bilden kann.

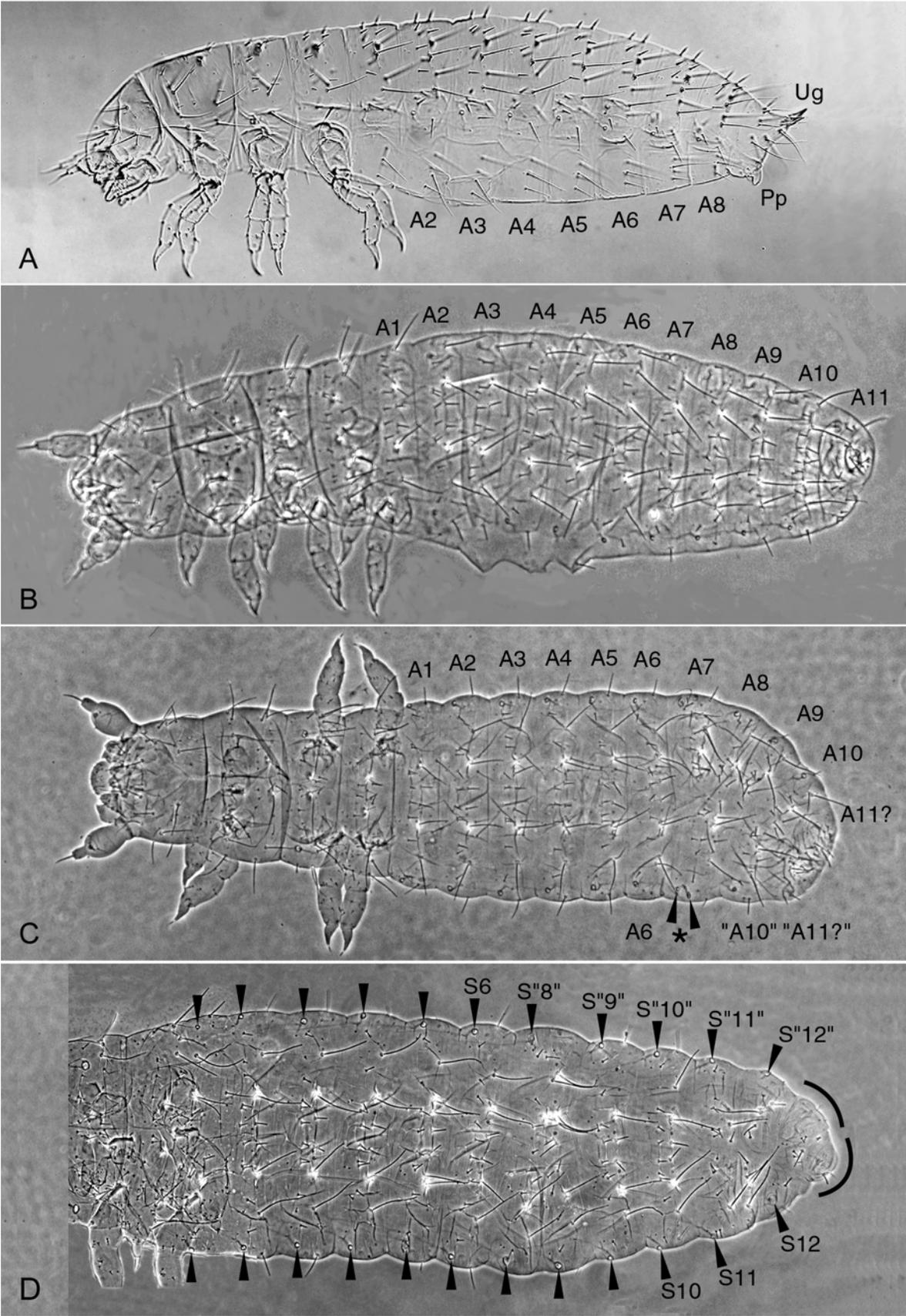


Abb. 3.4 Kutikulaphänotyp der Mutante *wurm*.

(A) Wildtyp Larve (L1) mit 8 abdominalen Segmenten und einem Telson mit Urogomphi (Ug) und Pygopodien (Pp). (B) Symmetrischer *wurm* Phänotyp mit 11 abdominalen Segmenten und jeweils 11 Stigmen. (C) Asymmetrische *wurm* Kutikula. Segmente A7, A8 und A9 sind auf einer Seite zu einem verbreiterten Halbsegment fusioniert, das 2 Stigmen beinhaltet (*). Segmente 10 und 11 sind wieder durchgehend, aber A11 ist ohne Stigmen und deformiert. (D) Abdomen eines Embryos des asymmetrischen Phänotyps (vergrößert) mit überzähligem 12. Segment inklusive Stigma. Die Pfeilspitzen markieren die Stigmen. A7 ist nur halbseitig vorhanden (untere Seite). A9 bis A11 scheinen normal segmentiert, ebenso A12, das beidseitig Stigmen ausgebildet hat, allerdings aber nicht alle dorsalen Marker trägt. Anschließend folgt noch eine weitere, mit Setae versehene „Zellmasse“ (schwarz umrandet).

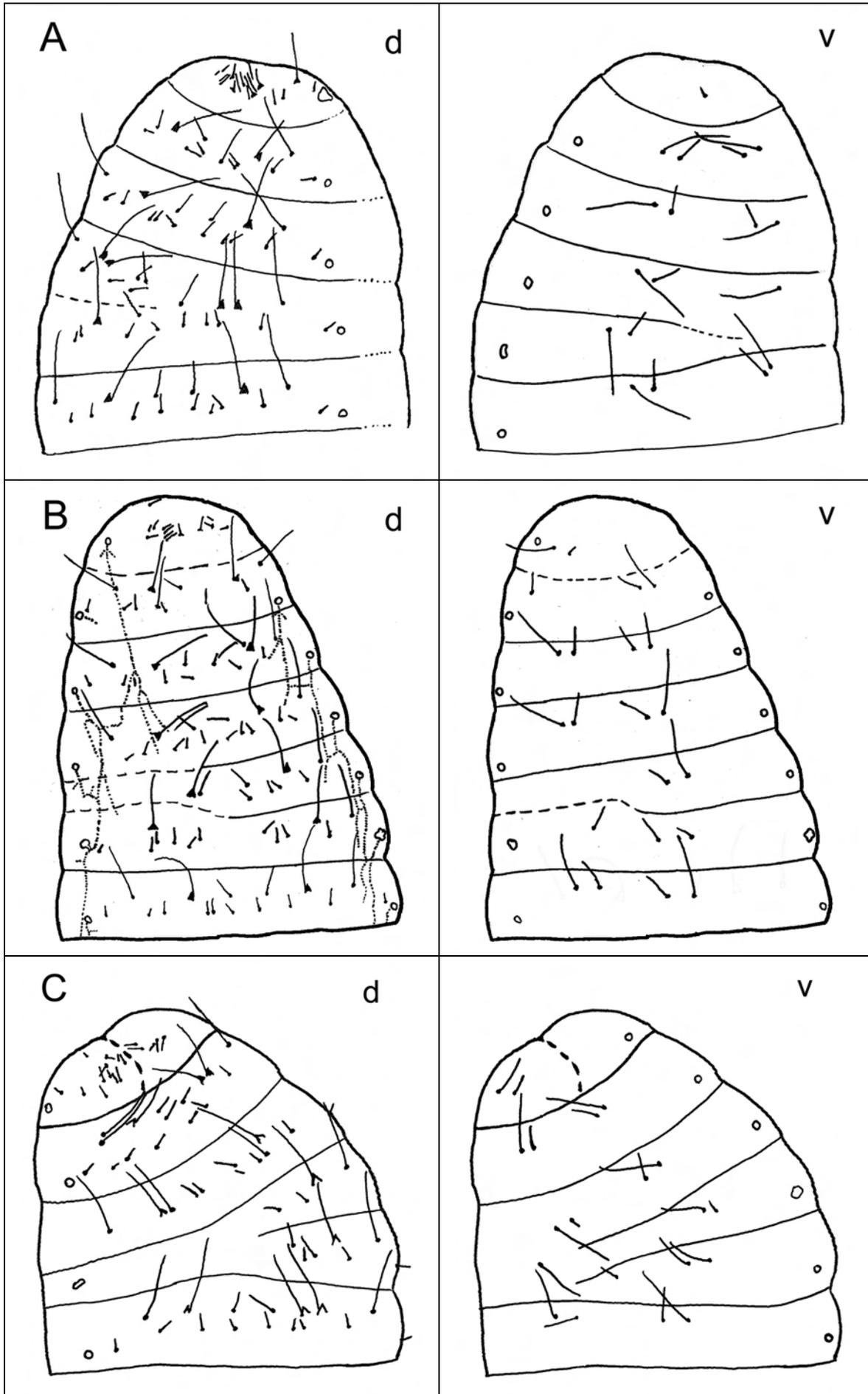


Abb. 3.5 Kutikulazeichnungen dreier *wurm* Embryonen.

(links = dorsal (d), rechts = ventral (v)). Das erste, noch vollständige Segment ist jeweils das 6. abdominale Segment. Segmentgrenzen sind, soweit möglich durchgezogen eingezeichnet, bzw. gestrichelt, wenn dies nicht eindeutig ist. In (B) dorsal sind die Haupttracheenäste eingezeichnet (gepunktet). Während die Verzweigung rechts ungefähr dem Wildtyp entspricht, ist sie links gestört. Es gibt keine Verbindung zum „11.“ Stigma, wohingegen das „12.“ Stigma korrekt angebunden ist. In (C) verdeutlicht die gestrichelte Linie den Eindruck zweier nebeneinander stehender Halbsegmente.

Ein dritter mit *wurm* assoziierter Phänotyp besteht in Störungen des Haarmusters. Dazu gehören Duplikationen, Verlust und vor allem Umwandlungen von dorsalen Elementen. Abbildung 3.6 zeigt das gesamte Spektrum der Abweichungen in dorsal T1 - A6 von 6 untersuchten Embryonen (asymmetrisch und symmetrisch). Obwohl viele Marker betroffen sind, ist es auffällig, daß es sich in den verschiedenen Larven und Segmenten regelmäßig um dieselben Positionen handelt, wenn auch pro Kutikula jeweils nur einige davon tatsächlich verändert sind (Einzeldaten nicht gezeigt). Duplikationen treten ektopisch meist bei den äußeren kleinen Setae der anterioren Reihe oder den mittellangen Setae an Position 6 der mittleren Reihe auf (rot in Abb. 3.6). Der häufigste Verlust ist der des langen ventrolateralen Haares im Abdomen (blau markiert). Insgesamt am häufigsten treten Transformationen auf. An der Stelle der einfachen campaniformen Sensillen finden sich dann mittellange oder lange Setae, die ihrem nächsten Nachbarn ähnlich sind (rot ergänzt; z.B. Position 2 und 5 der mittleren Reihe, sowie Position 2 der posterioren Reihe). Dies kann durch eine Art homöotischer Transformation zustande kommen oder durch Duplikation des Nachbarelementes und „Verdrängung“ der Sensille.

Der vierte und unscheinbarste Teil des *wurm* Phänotyps besteht darin, daß einzelne, abdominale Tracheenöffnungen an beliebigen Segmenten unregelmäßig geformt und schwächer sklerotisiert sind.

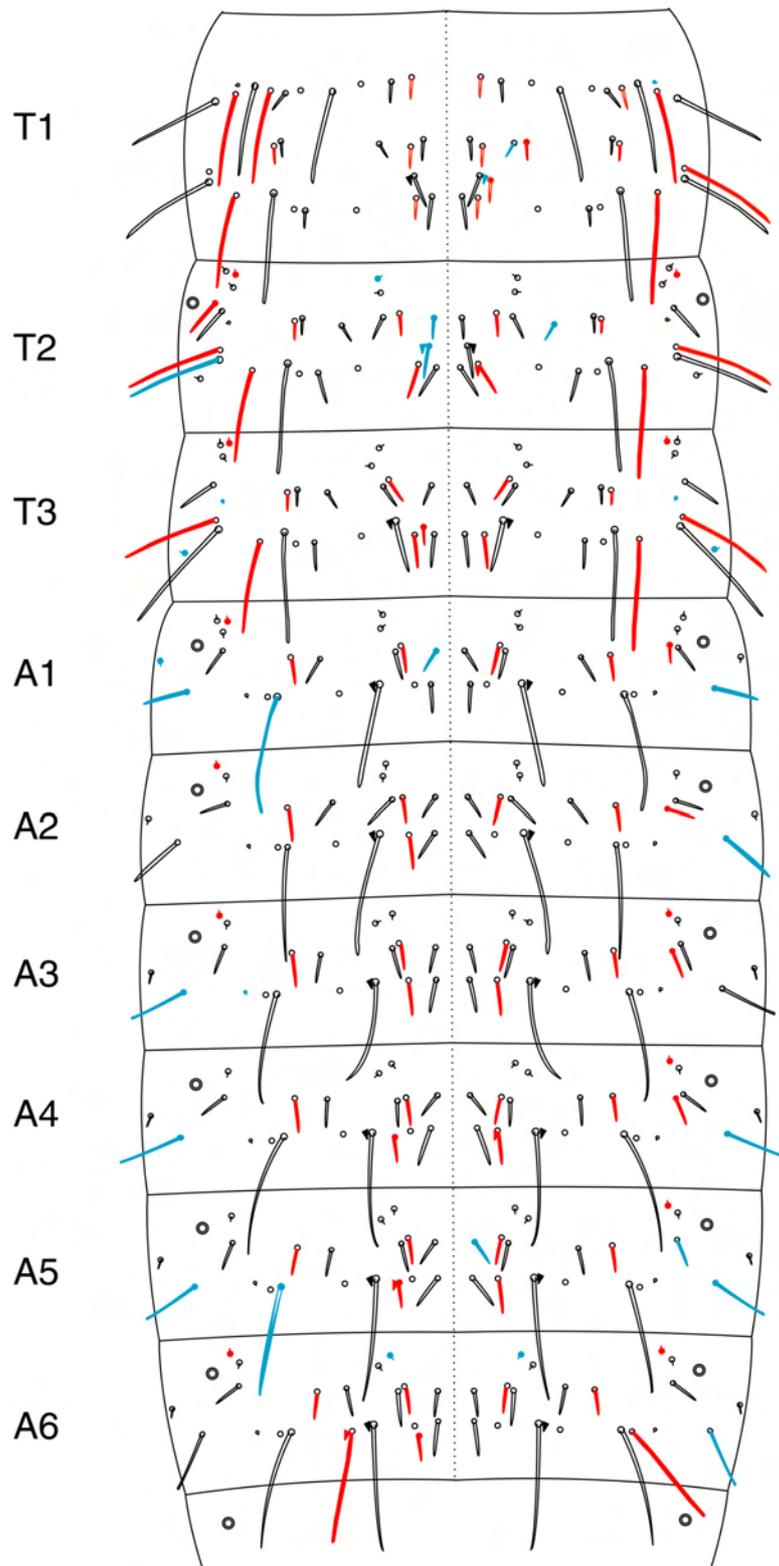


Abb. 3.6 Kummulative Karte der dorsalen Marker der Mutante *wurm*. Ausgewertet wurden 3 symmetrische und 3 asymmetrische Embryonen dorsal von T1 bis A6, da bis dahin keine Segmentierungsdefekte auftreten, die die Auswertung dieses Aspekts erschweren. Farblich markiert sind die Abweichungen vom Wildtyp (siehe Abb. 3.1). Blau gekennzeichnet sind fehlende Elemente, rot sind neu auftretende Strukturen und rot ergänzt sind ektopische Marker, die an Stelle einer campaniformen Sensille erscheinen. Campaniforme Sensillen sind auf Grund ihrer geringeren Verlässlichkeit in dieser Auswertung nicht berücksichtigt.

Test auf Dominanz in Heterozygoten

Bei einer Reihe von Auskreuzungen mit dem SB-Laborstamm konnte keine Heterozygotendominanz in der nachfolgenden Generation festgestellt werden. Das *wurm* Allel ist rezessiv.

Komplementation mit *überlänge*^{10d21}

Die Mutanten *wurm*^{10b17} und *überlänge*^{10d21} komplementieren sich, d.h. Larven, die für beide Mutationen heterozygot sind, haben einen wt-Phänotyp. Es wurden beide Geschlechtskombinationen mit demselben Ergebnis durchgeführt. Die Männchen waren in Einzelkreuzungen mit Jungfrauen der eigenen Linie auf die jeweilige Mutation vorgetestet, wurden dann mit 5 Jungfrauen der anderen Linie gekreuzt und die Nachkommen in 3 Ablagen auf mutante Phänotypen untersucht. Zur Kontrolle, ob einige dieser eingesetzten Jungfrauen tatsächlich Träger der Mutation waren, wurden nach den Kreuzungen die Männchen entnommen, mit ihren gleichallelischen Weibchen zusammengesetzt und die Ablage auf Mutanten getestet. In allen der 2x 5 Kreuzungen traten Embryonen mit dem entsprechenden Phänotyp auf. Daraus folgt, daß die beiden Mutationen nicht allelisch sind, sondern unterschiedliche Gene betreffen.

Mutantenanalyse mittels Färbungen:

Homöotische Mutationen sollten in der Regel keine Auswirkungen auf die Segmentierung haben. Da der Phänotyp von *wurm* aber segmentale Defekte zeigt, wurde das Muster des Segmentpolaritätsgens *engrailed* in den Keimstreifen untersucht. Die beschriebenen Kutikulaasymmetrien in *wurm* Embryonen spiegeln sich auch in Antikörper-Färbungen gegen *en* wider (Abb. 3.7). Das Muster entspricht bis zu A6 dem Wildtyp. Ab dem 7. Streifen ist die Expression schwächer und Streifen 7 und 8 liegen häufig zu nahe zusammen, sind nicht rechtwinklig zur Längsachse ausgerichtet und nicht ganz durchgehend (Abb. 3.7 A, C). Alternativ könnte es sich um einen geteilten Streifen 7 handeln. Später scheint ein Korrekturmechanismus zu greifen, der versucht die frühen *en* Streifen zu interpretieren und zu verschärfen. Je nach Lage und Stärke des Defektes können wohl entweder trotzdem komplette Segmente gebildet werden oder es kommt zu einseitig fusionierten Abdominalsegmenten (Abb. 3.7 B, D). *en* Streifen 10 scheint in *wurm* Mutanten nicht reduziert zu sein wie in wt, sondern in der Ausbildung den übrigen *en* Streifen zu entsprechen (Abb. 3.7 D, E).

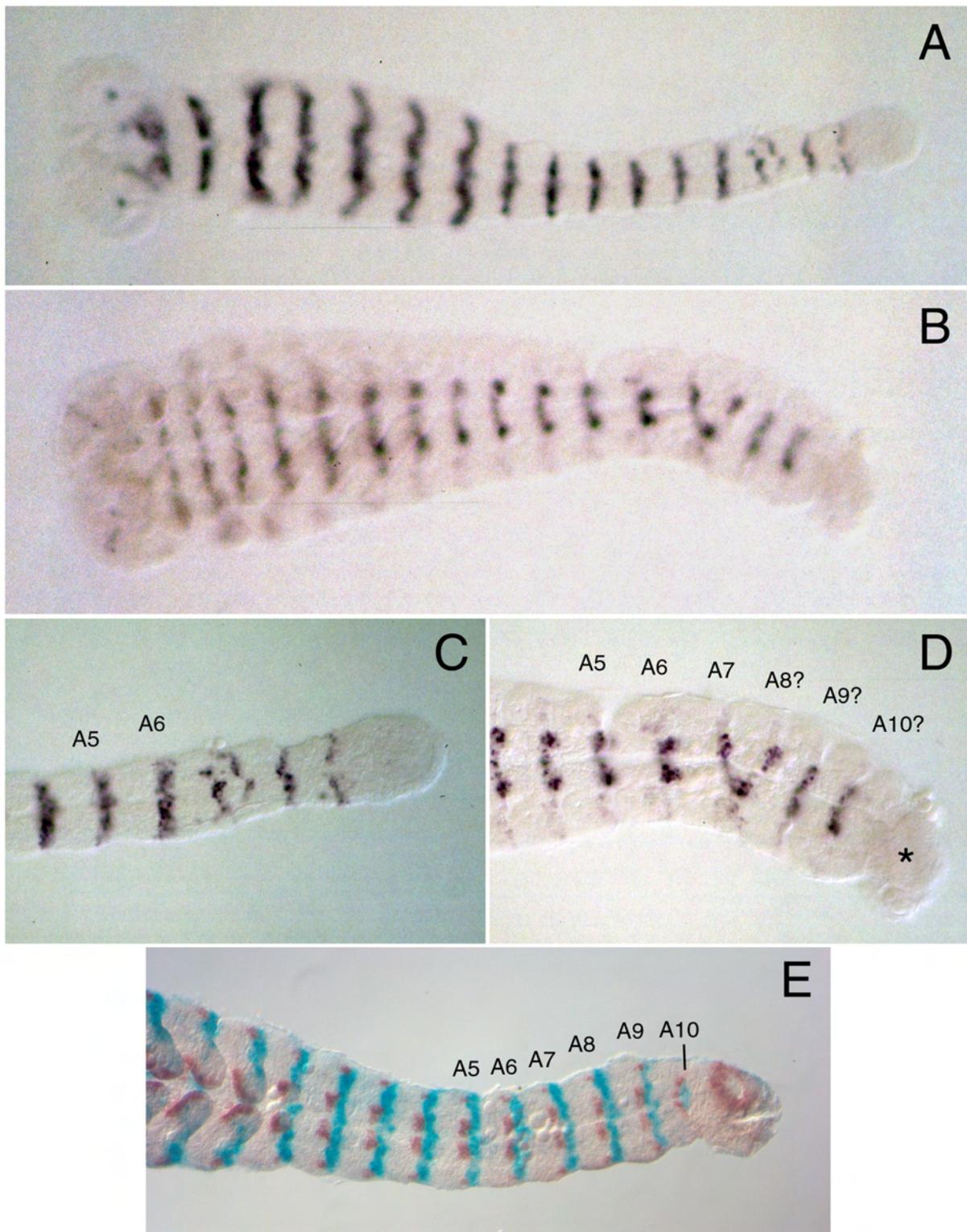


Abb. 3.7 α -*Engrailed* Antikörperfärbung an *wurm* Embryonen und *wt in situ* mit *wg/en*. α -*Engrailed* Antikörperfärbung an *wurm* (A-D). (A) fast ausgewachsener Keimstreif mit normaler Streifenbildung bis A6 (vergrößert in C). An der Position von A7 bzw. A7/A8 treten 2 Teilstreifen auf, die in der Mitte aneinander vorbei laufen, anstatt sich zu treffen. Der folgende Streifen ist ebenfalls leicht verschoben. (B und D) älterer Keimstreif mit abgeschlossener Segmentierung (* Proctodeum). Im Abdomen gibt es 10 *Engrailed* Streifen, von denen A7 und A8 einseitig fusioniert sind. Der letzte Streifen (A10) ist nicht wie beim Wildtyp (E, blau) verschmälert. (E) Wildtypembryo mit Doppel-*in situ* Färbung *wingless* (braun) und *engrailed* (blau). Alle Embryonen sind in Ventralansicht zu sehen (anterior nach links).

überlänge^{10d21} (übl)

Der Phänotyp von *überlänge* ähnelt dem von *wurm*, ist aber weniger auffällig. Auf den ersten Blick erscheinen die Larven fast normal, da das Abdomen mit einer telsonähnlichen Struktur abgeschlossen ist. Es erscheint lediglich etwas länger als der Wildtyp (Abb. 3.8 A). Zusätzlich gibt es eine weitere, anterior im Thorax gelegene Veränderung. Der Phänotyp erstreckt sich damit auf T1 und das Abdomenende ab A9.

Im ersten thorakalen Segment wird ein zusätzliches Paar Stigmen gebildet. Diese liegen, im Vergleich zu denen in T2, etwas weiter anterior und mehr ventral (Abb. 3.8 B). Im Übrigen hat das Segment aber eine, nach Größe und Sinneshaarmuster, unveränderte T1 Identität. Am Kopf, den Mundwerkzeugen und den Beinen konnten keine Veränderungen festgestellt werden. Das Abdomen besteht aus 9 voll ausgebildeten Segmenten (**A9**). Darauf folgt ein schwach ausgebildetes bzw. reduziertes 10. Segment, an dem die Stigmen meist nicht sklerotisiert sind, sondern nur als trichterförmige Vertiefungen zu erkennen sind (**A9+1**). Insgesamt erscheint dieses Segment vor allem dorsal verkürzt, was oben zu einem stufigen Einschnitt führt (* in Abb. 3.8 A+C). A10 scheint also vor allem ventral ausgebildet zu sein. Das dorsale Haarmuster ist in der anterioren Reihe gut erhalten und nur teilweise noch in der mittleren (Abb. 3.8 C). Das Segment hat also eindeutig abdominale Identität. Pygopodien sind in der Regel vorhanden und sehr terminal plaziert (**A9+1+Pp**). Aufgrund der morphologischen Fehlbildung am Abdomenende sind diese in Hoyers/Milchsäurepräparaten manchmal nicht eindeutig zu erkennen. Meist findet sich aber ein einsprechender paariger „Hautlappen“. Hingegen fehlen die dorsalen Anhänge (Urogomphi) in allen Embryonen (**A9+1+Pp-Ug**) (Abb. 3.8). Ein 11. abdominales Segment ist nicht zu sehen. Im Gegensatz zu der Mutante *wurm* ist das dorsale Haarmuster von T1 - A9 nicht gestört (Abb. 3.8) und die untersuchten Embryonen zeigen keine Asymmetrien bei der Segmentierung (fehlende oder zusätzliche Halbsegmente).

Die Penetranz des Phänotyps ist sehr gleichmäßig, wie eine Auswertung von 15 Kutikulapräparaten zeigt. Lediglich die Ausprägung der Stigmen in A10 variiert etwas und kann rechts und links unterschiedlich sein. 11 Embryonen entsprechen dem gerade beschriebenen Phänotyp **A9+1+Pp-Ug**. Bei einem weiteren sind die Pygopodien nicht eindeutig nachweisbar. Eine Kutikula hat einseitig ein normales, sklerotisiertes Stigma, die Pygopodien sind wiederum nicht eindeutig sichtbar. Die restlichen beiden Embryonen haben eine abgeschwächte Ausprägung. Ihnen fehlt einseitig das Stigma in A9 (aber +Pp und -Ug).

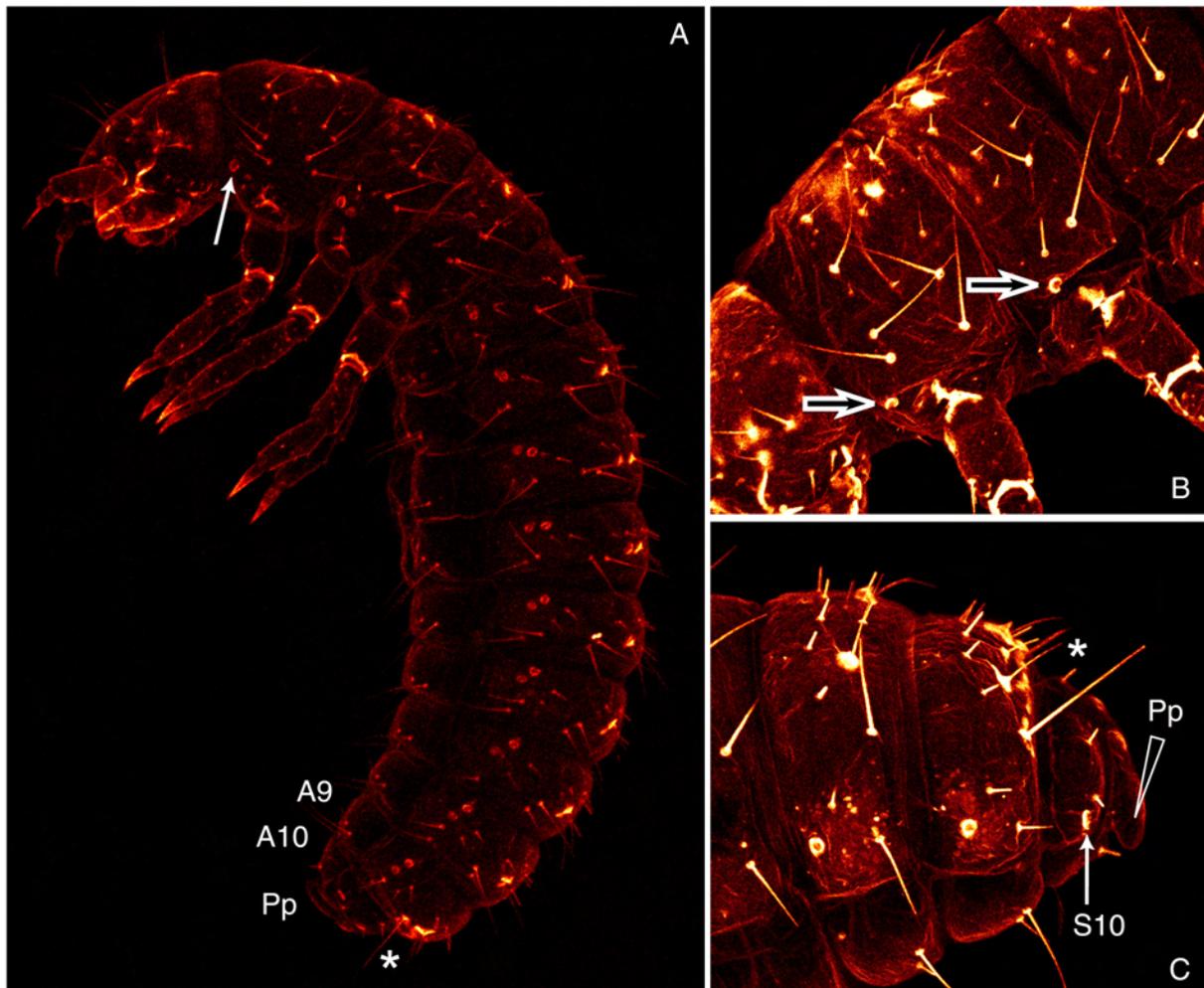


Abb. 3.8 Kutikulaphänotyp der Mutante *überlänge*.

Autofluoreszenzaufnahme am Konfokalen LSM. (A) Gesamtansicht. Der Pfeil deutet auf das ektopische Stigma in T1. Am Hinterende gibt es ein zusätzliches abdominales Segment A9, ein unvollständiges Segment A10, die Pygopodien (Pp), aber keine Urogomphi. (B) Ausschnittvergrößerung von T1 und T2 mit den beiden Stigmen, bei ansonsten unveränderter Identität (nach Größe des Segments und Haarmuster). (C) Ausschnittvergrößerung des posterioren Endes ab A8. Der Pfeil zeigt auf das Stigma im 10. Segment (S10). Dieses und die vorhandenen dorsalen Setae, die der anterioren Reihe entsprechen, belegen die abdominale Identität des Segmentes. (*) in (C) wie in (A) weist auf den stufenartigen dorsalen Einschnitt von A10. Die Pfeilspitze in (C) markiert die Pygopodien.

3.1.3. Genetische Kartierung zum Homöotischen Komplex (*HOM-C*)

Da beide Phänotypen hauptsächlich homöotischer Natur sind, wurden die Mutanten auf ihre Lage relativ zum Homöotischen Komplex (*HOM-C*) kartiert. Dazu standen 2 Stämme zur Verfügung, *Df (HOM-C)* und *Ey/Es*.

Df (HOM-C) ist eine Deletion, die fast den gesamten homöotischen Komplex umfaßt. Es fehlen die Gene *Dfd*, *Cx (Scr)*, *ptl (Antp)*, *Utx (Ubx)* und *A (Abd-A)*. In homozygot mutanten Larven bilden alle gnathalen, thorakalen und abdominalen Segmente eine Antenne als Extremität, d.h. alle Segmente besitzen eine antennale Identität (Brown et al., 2002b). Der Test wurde mit beiden Geschlechtskombinationen durchgeführt: *Df (HOM-C)* Männchen mit

jeweils mehreren *wurm* Jungfrauen und getestete *wurm* Männchen mit jeweils mehreren *Df* (*HOM-C*) Jungfrauen. *Wurm* komplementiert die Mutation *Df* (*HOM-C*) zum Wildtyp, da keine embryonalen homöotischen Kutikulaphänotypen auftreten. Die Gene des *Tribolium* HOX Komplexes, außer *lb*, *mxp* (*pb*) und *Abd-B* können damit als Kandidaten für *wurm* ausgeschlossen werden.

Dieser Test wurde nicht mit *überlänge* durchgeführt.

Der zweite zum Kartieren verwandte Stamm enthält die beiden Translokationsmutationen *Eyeless* (*Ey*) und *Extra-sclerite* (*Es*), die sich gegenseitig balanzieren. Die Karten der Kopplungsgruppen (Linkage group, LG) (<http://bru.gmprc.ksu.edu/proj/tribolium/index.asp>) zeigen, daß es sich bei *Es* um eine LG 2;4 Translokation (*T(2;4)AEs-1*), und bei *Ey* um eine LG 2;5 Translokation (*T(2;5)Ey*) handelt, die beide über den Bereich des *HOM-C* reichen (Abb. 3.9). Daher eignen sie sich auch als Balancer für Gene des *HOM-C*.

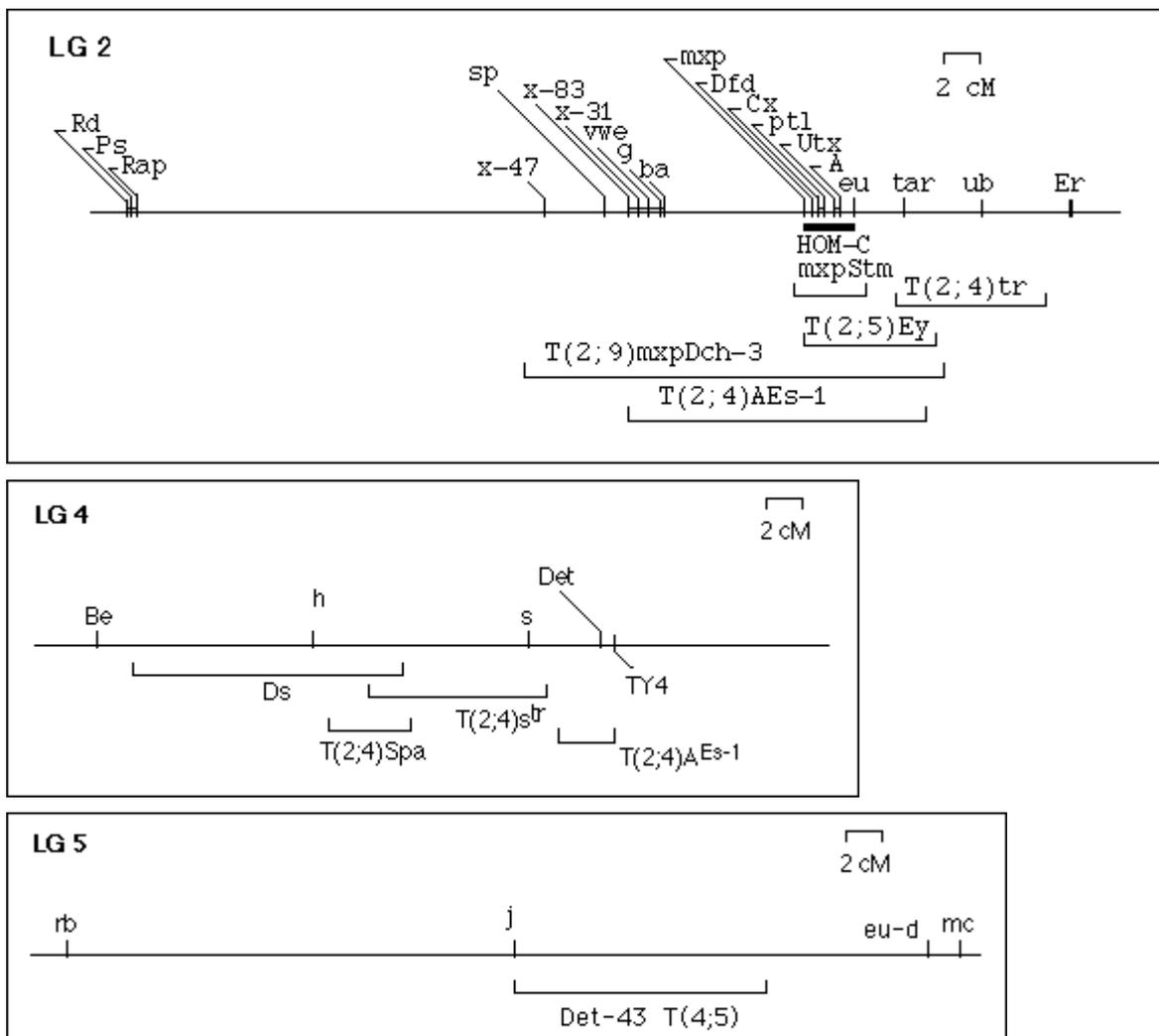


Abb. 3.9 Schematische Darstellung der Kopplungsgruppen (LG) 2, 4 und 5.

Beide stammen aus radioaktiv bestrahlten Käfern und lassen sich mittels eines dominanten Markers im adulten Tier erkennen. In *Extra sclerite* ist die ventrale Seite des zweiten abdominalen Segments homöotisch nach der von A3 transformiert und bildet dadurch eine zusätzliche sklerotisierte Platte. Bei *Eyeless* sind der Kopf und die Augen deutlich reduziert. Beide Translokationen sind homozygot lethal.

Für *wurm* heterozygote Männchen wurden mit *Ey/Es* Jungfrauen ausgekreuzt und die Nachkommen entsprechend dem Schema in Abbildung 3.11 getestet. Bei *überlänge* wurde genauso verfahren. Weder *Ey* noch *Es* konnten die homöotischen Mutanten balancieren, sondern segregierten in den folgenden Generationen sofort wieder unabhängig von *wurm* oder *überlänge*, da jeweils Käfer auftraten, die den dominanten Marker verloren hatten. Für *wurm* sind die Einzeldaten in Tabelle 3.10 aufgeführt. In Kombination mit *Ey* waren 20% der F2 Käfer ohne *Eyeless*, mit *Es* trugen 26% der F2 Käfer den sichtbaren Marker nicht. Bei unabhängiger Segregation erwartet man für einen dominanten Erbgang mit homozygot lethaler Wirkung des Markers 66% Heterozygote mit dem Phänotyp und 33% ohne Marker. Aus diesen F2 Käfern wurden wieder Einzelkreuzungen angesetzt, um sie mit ihren Eiablagen auch auf das *wurm* Allel zu testen. In allen Kreuzungsvariationen, mit und ohne dem sichtbaren Marker, waren bei einem großen Teil der Pärchen nicht beide Käfer heterozygot, und zwar bei *Ey* zwischen 38% und 60%, und bei *Es* zwischen 64% und 75%. Die theoretische Erwartung für diese Pärchen bei unabhängiger Segregation beträgt 4/9 (44,4%). Es ergab sich auch in keiner der Kreuzungen ein Unterschied zwischen dem Verhalten von Männchen und Weibchen. Die Abweichung von den erwarteten Frequenzen ist dadurch zu erklären, daß *Ey* und *Es* unterschiedlich stark die Mortalität von Embryonen beeinflussen. Es ist aber eindeutig keine Balancerfunktion gegeben. Damit ist gezeigt, daß die Mutationen *wurm* und *überlänge* nicht im *HOM-C* oder in dessen Nähe auf der LG 2 kartieren. Vor allem *Tc'Abd-B*, das im postabdominalen Bereich exprimiert wird, scheidet infolgedessen als Kandidatengen für die beiden Mutanten aus.

Ey/wurm

	F2 Käfer mit <i>Ey</i>	F2 Käfer ohne <i>Ey</i>
aus 5 Einzelkreuzungen	93 (80%)	23 (20%)
aus diesen F2 Käfern		
	mit <i>wurm</i> Phänotyp	ohne <i>wurm</i> Phänotyp
<i>Ey</i> pos. Einzelkreuzungen	17 (40%)	25 (60%)
<i>Ey</i> neg. Einzelkreuzungen	4 (57%)	3 (43%)
<i>Ey</i> pos./neg. Einzelkreuzungen	5 (63%)	3 (38%)

Es/wurm

	F2 Käfer mit <i>Es</i>	F2 Käfer ohne <i>Es</i>
aus 6 Einzelkreuzungen	85 (74%)	30 (26%)
aus diesen F2 Käfern		
	mit <i>wurm</i> Phänotyp	ohne <i>wurm</i> Phänotyp
<i>Es</i> pos. Einzelkreuzungen	10 (29%)	25 (71%)
<i>Es</i> neg. Einzelkreuzungen	4 (36%)	7 (64%)
<i>Es</i> pos./neg. Einzelkreuzungen	1 (25%)	3 (75%)

Tab. 3.10 Einzeldaten des Test auf die Eignung von *Eyeless* oder *Extra-sclerite* als Balancer für *wurm*.

Anzahl der Käfer mit dem sichtbaren Marker *Ey* bzw. *Es* und Auftreten des *wurm* Phänotyps in den Ablagen von Einzelkreuzungen dieser F2 Käfer.

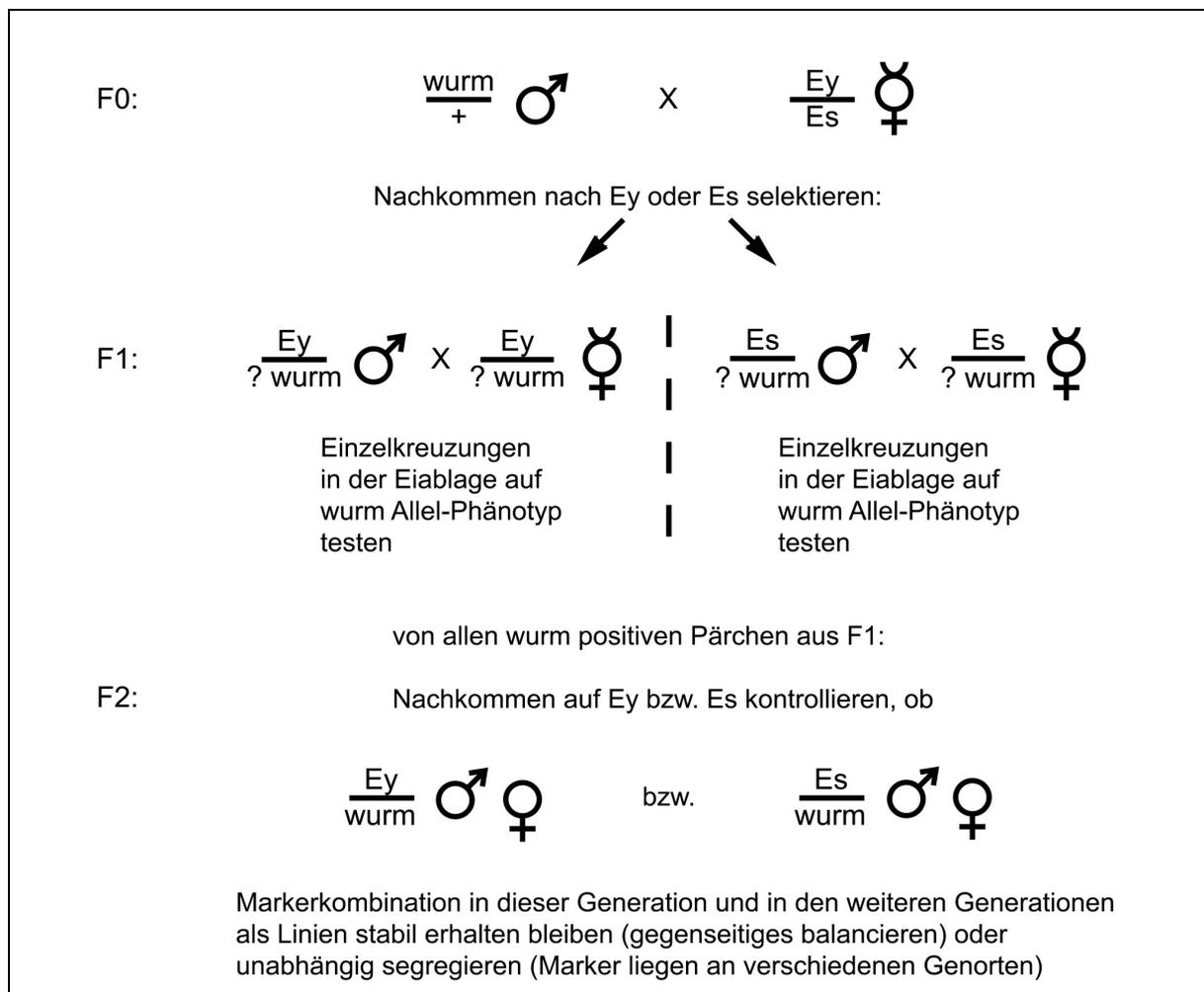


Abb. 3.11 Kreuzungsschema zum Test der Marker *Ey* und *Es* als Balancer für die Mutante *wurm*.

Alle drei Marker (*Ey*, *Es* und *wurm*) sind homozygot lethal, können also nur heterozygot übertragen werden. F0: Ausgangsgeneration; F1, F2: nachfolgende Generationen. Symbole für Männchen und unbefruchtete Weibchen (Jungfrauen).

Als weitere Kandidatengene wurden daher die von *HOM-C* unabhängigen Gene mit bekannter homöotischer Funktion in Betracht gezogen. Besonders *spalt* und *überlänge* schienen zueinander zu passen, da beide in *Drosophila* eine anteriore und eine posteriore Expression und Funktion an vergleichbarer Stelle haben.

3.2. Das *Tribolium spalt* Homolog *Tc'sal*

3.2.1. Einleitung

Außer den homöotischen Genen des HOX Komplexes gibt es einige weitere homöotische Gene, die die Identität von Segmenten bestimmen, z.B. das Kopfgene *cap'n'collar* (*cnc*) und die sogenannten region-spezifischen homöotischen Gene *forkhead* (*fkf*), *spalt* (*sal*) und das Rumpfgene *teashirt* (*tsh*) (Roder et al., 1992). Der Anlaß für die Suche nach *Tribolium spalt* war die Einstufung als ein Kandidatengene für die Mutanten *wurm* oder *überlänge*, besonders nachdem der Komplementationstest mit der *HOX-C* Defizienz und die Kartierung mit *Ey* und *Es* das *Tribolium* Homolog von *Abd-B* als betroffenes Gen ausgeschlossen hatten.

Spalt wurde als Mutante in dem in der Einleitung erwähnten *Drosophila* Screen entdeckt und von Jürgens als neuer Typ homöotischen Gens beschrieben (Jürgens, 1988). Der Phänotyp besteht aus subterminalen Veränderungen, wodurch hintere kopfspezifische Strukturen (PS1-2) in Prothorax, und vordere Telsonbereiche (PS14-15) in posteriores Abdomen transformiert werden. Im Kopf fehlen hauptsächlich Labialderivate, und maxillare Strukturen sind reduziert oder deformiert. Am Hinterende sind A8 Charakteristika, nämlich Filzkörper und Spirakelhaare, in A9 und A10 dupliziert. Für A9 und A10 typische Haarmuster und die analen Sinnesorgane fehlen oder sind modifiziert. *spalt* funktioniert also in beiden subterminalen Bereichen, anterior wie posterior, auf die gleiche Weise, indem es Rumpfidentität (PS3-13) unterdrückt. Jürgens beschreibt die Defekte als nicht vollständige homöotische Transformationen von Segmenten. Die auffälligsten Merkmale sind Fehlbildungen am Kopf und an den normalen Spirakeln. Durch umfangreiche Kreuzungen mit *Ant-C*, *Bx-C* oder *Polycomb* Mutanten konnte er zeigen, daß *spalt* unabhängig von diesen HOX Genen wirkt und immer in den gleichen Parasegmenten exprimiert bleibt, also von der Segmentierungskaskade direkt abhängt.

Die molekulare Charakterisierung des Gens gelang nicht auf Anhieb. Frei et al. (Frei et al., 1988) beschrieben zunächst ein für 142 Aminosäuren codierendes Transkript als *spalt* Gen. In P-Element vermittelten Experimenten glaubten die Autoren die bekannten *sal* Mutanten teilweise phänotypisch gerettet zu haben. Kühnlein et al. (Kühnlein et al., 1994) konnten aber zeigen, daß diese Interpretation falsch war und nannten dieses Protein in *sal-adjacent* (*sal-a*) um. In der Nähe fanden sie jedoch ein weiteres Transkript, das zeitlich und örtlich ähnlich

hauptsächlich weiterhin im ZNS, sowie im Tracheensystem zu sehen. Dort hat *spalt* nach Kühnlein (Kühnlein and Schuh, 1996) eine duale Funktion. Zuerst begrenzt die blastodermale Expression den Bereich, in dem Tracheenplacoden entstehen können auf die Parasegmente 4-13. Dies erfolgt vermutlich über die Repression des Gens *teashirt*. Im Stadium 10 sind diese 10 Tracheenanlagen zum ersten Mal erkennbar. Sie invaginieren im Stadium 11 als Gruppe von jeweils etwa 90 Zellen aus dem Ektoderm. In *spalt* Mutanten treten demzufolge in PS2 (Labium), PS3 (Prothorax) und PS14 (A9) ektopische Plakoden auf. In PS2 und 14 sind diese zwar etwas kleiner, verhalten sich aber ansonsten wie wt, das heißt sie invaginieren und verzweigen sich normal. Es handelt sich dabei um eine spezifische Veränderung, andere epidermale Defekte wurden nicht festgestellt. Die zweite Funktion betrifft später die Zellen innerhalb des sich bildenden Tracheensystems, die den dorsalen Strang formen (Franch-Marro and Casanova, 2002). Im gestreckten Keimstreif überlappt eine segmentale Expression von *sal* dorsal mit der Tracheenanlage. Diese verfeinert sich bis Stadium 14/15 auf die Zellen des dorsalen Strangs, der sich nach anterior und posterior ausbildet und mit den entsprechenden Ästen der vorhergehenden und nachfolgenden Segmenten fusioniert. Diese antero-posteriore Migration findet in *sal*-defizienten Embryonen nicht statt. Anhand von Färbungen mit Positionsmarkern für terminale Zellen, den ventralen Strang und den lateralen Strang der Tracheen wurde gezeigt, daß durch die fehlende *spalt* Expression die dorsalen Zellen ventralisiert werden und die Identität des lateralen Strangs annehmen. Andere, benachbarte Zellen verändern ihr dorso-ventrales Schicksal nicht. In der weiteren Entwicklung ist *spalt* nötig beim Zellwachstum und der Musterbildung zur Positionierung der Flügeladern in der Flügelscheibe.

Der *sal* Komplex erstreckt sich in *Drosophila* über ca. 140 kb und enthält drei Gene (Barrio et al., 1996). Auf der einen Seite *spalt-related*, in ca. 60 kb Abstand und gegenläufig orientiert *spalt* selbst, und weitere 30 kb daneben *spalt-adjacent* in der gleichen Ausrichtung wie *sal-r*. *sal-a* ist, wie oben erwähnt, ein Protein ohne *Spalt* Sequenzähnlichkeit, benutzt aber dieselben *enhancer* wie *Spalt* und ist daher sehr ähnlich exprimiert. *sal* und *sal-r* jedoch stammen aus einer Genduplikation und haben sich seitdem teilweise auseinanderentwickelt. *sal-r* ist weder per *in situ* noch mittels Antikörper im frühen Embryo zu detektieren. Im embryonalen ZNS und den posterioren Spirakeln überlappt die Expression beider größtenteils, und in der Flügelscheibe schließlich sind beide identisch reguliert und wirken auch redundant (Barrio et al., 1999; de Celis et al., 1996). Damit ähnelt der *sal* Komplex Loci wie *engrailed/invected* oder *achaete/scute*.

Spalt Gene gibt es auch in verschiedenen Vertebraten. 1996 wurde ein Maus und ein *Xenopus* Homolog *M'sal* und *X'sal-1* gefunden (Hollemann et al., 1996; Ott et al., 1996). Beide stimmen in ihren Hauptmerkmalen mit *Dm'sal* überein: die 3 weit auseinander

liegenden Doppelzinkfinger, der einzelne Zinkfinger im Anschluß an den 2. Doppelzinkfinger und die starke Konservierung der internen Doppelzinkfingersequenzen. Zusätzlich haben beide C-terminal einen weiteren 4. Doppelzinkfinger und N-terminal noch einen andersartigen einzelnen Zinkfinger vom CC/HC Typ. In beiden kommen jedoch verschiedene Splicevarianten vor, die z.B. den 4. Doppelzinkfinger eliminieren. Außerhalb der DNA-bindenden Zinkfinger gibt es zwischen den verschiedenen *sal*-Genen wenig Sequenzähnlichkeit, mit Ausnahme einer glutaminreichen Region am N-Terminus, die vermutlich als Aktivator-domäne dient. Die Exon/Intron-Struktur ist jedoch sehr konserviert. Inzwischen sind von Mensch, Maus, Krallenfrosch und Zebrafisch je 3 Paraloge bekannt, sowie vom Huhn zwei. Ein Vergleich von *Dm'sal*, *Dm'sal-r* und *X'sal-1* zeigt, daß die Finger- und nicht-Finger-Bereiche dieser drei Gene untereinander ähnlich konserviert sind. Die Werte liegen um die 70-85% bzw. 20-34% Proteinsequenzidentität. Vor allem die ersten 5 Zinkfinger, die vom zweiten und größten Exon kodiert werden, sind über alle Phylumgrenzen hinweg hochkonserviert. Es ist daher wahrscheinlich, daß *sal* und *sal-r* bereits kurze Zeit nach dem letzten gemeinsamen Vorfahren von Insekten und Vertebraten entstanden (Barrio et al., 1996); bzw. nachdem nun bis zu 3 Paraloge in Wirbeltieren bekannt sind, eventuell auch in umgekehrter Reihenfolge. Jedenfalls ist eine phylogenetische Zuordnung zu *sal* oder *sal-r* nicht möglich.

Die Expression von *spalt* findet man in Vertebraten hauptsächlich in diversen Bereichen des ZNS, desweiteren im Innenohr, im Herz, in den Beinknospen, und in Strukturen, die aus der Urogenitalleiste hervorgehen. Damit existiert tatsächlich eine gewisse Übereinstimmung mit der Expression und Funktion in *Drosophila* (embryonales und larvales ZNS, Flügelscheibe, Malpighiananlagen). Ob sich vor allem die neuralen Strukturen im ZNS homologisieren lassen ist noch nicht bekannt. Zumindest aber scheint *sal* in der Evolution in erster Linie ein Selektorgen für ektodermale Zellen zu sein, die sich in Nervengewebe differenzieren sollen. Eine homöotische Funktion könnte eventuell in der Maus vorhanden sein, wo *Spalt* im ersten und zweiten Branchialbogen gebildet wird und möglicherweise eine Positionsinformation für diese craniale Region vermittelt.

Die einzigen funktionellen Daten bei Vertebraten bisher stammen vom menschlichen *Spalt*-Gen *Hsal-11*. Mutationen darin führen zum Townes-Brocks Syndrom (TBS), einer autosomal dominanten Erbkrankheit mit variabler Ausprägung. Charakteristische Symptome sind Anomalien am Anus, an den Händen (Polydaktylie), den Beinen (Syndaktylie) und der Ohrmuschel. Desweiteren können bei den Patienten die Nieren fehlentwickelt sein und neurosensorische Taubheit auftreten (Kohlhase et al., 1999; Kohlhase et al., 1998).

3.2.2. Klonierung des *Tribolium spalt* Genes *Tc'sal*

Um aus dem Reismehlkäfer das *spalt* Homolog zu erhalten, wurde die für konservierte Gene bewährte Methode der Amplifikation mittels PCR und redundanten Primern gewählt.

In *Drosophila* wird der Leserahmen von 3 Introns unterbrochen. Das zweite, sehr große Exon enthält fast die gesamte Proteinsequenz mit dem ersten und zweiten Zinkfingerpaar, dem einzelnen Zinkfinger und dem größten Teil des dritten Zinkfingerpaares. Die Exon/Introngrenze verläuft durch die *Sal*-Box des C-terminalen Zinkfingers. Um bereits mit genomischer DNA eine spezifische Sequenz zu amplifizieren, wurden die Primer daher in das erste (I) und zweite (II) Zinkfingerpaar gelegt. Für die genaue Position wurden aus der Datenbank die homologen Sequenzen von *D. melanogaster*, *D. virilis* (Kühnlein et al., 1994), *Mus musculus* (Ott et al., 1996), *Xenopus laevis* (Holleman et al., 1996) und *D. melanogaster sal-related* (Barrio et al., 1996) zusammengestellt und daraus die günstigsten Stellen für die Lage der redundanten Primer ermittelt (siehe Material & Methoden). Zwei Primer im ersten Bereich (I/1 und I/4) wurden in Kombination mit einem Primer im zweiten Bereich (II/5) getestet. Mit der Primerkombination I/1 + II/5 wurden in der PCR zwei deutliche Banden der Größen 0,6 und 1,0 kb amplifiziert. Von 7 Bakterienklonen, die die 1,0 kb Bande enthielten, wurde die Sequenz bestimmt. Alle hatten die identische Basenabfolge mit einer maximalen Länge von 1050 bp. Die 0,6 Bande wurde später ebenfalls sequenziert, hatte aber keinerlei Ähnlichkeit mit *sal* ähnlichen Genen. Die Kombination I/4 + II/5 lieferte kein brauchbares Produkt.

Analyse der erhaltenen Sequenz

Für einen Ähnlichkeitsvergleich wurde die Sequenz in das BlastX Programm Version 2.2.4 bzw. 5 (National Center for Biotechnology Information: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) eingegeben. Die höchste Übereinstimmung ergibt sich mit der *spalt* Sequenz der Ameise *Pheidole morrissi*; dann folgen *spalt* aus *D. melanogaster*, eine anonyme Sequenz aus *Anopheles gambiae* und die verschiedenen Vertebraten *spalt* Gene aus *Xenopus laevis*, *Gallus gallus*, *Homo sapiens*, *Mus musculus* und *Oryzias latipes* (Medaka) (siehe Liste 1 im Anhang A.6). Wie zu erwarten gibt es einen stark konservierten Bereich am Anfang und am Ende, und dazwischen nur geringe Homologie.

In allen Auswertungslisten ist immer der Bereich zwischen dem 1. und 2. Doppelzinkfinger auch der, der am besten zur *Tribolium* Sequenz paßt. Dieser Bereich wurde also, wie geplant, spezifisch amplifiziert, obwohl natürlich große Übereinstimmung mit den anderen Zinkfingern besteht. *Dm'sal-r* erscheint erst an 29. Stelle nach allen anderen *spalt* Genen. Allerdings wurde von BlastX nur die vordere Sequenz bewertet und nicht ein ebenfalls gut übereinstimmender Teil weiter hinten. Ob dies weggelassen wurde, weil die Gesamtsequenz

hinsichtlich Lücken nicht ausreichend gut zuordenbar war, oder ob es sich um einen Programmfehler handelt, ist nicht zu erkennen. Dennoch bleibt selbst mit diesen Positionen eine geringere Ähnlichkeit zu *Tc'sal* als bei den anderen Insekten *spalt* Genen. *sal-r* liegt dann im Rahmen der Werte für die Wirbeltiere (Tabelle 3.13). Durch die außerordentlich hohe Identität zu Beginn der Teilsequenz ergeben sich insgesamt in der Blast Auswertung sehr niedrige Erwartungswerte für Zufallstreffer (E-Value) bei allen putativen *spalt* Homologen (Anhang A.6 Liste 1). Um die Beziehung der verschiedenen Sequenzen zueinander etwas genauer zu überprüfen, wurde *Tc'sal* in drei Teile zerlegt, einen hochidentischen vorderen, den variablen mittleren und den kurzen konservierten hinteren Abschnitt (Aminosäuren 1-76, 77-299, 300-350). Mit diesen Abschnitten wurde jeweils eine unabhängige BlastX Suche durchgeführt (Listen 2 - 4 im Anhang A.6 und Tabelle 3.13):

Das Ergebnis für den vorderen Bereich entspricht etwa dem der Gesamtauswertung (Liste 2). Die beste Übereinstimmung besteht mit *D. melanogaster* und *D. virilis*, danach folgen die Homologe und Paralogue von *Xenopus*, *Anopheles*, Mensch, Maus, *Gallus* und *Oryzias*. Lediglich die Ameise *P. morrisi* fällt hier auf Platz 29 zurück, was daran liegt, daß deren Genbankeintrag erst 28 Aminosäuren später beginnt. Danach folgt *Dm'sal-r* auf einem ähnlichen Rang wie in der Gesamtauswertung. Die Mitte ist wenig ergiebig und liefert, wenn überhaupt, nur 4 nennenswerte Treffer (Liste 3). Am besten paßt die Sequenz der Ameise, mit etwas Abstand eine 2. anonyme Sequenz von *Anopheles* (Genbank Acc.nr agCP2591) und zwei Einträge für den GABA-A Rezeptor. Alle anderen *sal* Sequenzen stimmen so wenig überein, daß sie von BlastX nicht aufgelistet werden. Die letzten 51 Aminosäuren liefern 7 Treffer (Liste 4). Mit großem Abstand, auch was das Ausmaß der Identität betrifft (siehe Tabelle 3.13), steht ganz oben wieder die Ameise. Anschließend kommen *Anopheles* und *Spalt-related* noch vor dem *Spalt* Protein von *D. melanogaster* und *virilis*. Die Sequenzähnlichkeit der drei konservierten Abschnitte und der Gesamtsequenz von *spalt* sind in Tabelle 3.13 zusammengestellt.

Seq.-Bereich in <i>T. castaneum</i> :	1 - 76		77 - 299		300 - 350		gesamt	AS
<i>Pheidole</i>	46/48	95%	56/220	25%	48/51	94%	158/409	38%
<i>morrissi sal</i>	48	100%	84	38%	50	98%	193	47%
<i>Drosophila</i>	66/76	86%			22/33	66%	128/373	34%
<i>melanogaster sal</i>	72	94%			27	81%	176	47%
<i>Drosophila</i>	66/76	86%			21/32	65%	143/432	33%
<i>virilis sal</i>	72	94%			27	84%	192	44%
<i>Anopheles</i>	59/66	89%			31/50	62%	123/351	35%
<i>gambiae</i> *	63	95%			39	78%	162	46%
<i>Xenopus</i>	56/69	81%			16/25	64%	96/279	34%
<i>laevis sal-1</i>	65	94%			21	84%	134	48%
<i>Xenopus</i>	58/69	84%					58/69	84%
<i>laevis sal-3</i>	66	95%					66	95%
<i>Gallus</i>	55/69	79%			15/25	60%	110/350	31%
<i>gallus sal-2</i>	65	94%			22	88%	147	42%
<i>Homo</i>	56/69	81%					56/69	81%
<i>sapiens sal-2</i>	65	94%					65	94%
<i>Mus</i>	56/69	81%					56/69	81%
<i>musculus sal-2</i>	65	94%					65	94%
<i>D. melanogaster</i>	46/65	70%			25/31	80%	46/65	70%
<i>sal-r</i>	55	84%			28	90%	55	84%

Tabelle 3.13 Vergleich von *Tc*'sal mit *Spalt* Proteinen anderer Organismen nach Berechnung durch BlastX.

In der oberen Zeile jeweils Angabe der identischen Aminosäuren/Gesamtsequenz, darunter die Anzahl der ähnlichen Aminosäuren, dahinter die entsprechenden Prozentangaben. (*) *A. gambiae* Genbanksequenz agCP14596; bei *Sal-r* von BlastX nur vorderer Abschnitt bei „gesamt“ berücksichtigt (siehe Text).

Die Spaltsequenzen der Arten *T. castaneum*, *D. melanogaster*, *D. virilis*, *Anopheles gambiae*, *Pheidole morrissi*, sowie *Dm*'sal-r und *Gg*'sal-2 wurden in Abb. 3.14 vergleichend zusammengestellt. Die erhaltene Käfersequenz beginnt 1 Aminosäure vor dem vermutlich 1. Zinkfingerpaar und endet 5 Aminosäuren vor dem 2. Zinkfingerpaar. Alle für *Spalt* beschriebenen Motive wie die beiden C₂H₂ Zinkfinger, die konservierten Aminosäuren S, A, L und R, der H/C link und die *Sal*-Box sind in *Tribolium* ebenfalls perfekt in diesem klonierten Zinkfingerpaar vorhanden und deuten darauf hin, daß es sich tatsächlich um ein Stück des *Tribolium spalt* Homologs handelt.

Tc'sal	1	-----RCRYCGKVFSGDSALQIHRSHTGERPYKCNV
P. morrisi	1	-----KCNV
Dm'sal	435	GEKSGEGKGRN-EPFFKHKRCRYCGKVFSGDSALQIHRSHTGERPFKCNV
Dv'sal	416	GDKSSDGKGRN-EPFFKHKRCRYCGKVFSGDSALQIHRSHTGERPFKCNV
A. gambiae	212	ANDKSSPNGRNDAALFKHKRCRYCGKIFGSDSSLQIHRSHTGERPYKCNV
Dm'sal-r	305	--EYASKEAQRGEIFKHKCKYCGKIFGSYSALQIHLSHTGERPFVKNV
Gallus sal-2	419	NVTAFEAKSNSDEAFKHKCRFCAKVFSGDSALQIHLSHTGERPFKCNV
Tc'sal	33	CGSRFTTKGNLKVHFQRHSAKFPPIKMNPVPEHLDDKYHPPLLAQLG--
P. morrisi	5	CGSRFTTKGNLKVHFQRHTAKFPPIKMNPNVPEHLDDKYHPPLLQQIASG
Dm'sal	484	CGSRFTTKGNLKVHFQRHAQKFPVPMNATPIPEHMDKFHPPLLDQMSPT
Dv'sal	465	CGSRFTTKGNLKVHFQRHAQKFPVPMNATPIPEHMDKFHPPLLDQMSPT
A. gambiae	262	CGSRFTTKGNLKVHFQRHSDKYPHIPMNPNPLQELFG-----
Dm'sal-r	354	CGSKFTTKGNLKVHYQRHTQIFPPMLLPVGVAPNVGHSGQGQVQGEQYPI
Gallus sal-2	469	CGNRFSTKGNLKVHFQRHKEKYPHIQMNPYPVPEHLDDNIPTSTGIPYGMS
Tc'sal	81	QQPSLSPGGPPP-----HMGFPGGH-----
P. morrisi	55	QRPMPSPPSPPPP-----SSHHPSLHPATTHGFLPPQP-----
Dm'sal	534	DSSPNHSPAPPP-----LGSAPASFPPAFPLQNLRYRPPMEI
Dv'sal	514	DSSPTQSPAPATGLPPPSTSTLTQMPSMSFASSPAPFPLGIYRPPMEL
A. gambiae	298	--AAAAAAAAAN-----DASARNPVDLSQMKKPVPEPP---
Dm'sal-r	404	RLPFAPPVAPVVGQ-----
Gallus sal-2	519	IPPEKPVTSWLDS-----
Tc'sal	101	PFPP-----PTSLPLYR-----PHGPPDLLNSRLQPSPHRPQDPPQRLFPP
P. morrisi	88	PIPLSLTLPNMTPLYRSQVINHRDDQDVPENLSKPAPQTSPTSPAAILNS
Dm'sal	571	LKSLGAAA-----PHQYFP-----QELPTDLRK---PS
Dv'sal	564	LKSLGATAGSTAGLPHFPFPQMPGLGAALKHTHDQSQDMPDLRKSSGSPS
A. gambiae	328	-----PA
Dm'sal-r	416	-----
Gallus sal-2	531	-----
Tc'sal	142	HPLFMK-----REEQEAPENLTKPARSPTPVRDTHCKSEISDE-----
P. morrisi	138	RHSFHDNLHHQHQQKQEQLEQREEIKLEQRSPG--QEYQQRPMREGAERI
Dm'sal	596	PQLDEDEPQVKNEPVE---EKDQREEHEQEMAECSEPEPEPLPLEVRIKE
Dv'sal	614	SPHEEEDNIAARLPVKSELMEEKTEHTMEAATRESAEMEPLPLEVRIKE
A. gambiae	331	PPREQ-----TPELRSMHSPDLSNDGPAQG-----TKIKQ
Dm'sal-r	416	-----EQHQNQVEEPEEIPVQAED-----LS
Gallus sal-2	531	-----KPVLSTLTTSVGLPLPPTIP-----
Tc'sal	179	--KREYDDAQSNNVQOITPK--QEPND---EGEHEPERYSSPAPYDECSI
P. morrisi	186	TPKREPEEAEEAVEEESD--FEDTTRRYLNSPQSVNPLSQPQTYEDCSM
Dm'sal	643	ERVEEQEQVKQEDHR----IEPRRTSPSPSEHR-SPHHHRHSHMGYPVV
Dv'sal	664	ERIDEDQMHLQEGMOKPEPLTAYATPHPQQCLIPTHAAAKSPRSLPLQC
A. gambiae	361	EPMEESLDLSDKSTK----VTGGSGRSTSTPIQHHRDMDESKDGSKED
Dm'sal-r	439	KPMVKEKEKSHSPVECVKTPKEVKTDAASLPSEKPEKEISKPVVTSSRN
Gallus sal-2	551	---SLTPFIKTEEPQPIPISSHPSASPPCSVKSDSGTADPTSKISNGLSDE
Tc'sal	222	DSKYS----NEDTLGARSPGGDHSENMQDE-----PENLSNKSNSITVP
P. morrisi	234	DSKISGRLEGDGEMEVDEETEEQPENLSGRGTVNRLPQQIVAYPGASPAS
Dm'sal	688	QPIQPAALMHPQSS-----PGSQSHLDHLPTPGQLPP---REDFFAE
Dv'sal	714	HARLSLWCSHPTTNSHACAVLTGSQTHLDQLPTPDNVPPTMPQREDFFAE
A. gambiae	407	HPMLDHSDDLKEHD-----NGGALGAGALSALNSSTS-----EK
Dm'sal-r	489	GSVRKRQTSAVSPPQE-----DRERDLVEHMNIAKLVR-----
Gallus sal-2	599	VEAGALPTSNGKMEEN-----PQNSNSVANMSSSVSSPAAD-----

Tc'sal	262	LSISTG--QRLPANFSFG-----QVNSPPSSTSSGSLGQFPATPVIDPA
P. morrisi	284	SSASSGSLQTSFAGILFPGPPAHHQIPHLPVSTQAGPT-ITSGTEMVDPN
Dm'sal	727	RFPLNFTTAKMLSPPEHSPVRSPPAGGALPPGVPPPPHHHPHHMARSPPFFN
Dv'sal	764	RFPLNFTS---KTDDHSPIRSPAG-----HAHAHIPRSPFFN
A. gambiae	441	EFPLKLKNN---SIENLATVPSSSG-----SLYQDTVLDPSFY
Dm'sal-r	522	-----SSASRESQPAEYS-----
Gallus sal-2	634	-----SGSGSIATFTNPLMP-----
Tc'sal	304	KDPAIYSNLLPRPGSNDNSWESLIEVTKTSETSKLQQLVDNIEHKLS---
P. morrisi	333	KDPAIYSTLLPRPGSNDNSWESLIEITKTSETSKLQQLVDNIEHKLSDPN
Dm'sal	777	PIKHEMAALLPRPHSNDNSWENFIEVSNTCETMKLKELMKNK--KISDPN
Dv'sal	798	PIKHEMAAFVPRPHSNDNSWENFIEVSNTSETMKLKELMKNK--KISDPN
A. gambiae	475	-----AAHLPRPDSNDSSWENFIEIS--SETSKLQELVDNIEHKTSSEP
Dm'sal-r	535	-----LAQMERIIDKSWEDLIEIDKTSETSKLQQLVDNIEHKLTDPN
Gallus sal-2	649	-----LMSEQFKAKFPFGGLLDSTPASETSKLQQLVENIDKKATDPN
Tc'sal	350	-----
P. morrisi	383	QCIVCHRVLSCKSALY-----
Dm'sal	825	QCVVCDRVLSCKSALQMHYRTHTGERPFKCRICG-RAFTTKGNLKTTHMAV
Dv'sal	846	QCVVCDRVLSCKSALQMHYRTHTGERPFKCRICG-RAFTTKGNLKTTHMAV
A. gambiae	518	QCLVKKVLSCRSALQMHYRVHTGERPFRCKICG-RSFTTKGNLKTTHMSV
Dm'sal-r	578	QCIFCQKVMSCRSALQMHYRTHTGERPFRCKICG-RAFATKGNLKAHMSI
Gallus sal-2	692	ECIICHRVLSCQSAKMHYRTHTGERPFKCKICG-RAFTTKGNLKTTHYSV
Tc'sal	350	-----
P. morrisi	398	-----
Dm'sal	874	HKIRPPMRNFHQCPVCHKKYSNALVLQQHIRLHTGEPDLDLTPDQIAAEI
Dv'sal	895	HKIRPPMRNFHQCPVCHKKYSNALVLQQHIRLHTGEPDLDLTPDQIAAEI
A. gambiae	567	HRIKPPMRTLHQCPVCHQKFSNIFVLQQHIRLHTGEMDLDLTPDQIAAEI
Dm'sal-r	627	HKIKPPMRSQFKCPVCHQKFSNGIILQQHIRIHTMDDGSGGQGVPAANPG
Gallus sal-2	741	HRAMPPLRVQHSQPCICQKFTNAVVLQQHIRMHMGQIPNTPVTENYPES

Abb. 3.14 Alignment der spalt Sequenz aus *Tribolium castaneum* zu verschiedenen in der Datenbank vorhandenen Einträgen.

Dargestellt ist der Bereich vom ersten bis zum zweiten Zinkfingerpaar (konservierte Blöcke); erzeugt mit ClustalX 1.82 (Standardeinstellungen) (Thompson et al., 1997) und manueller Nachkorrektur (mit Hilfe von (Barrio et al., 1996)). Farben wie in Abb. 3.11: rot = Zinkfinger, gelb = konservierte Aminosäuren, grün = H/C link, blau = Sal Box, dunkelgrau = identische Aminosäuren, hellgrau = ähnliche Aminosäuren (mindestens 70%), *Anopheles gambiae* Sequenz agCP14596.

Verwandschaftsanalyse des *Tribolium spalt* Genabschnittes im Vergleich zu den anderen *spalt* Genen

In die phylogenetische Analyse wurden die wichtigsten Insekten-Spaltgene aufgenommen, dazu *Dm'spalt-related* und als Außengruppe *spalt-2* aus dem Huhn (Abb. 3.15). Wie erwartet sind die Sequenzen der Ameise und des Käfers am nächsten miteinander verwandt. Außerdem sind die beiden *Drosophila spalt*-Gene einander zugeordnet. Das Mückengenpaar paßt zwar besser zu *Tribolium/Pheidole* als zu den Fliegen, rundet aber die Insekten-Spalt-Gengruppe ab. *Dm'sal-r* liegt ähnlich weit entfernt wie Huhn *sal-2* und liefert damit ein weiteres Indiz, daß es sich bei der Triboliensequenz um ein *spalt-major* Homolog handelt und daß *Dm'sal-r* eine sehr alte Duplikation ist.

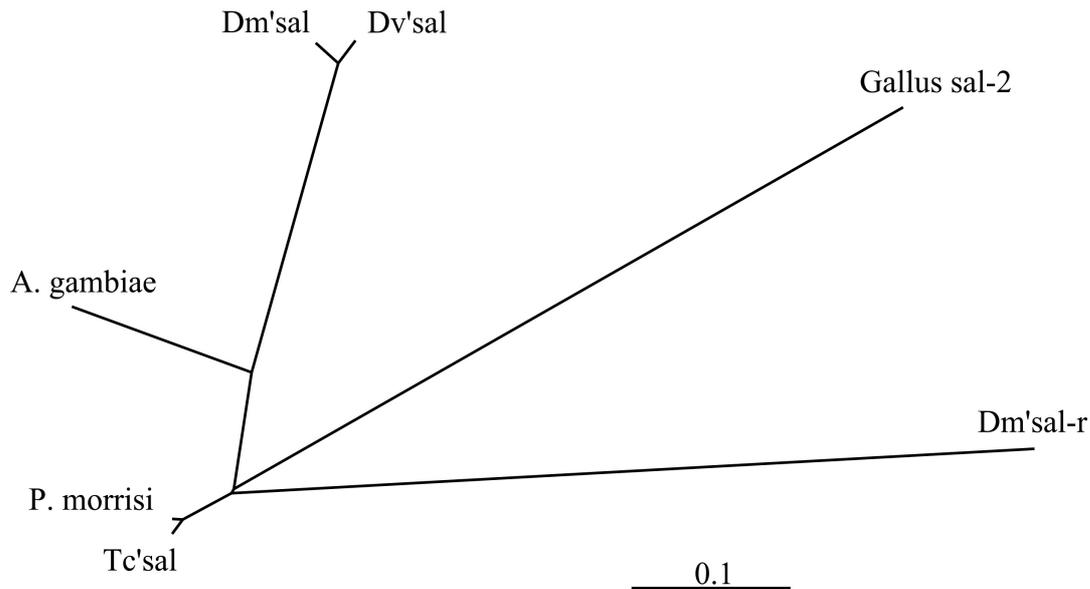


Abb. 3.15 Ähnlichkeitsvergleich der *spalt*-Gene erstellt mit Phylip (Protdist und Neighbor joining).

(Felsenstein, 1989) (<http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html>). Die Länge der Strecke zwischen zwei Sequenzen entspricht dem relativen phylogenetischen Abstand.

3.2.3. Expression von *Tc'sal*

Die früheste Expression von *spalt* in *Tribolium* ist ein Streifen während des *posterior pit* Stadiums (Abb. 3.16 A). Dieser Ring bei ca. 25% Eilänge wird ventral unterbrochen, wo bereits das Mesoderm spezifiziert zu sein scheint. Im Bezug auf den Embryo selbst liegt der Streifen etwa in der Mitte der Keimscheibe (Abb. 3.16 B). An den Falten seitlich des Mesoderms ist sowohl zu diesem Zeitpunkt (Abb. 3.16 C), als auch beim späteren segmentalen Muster eine stärkere Expression zu beobachten. Mit beginnendem Wachstum des Embryos ist das Mesoderm vollständig invaginiert und der *spalt* Streifen erscheint durchgehend (Abb. 3.16 D).

Mit Hilfe von *sal/eve* Doppelfärbungen wurde die Position des Streifens genauer bestimmt. Der Vorderrand von *spalt* stimmt im *posterior pit* Stadium und im kurzen Keimstreif ungefähr mit dem *eve 1a* Streifen überein (Abb. 3.16 E). Im Vergleich mit *giant* ist zu sehen, daß beide etwa dieselbe anteriore Grenze haben (Abb. 3.16 F). Bucher (Bucher, 2002) sieht diese Grenze im kurzen Keimstreif als segmental an. Der *sal* Streifen ist deutlich breiter als *giant* und reicht hinten bis zum *eve 2a* Streifen, bzw. überlappt mit diesem (Abb. 3.16 G). Da die Expression von *spalt* im Keimstreif ansonsten parasegmental ist, erstreckt sich diese erste Domäne wahrscheinlich über genau 2 Parasegmente (PS1 und 2 oder Mdp/Mx/Lba). Später erscheint posterior ein zweiter Streifen ab dem vierten *engrailed* Streifen (T1p/PS4), der das segmentale Muster einleitet. PS3 scheint keine oder nur geringe *spalt* Expression zu haben. Ebenso zeigt sich zu diesem Zeitpunkt eine Kopfdomäne antero-ventral im Bereich der

Kopflappen (Abb. 3.17 A). Diese ist annähernd dreieckig, bleibt während des Keimstreifwachstums in etwa erhalten und zerfällt dann in kleinere Bereiche. Im Verlauf des Längenwachstums verblassen die vordersten segmentalen Streifen nach und nach, während vor dem Bereich der sogenannten Wachstumszone kontinuierlich neue gebildet werden (Abb. 3.17 B), die in den *engrailed* Domänen jeweils stärker und länger exprimiert werden als im restlichen Segment. Je nach Stärke der Färbung sind also im hinteren Bereich immer 2-4 Streifen zu sehen, sowie eine in die Wachstumszone hineinreichende Färbung. Diese gabelt sich nach posterior, vermutlich da dort das Mesoderm noch nicht invaginiert ist (Abb. 3.17 B, C). Sobald der 10. und letzte *engrailed* Streifen erscheint, verschwindet auch dieses gegabelte Muster und es bleibt eine gut ein Segment breite Domäne, die vom 9. *engrailed* Streifen (A9p) bis hinter den 10. Streifen reicht (A10p oder A11a), also in PS15 und PS16 liegt (Abb. 3.17 D und E). Schon kurz vorher, ungefähr wenn der 8. *engrailed* Streifen zu sehen ist, beginnt die dorsale Expression von *spalt* von anterior nach posterior. Im flachen Keimstreif liegt das dorsale Ektoderm an beiden Seiten außen. Dadurch entsteht ein umlaufender Rand ab dem 1. thorakalen Segment (Abb. 3.17 C). Dieser ist zunächst anterior in jedem Segment stärker und wird dann gleichmäßig. Die eben beschriebene ein Segment breite Abschlußdomäne verschmälert und verschärft sich zunehmend auf einen Bereich kurz hinterhalb des 10. *engrailed* Streifens (A11a) und schließt die dorsale Expression posterior ab (Abb. 3.17 F). Zu diesem Zeitpunkt hat der Keimstreif seine volle Länge erreicht. Zu Beginn der Keimstreifverkürzung ist damit die anteriore Seite des Proctodeums gefärbt (Abb. 3.17 G). Während der Verkürzung wandelt sich dieses Muster im Proctodeum zu einem Ring von 6 Punkten (wahrscheinlich Malpighigefäße) und die Nervensystemexpression beginnt von anterior. Außerdem erscheint ein medianer Ring in der Antenne und eine distale Expression in der auswachsenden Mandibel (Abb. 3.17 H). In der Phase des dorsalen Rückenschlusses verstärkt sich diese Mandibelexpression (Abb. 3.17 I) und zusätzlich bilden sich, wieder von anterior nach posterior, laterale Cluster von *spalt*-positiven Zellen in den Rumpfsegmenten, die den Tracheenplacoden entsprechen könnten (Abb. 3.17 J). Zum Ende der Embryonalentwicklung hin hat sich ein hoch komplexes *spalt*-Expressionsmuster gebildet (Abb. 3.17 K).

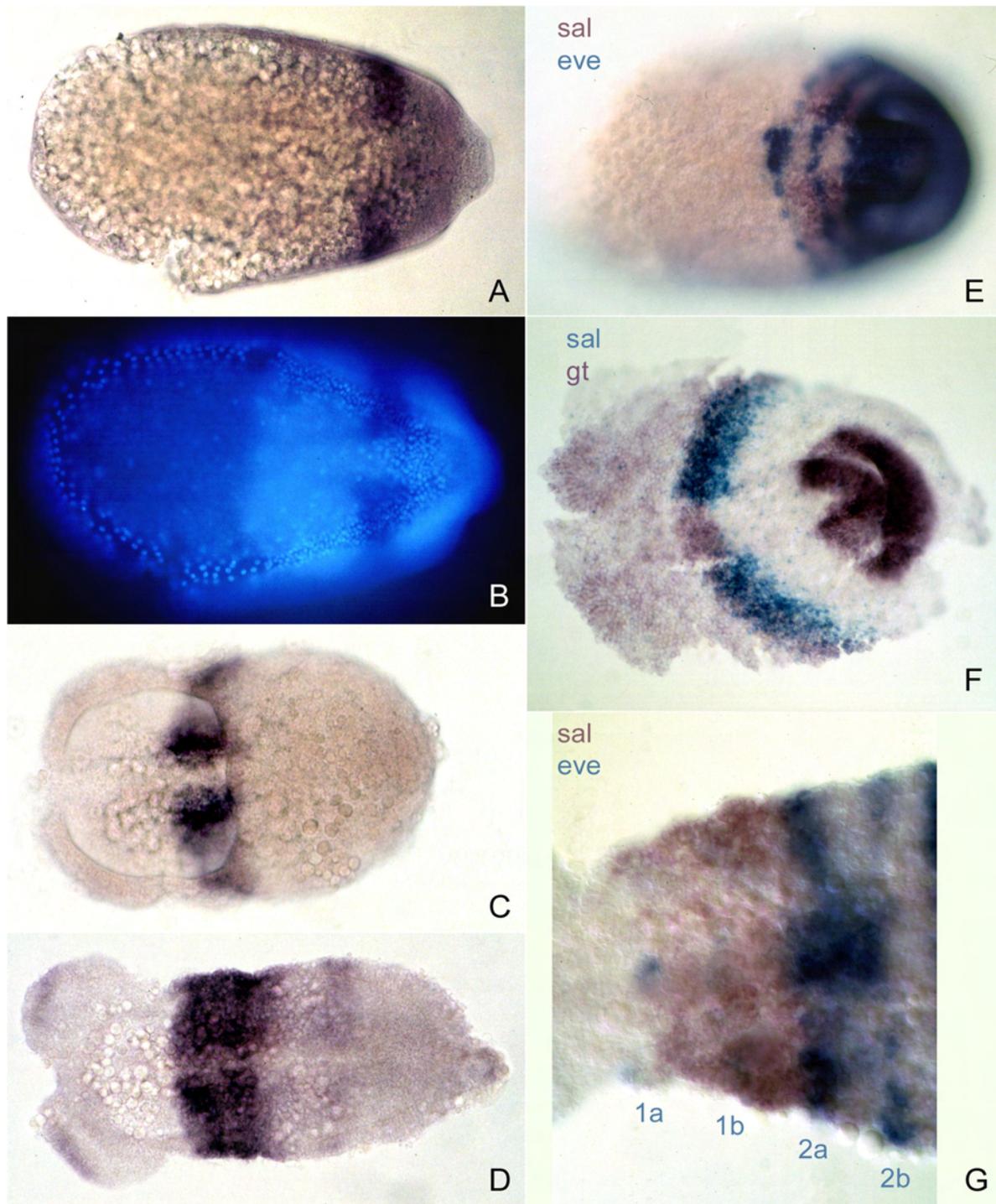


Abb. 3.16 *In situ spalt* Einfärbung (A, C, D) oder Doppelfärbung mit *even-skipped* (blau) (E und G) bzw. mit *giant* (F) (braun; *spalt* = blau) in der frühen Embryonalentwicklung. (A) Im *Posterior pit* Stadium tritt *Sal* Färbung als Ring auf, der im Bereich des späteren Mesoderms unterbrochen ist. (B) Hoechst 33342 Färbung desselben Embryos, um den Umfang der Keimanlage deutlich zu machen. (C) „Pantoffelstadium“ mit halbgeschlossenem Amnion. (D) Beginnendes Keimstreifenwachstum, vordere Expression noch deutlich, während weiter posterior der erste Streifen des segmentalen Musters gebildet wird. (E) Etwas späteres Stadium als in (A). Die Keimscheibe invaginiert von posterior in den Dotter. Der erste *eve* Streifen hat sich schon in die beiden sekundären, segmentalen Streifen aufgelöst, der zweite ist noch doppelsegmental. (F) Stadium ähnlich wie in (E). *gt* und *sal* überlappen und haben dieselbe Vordergrenze. Der *sal* Streifen ist jedoch ca. 50% breiter. (G) Vergrößerung aus einem Embryo mit beginnendem Keimstreifenwachstum. *eve* Streifen 1a und 1b sind nur noch schwach zu erkennen, auch *eve* Streifen 2 ist bereits in 2a und 2b aufgetrennt. Wie in (E) reicht die *spalt* Domäne von *eve* 1a bis *eve* 2a oder wahrscheinlich in *eve* 2a hinein. Alle Embryonen liegen mit anterior nach links und mit ventral nach oben.

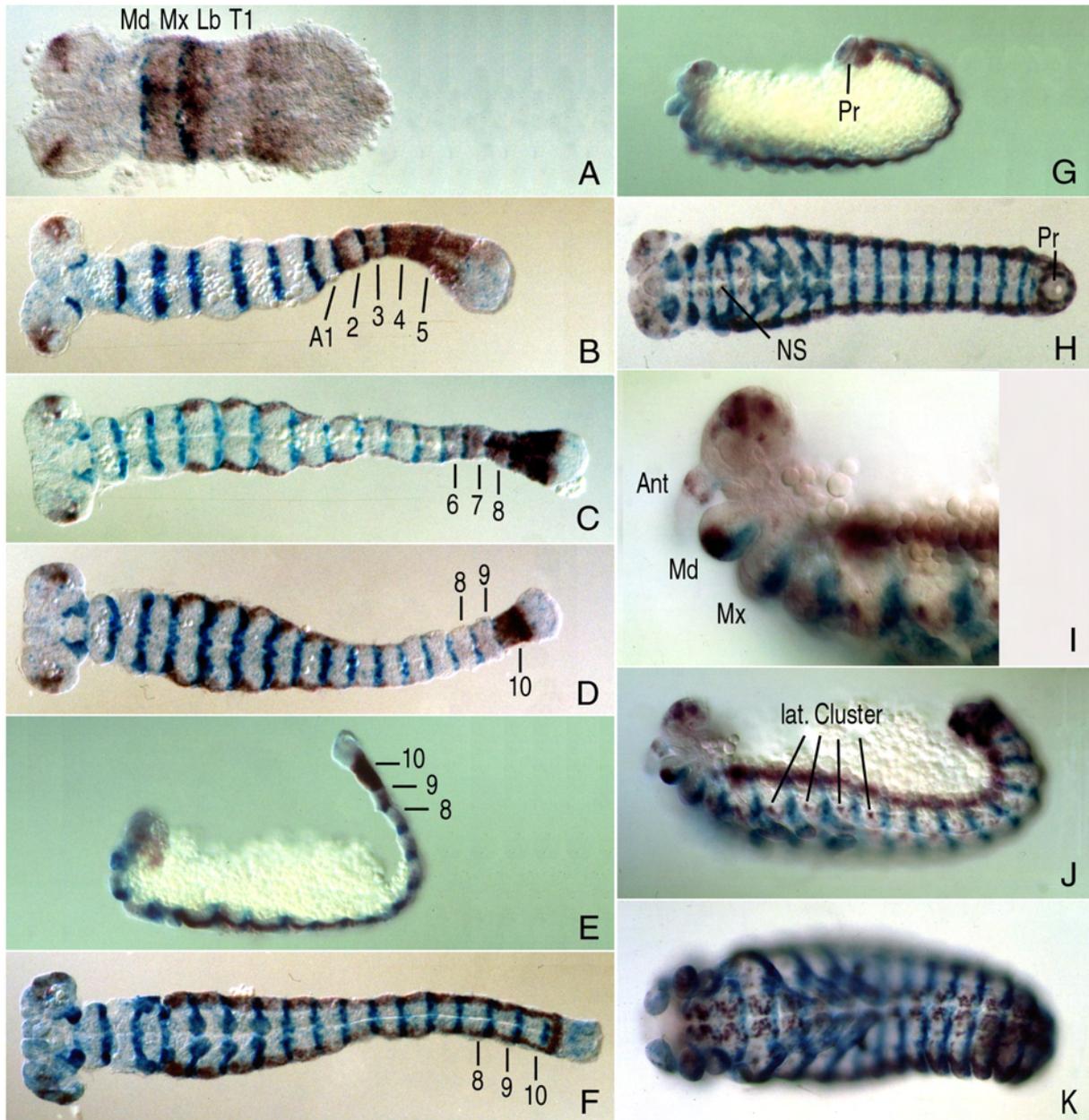


Abb. 3.17 *In situ* Doppelfärbungen mit *spalt* (braun) und *engrailed* (blau) im Laufe der *Tribolium* Embryonalentwicklung.

Die *en*-Streifen markieren jeweils den posterioren Abschnitt eines Segmentes bzw. den anterioren eines Parasegmentes: (A) Beginnendes Keimstreifwachstum mit Übergang zum segmentalen *spalt* Muster; die *Mdp/Mx/Lba* (PS1 und 2) Domäne verblaßt, in PS3 keine oder sehr geringe Expression, neuer Streifen ab T1p (PS4). (B und C) Bildung von A5, A6, bzw. A8, A9; Färbung jeweils in den letzten 2-4 Segmenten und in die Wachstumszone hineinreichend. (D und E) Segmentierung abgeschlossen; Expression in A9p-A10p (PS15 und 16). (F) Dorsale Expression als umlaufender Rand vollständig von Lbp-A11a (PS3 bis hinter PS16) mit einer Verbindung posterior in A11a. (G) In der Lateralansicht ist der vordere Teil des Proctodeums mit *spalt* gefärbt. (H) Keimstreif verbreitert und verkürzt, von anterior beginnende Nervensystemexpression; im Proctodeum Ring aus 6 markierten Punkten. (I und J) Beginnender Rückenschluß. *Spalt* erscheint als Ring in der Antenne, distal an der Md und in punktförmigen, lateralen Clustern. (K) Komplexes Nervensystemmuster.

3.2.4. pRNAi von *Tc'spalt*

Um die Funktion von *spalt* in *T. castaneum* zu untersuchen, wurde doppelsträngige *sal*-RNA in weibliche Puppen vom Stamm SB injiziert, um in deren Nachkommen genspezifische Phänotypen zu bekommen (Bucher et al., 2002). Drei verschiedene Konzentrationen wurden verwendet. Mit der niedrigen Konzentration von 0,2 µg/µl schlüpfen 16 adulte weibliche Käfer, bei der höheren Konzentration von 2 µg/µl 21 Käfer, und bei der höchsten Konzentration von 4 µg/µl 22 Käfer. Diese wurden mit SB Männchen auf Vollkornmehl verpaart und bei 32°C ca. alle 2 Tage abgesiebt. Nachdem die Embryonen sich bei 32°C drei Tage lang fertig entwickeln konnten, wurden sie in Hoyers/Milchsäure oder in Milchsäure/Ethanol eingebettet, um die Kutikula zu untersuchen. Die Auswertung erfolgte am Lichtmikroskop oder am konfokalen Laserscanningmikroskop.

Mittels der parentalen RNA-Interferenz konnten 4 verschiedene phänotypische Aspekte beobachtet werden, die verschiedenen Funktionen von *Tc'spalt* entsprechen. Derjenige mit der höchsten Penetranz betrifft die Stigmen, die in fast allen Embryonen verändert waren. Diese bestehen normalerweise aus einem runden, sklerotisierten Ring von dem der Tracheenhauptast jedes Segments ausgeht, um dann weiter im Körperinneren zu verzweigen (Abb. 3.18 D). In den *sal*⁻ Embryonen ist diese Öffnung an T2 und im Abdomen unregelmäßig vergrößert und bildet eine Art trichterförmige Vertiefung ohne den sklerotisierten Ring (Abb. 3.18 E). Der darunterliegende Hauptast des Tracheennetzwerkes und Verästelungen sind vorhanden. Ob diese dem Verzweigungsschema im Wildtyp entsprechen, wurde bisher nicht geklärt. Die zweithäufigste Veränderung liegt am Abdomenende. Die Pygopodien sind gering entwickelt oder fehlen ganz (Abb. 3.18 A und E).

Die „erwarteten“ homöotischen Phänotypen wurden nur relativ selten beobachtet: Posterior wird hinter A8 eine zusätzliche Tracheenöffnung angelegt, die allerdings etwas kleiner und schwächer ausgeprägt ist als die davor liegenden (Abb. 3.18 A und E). Ein abgehender Ast ist zu sehen, ob es weitere Verästelungen gibt, ist bisher nicht zu erkennen. Ansonsten ist die Körperform am Abdomenende, abgesehen von den Pygopodien, unverändert (Abb. 3.18 A) im Vergleich zum wt. Im anterioren Bereich ist am Labium keine Veränderung festzustellen. In der Maxille jedoch tritt bei einigen Embryonen ein mandibelähnlicher Zahn im Bereich der Mala, dem Endit der larvalen Maxille auf, und drückt den Telopodit/Maxillarpalpus nach außen (Abb. 3.18 C). Die sensorischen Strukturen an der Spitze des Enditen sind deutlich reduziert, der Palpus selbst hingegen ist nicht betroffen. Die beschriebenen Phänotypen traten bereits bei Konzentrationen von 0,2 µg/µl auf. Weitere pRNAi Versuche mit 2 µg/µl und 4 µg/µl erbrachten keine qualitative Veränderung oder neue Phänotypen. Die Fehlbildungen traten etwas häufiger auf, aber weder im Abdomenende, noch an der Maxille konnte eine weitergehende oder vollständige homöotische

Transformation erreicht werden. Lediglich Deformationen oder die Reduktion von Maxillarstrukturen nahmen zu und führten zu einer auffälliger veränderten Kopfform.

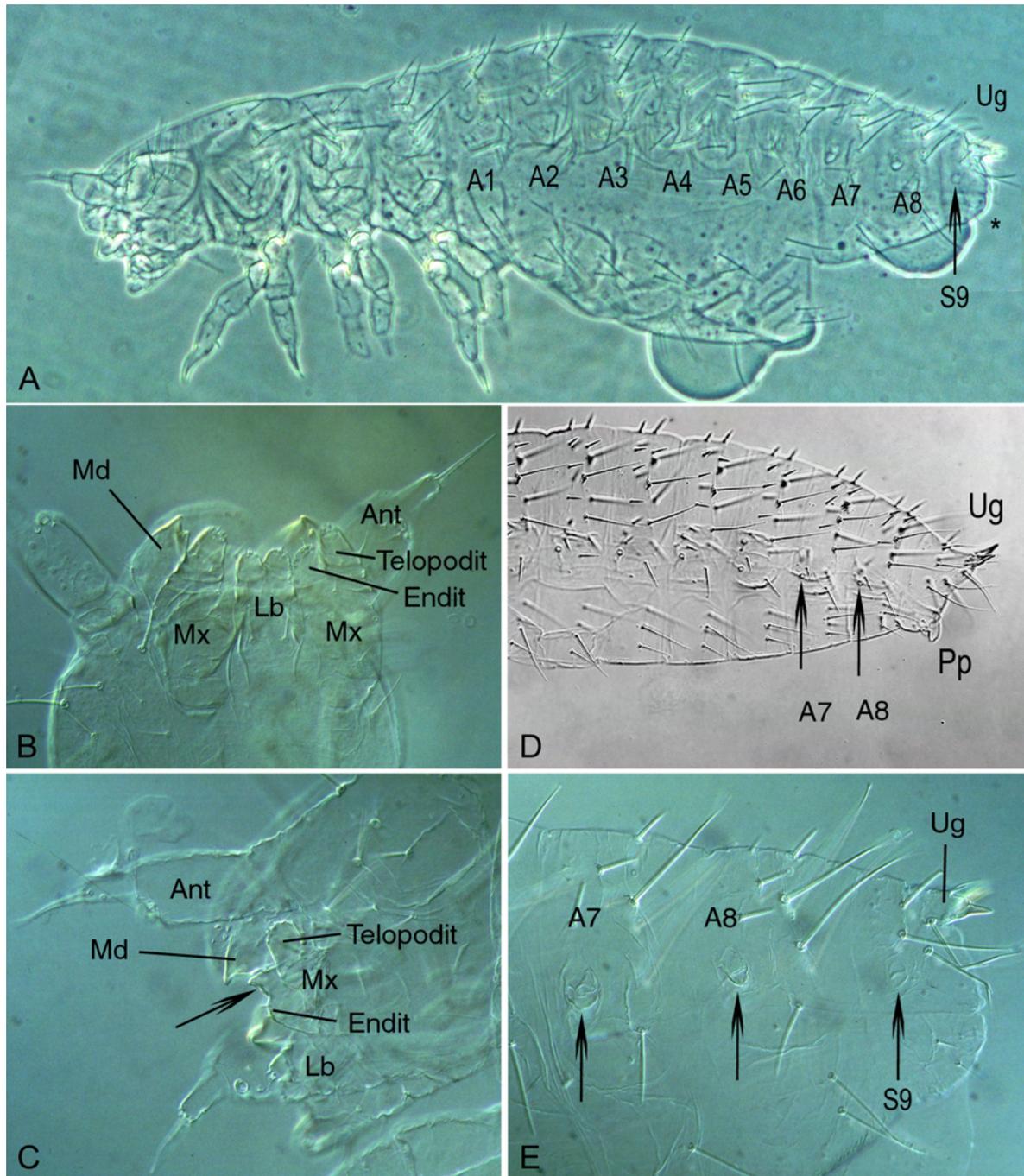


Abb. 3.18 *Tc'spalt* dsRNAi Kutikulaphänokopie.

(A) Kutikulapräparat eines Embryos aus der pRNAi (im Abdomen aufgerissen) mit dem zusätzlichen Stigma (S9) posterior des 8. abdominalen Segmentes (A8) und den fehlenden Pygopodien (*). In B und C, Mundwerkzeuge des Wildtyps (B) im Vergleich mit der *sal*⁻ Phänokopie (C). Alle Mundwerkzeuge, außer der Maxille (Mx) sind normal ausgebildet. Der Pfeil in C zeigt auf den Mandibel-ähnlichen Zahn zwischen dem Enditen und dem Telopoditen der Maxille. Der Endit ist fast vollständig reduziert. Der Telopodit wird nach außen gedrückt. D und E, Abdomenende von wt (D) und *sal*⁻ (E). Die Pfeile deuten jeweils auf die Stigmen, die in wt klein, rund und sklerotisiert sind, und in *sal*⁻ nur als sackartige Vertiefungen zu erkennen sind (auch S9). Die Urogomphi (Ug) sind vorhanden, die Pygopodien (Pp) fehlen, während das Haarmuster unverändert zu wt ist. (Ant) Antenne, (Lb) Labium. A, C und E stammen von verschiedenen Embryonen. Ansicht ist von lateral, anterior nach links, außer (B und C) von ventral und (B) anterior nach oben.

3.3. Diskussion

Homöotische Genfunktionen im Käfer *Tribolium castaneum*

Die beiden in dieser Arbeit vorgestellten EMS-Mutanten *wurm* und *überlänge* weisen homöotische Transformationen am Hinterende der Embryonen auf. Wie im Ergebnisteil beschrieben läßt sich der pleiotrope Phänotyp von *wurm* aus 4 verschiedenen Entwicklungsstörungen zusammensetzen. Dazu gehört die eigentliche homöotische Transformation der Segmente A9-A11 in „normale“, nicht mit dem Telson fusionierte, abdominale Segmente wie z.B. A8. Zweitens gibt es zahlreiche Defekte im Haarmuster der Kutikula, wodurch einzelne Elemente in andere umgewandelt werden und weitere ektopisch auftreten. Ein dritter Aspekt betrifft die Ausbildung der Tracheenöffnungen. In Mutanten ist ein Teil davon unregelmäßig geformt und geringer sklerotisiert. In mehr als der Hälfte der Embryonen mit *wurm*-Phänotyp schließlich kommt es zu Asymmetrien bei der Segmentierung der posterioren Hälfte des Abdomens. Dabei sind Segmente halbseitig fusioniert oder deletiert und überzählige Segmente oder Halbsegmente werden an das Ende des Embryos angehängt. In der Mutante *überlänge* wird das Segment A9, wie in *wurm*, nach A8 transformiert. A10 wird in seiner Identität allerdings nur schwach nach A8 verändert und weist unvollständig ausgeprägte Stigmen auf. Ein Telson ist, im Gegensatz zu *wurm*, vorhanden. Zusätzlich gibt es in *überlänge* einen anterioren Phänotyp. T1 trägt ein Paar Stigmen, ist ansonsten aber unverändert.

Diese Phänotypen wurden mit den bekannten Phänotypen der Homöoboxgene von *Drosophila* und *Tribolium* verglichen. HOX Gene sind eine Gruppe verwandter Transkriptionsfaktoren mit einer charakteristischen DNA bindenden Domäne, der Homöodomäne. Sie sind nicht für die Anlage, sondern für die Identität von Segmenten entlang der antero-posterioren Achse verantwortlich. In der Regel liegen sie hintereinander aufgereiht im Genom vor und werden auch in dieser Abfolge im Organismus exprimiert (Kolinearität). Eine weitere Eigenheit ist, daß weiter posterior aktive Gene dominant über die mehr anterioren Faktoren sind, indem sie deren Expression oder Funktion unterdrücken. HOX Gene sind in allen Arthropoden und Vertebraten vorhanden und wurden intensiv analysiert, in der Hoffnung mit ihnen die Evolution der verschiedenen Bauplantypen erklären zu können (siehe Review (Hughes and Kaufman, 2002)). Im Gegensatz zu anderen Organismen (wie z.B. auch *Tribolium*) ist in *Drosophila* der homöotische Genkomplex in zwei Teile gespalten: der Antennapedia-Komplex (*Antp-C*) mit den Genen *labial (lb)*, *proboscipedia (pb)*, *Deformed (Dfd)*, *Sex combs reduced (Scr)* und *Antennapedia (Antp)*, sowie der Bithorax-Komplex (*Btx-C*) mit *Ultrabithorax (Ubx)*, *Abdominal-A (Abd-A)* und *Abdominal-B (Abd-B)*. Diese Gene werden durch die Gap- und Paarregelgene aktiviert (siehe z.B. auch (Denell et al., 1996)).

Der HOX Genkomplex ist auch in *Tribolium* das am besten untersuchte Regulationssystem. Der gesamte Abschnitt ist sequenziert (Brown et al., 2002a), die zu *D. melanogaster* homologen Gene sind bekannt, und für alle sind Mutanten oder RNAi Phänokopien bekannt (Bennett et al., 1999; Brown et al., 2000; Curtis et al., 2001; DeCamillis et al., 2001; Denell et al., 1996; Lewis et al., 2000; Shippy et al., 1998; Shippy et al., 2000a; Shippy et al., 2000b; Stuart et al., 1993). In Abbildung 3.19 sind zur besseren Orientierung die Hauptexpressionsdomänen und die Phänotypen der Null-Mutanten zusammengefaßt.

Der Thorax wird hauptsächlich von *Tc'Antp* geprägt. In Mutanten werden die Beine nach Antenne transformiert, T2 verliert das Stigma und die Segmente fusionieren bei gleichzeitiger Reduktion der dorsalen Seite. Anterior hat *Sex combs reduced* einen Einfluß auf die Segmentgrenze von Lb/T1, die in Mutanten fehlt. Posterior davon modifiziert *Ultrabithorax* PS5 und 6 (T2p-A1a). In *Ubx* Null-Allelen werden diese nach PS4 transformiert, das heißt T3 erhält ein Stigma und A1a Beinidentität (es enthält ein unvollständiges A1 Bein).

Ubx ist auch im gesamten Abdomen exprimiert, hat aber nur einen schwachen Phänotyp mit zusätzlichen und verdoppelten dorsalen Setae. Die Hauptdeterminante im Abdomen ist *Tc'Abd-A* und im posterioren Abdomen (A9-A11) *Tc'Abd-B*. Ein Fehlen von *Tc'Abd-A* (Allel *A¹⁰*) läßt wiederum unvollständige Beine entstehen, die in diesem Fall aber anterior durch *Ubx* Pleuropodien sind und posterior Bein (PS7-13 wird also zu PS6 und entsprechend A8p zu T3p). Die zunächst einzig bekannte *Abd-B* Mutante im Käfer, *eu*, führt zu einem weiteren Paar von Urogomphi hinter den ursprünglichen (*extra urogomphi*).

Abb. 3.19 Schematische Zusammenfassung der HOX-Genbefunde in *T. castaneum*.

In der Mitte ist eine Triboliumlarve skizziert (ventrale Ansicht, nur die Extremitäten einer Seite eingefügt). Gestrichelt eingezeichnet sind die postabdominalen Segmente, die später mit dem Telson fusionieren. Über der Skizze ist der Ausfallphänotyp der verschiedenen HOX-Gene angegeben, mit jeweils einem Balken, der den Bereich der Störung angibt. In der schematisierten Larve ist die dazugehörige Expression farbig eingetragen. Gepunktet bedeutet, daß die Expression nur in Teilen des Segmentes auftritt; gestreift aufgeführt ist die transiente Expression im Verlauf des Keimstreifwachstums eingezeichnet. Unter dem Raster für die Segmente und Parasegmente befinden sich die entsprechenden Angaben für das Gen *Tc'spalt* und die beiden Mutanten *wurm* und *überlänge*.

Die EMS-Mutante *wurm*^{10b17} hat keine Gemeinsamkeit mit Mutanten von *Abd-A* und kaum Übereinstimmung mit *Ubx*, sondern entspricht mit ihrer homöotischen Transformation von A9-A11 ungefähr einem zu erwartenden Phänotyp für *Abd-B*, auch wenn die Mutante *eu* hier zunächst etwas irreführend war. Diese ist mittlerweile als *gain-of-function* (GOF) Mutation eingestuft (Theresa Shippy, pers. Mitteilung). Durch persönliche Mitteilung von Sue Brown, Kansas State University wissen wir inzwischen, daß *wurm* grundsätzlich die gleiche homöotische Transformation aufweist, wie die dsRNAi Phänotypen von *Tc'Abd-B*. Bisher sind dazu aber keine Bilder oder genauere Daten veröffentlicht.

In *Drosophila* hingegen hat *Abd-B* nicht nur eine Funktion in A8p-A11, sondern auch weiter vorne im Abdomen (A4p-A8a; PS10-13). In einer entsprechenden Mutante werden PS10-13 nach PS9 transformiert. Daher wurde zunächst angenommen, daß das HOX-Gen *Abd-B* allgemein bestimmend sowohl für das hintere Abdomen als auch den Schwanzbereich sei. Durch die molekulare Analyse konnte dann aber gezeigt werden, daß durch verschiedene *enhancer*/Promotor Kombinationen zwei unterschiedliche Splicing-Varianten exprimiert werden, die jeweils im Abdomen (Elemente *iab 5-7*; bezeichnet als morphogenetische Funktion (m) von *Abd-B*) oder im Postabdomen wirken (*iab 8* und *9*; bezeichnet als regulatorische Funktion (r)) (Boulet et al., 1991).

Also scheint in *Tribolium* nur die hintere, die r-Funktion vorhanden zu sein, wodurch Akams Hypothese der metameren Expressionsdomänen bekräftigt wird (Akam et al., 1988). Danach entstanden schon früh in der Evolution, im Vorläufer der Myriapoden/Insekten, Abdomen und Postabdomen unabhängig voneinander. Dabei war das *Ubx/Abd-A* Vorläufergen für die Identität des Abdomens und ein entsprechendes *Abd-B* und/oder *caudal* Gen für die des Postabdomens mit den Genital- und Analplatten verantwortlich. Die in *Drosophila* vorhandene m-Funktion ist abgeleitet, entstand daher erst später und sollte nicht in ursprünglicheren Insektengruppen zu finden sein. Diese Annahme spiegelt sich auch in den Expressionsdaten wider. Im phylogenetisch basalen Insekt *Schistocerca* wird *Abd-B* im Postabdomen exprimiert noch bevor eine Segmentierung erkennbar ist. Später breitet sich dieses Signal von A11 nach anterior bis A9p (PS15) aus, und abgeschwächt auch bis A8p (PS14). Parallel dazu tritt das *Abd-A* Homolog zunächst transient in A9 und A10 auf und wird schwächer, wenn *Abd-B* von hinten aufkommt (Kelsh et al., 1993). Das *Tribolium* Homolog von *Abd-A* ist während des Segmentierungsprozesses von A1p (PS7) bis A11a (PS16) detektierbar. Das hintere Ende des Keimstreifs bleibt dabei immer frei. Während des Rückenschlusses, wenn A10 und A11 fusionieren, verschwindet *Tc'Abd-A* in diesen Segmenten, bleibt aber noch schwach in A9 erhalten (PS14). Die Expression von A1p (PS7) bis A8 ist unverändert stark (Shippy et al., 1998). *Tc'Abd-B* ist entsprechend ab PS14, vor allem in PS15 und PS16 exprimiert (S. Brown pers. Mitteilung). Die Situation im Abdomen

von *Schistocerca* und *Tribolium* ist also identisch und entspricht der *Drosophila* r-Funktion von *Abd-B*.

Der Phänotyp von *wurm* entspricht dem von *Tribolium Abd-B*

Die Beurteilung des *wurm*-Phänotyps ergibt also, daß die **homöotische Transformation** der Segmente A9-A11 mit der r-Funktion von *Abd-B* korreliert. Die Tatsache, daß der *en* Streifen 10 in *wurm* Mutanten nicht wie in *wt* reduziert zu sein scheint, sondern in der Ausbildung den übrigen abdominalen *en* Streifen entspricht, weist auf eine früh fehlende *Abd-B* Funktion hin. Den **Haarmusterdefekten** (Umformung und ektopisch) könnte ebenfalls eine homöotische Funktion zu Grunde liegen. Einige Allele des *Tribolium* Homologs von *Ubx*, führen zu ektopischen Setae auf dem Abdomen von Käferembryonen. In Homozygoten für die Allele *Utx¹* und *Utx²* wird in A1-A6 die campaniforme Sensille pc6 zur Seta pS6 umgeformt und eine weitere ektopische große Seta tritt in derselben Reihe dorsal außen auf (Bennett et al., 1999). Dies geschieht allerdings sehr konsistent und nicht so variabel wie in *wurm*, zumindest aber nach einem ähnlichen Muster von Umformung bestehender Elemente und dem Auftreten neuer. In die **Ausformung der Tracheenöffnungen (Stigmen)** sind bei *Drosophila* u.a. *Ubx* und *Abd-A* involviert. Bei *Tribolium* Mutanten wurden bis jetzt keine derartigen Effekte beschrieben. Möglich ist aber, daß diese übersehen wurden oder als unspezifisch erachtet wurden.

Wie entstehen aber die **Symmetrieprobleme** bei der Segmentierung in *wurm*?

Das Zustandekommen der Asymmetrien bzw. einseitig fehlender Segmentgrenzen ist nicht klar. Uns ist kein entsprechender Phänotyp aus *Drosophila* bekannt. Allerdings wurde kürzlich gezeigt, daß HOX Gene in *Drosophila* die Bildung von Segmentgrenzen über lokalisierte Induktion von Apoptose regulieren. *Abd-B* aktiviert *reaper* Expression am Übergang der Segmente A6/A7 und A7/A8. In *Abd-B* Mutanten fusionieren diese Segmente. Es gibt aber noch andere Effektorgene wie *hid*, *grim* und *sickle*, die *reaper* Funktion redundant übernehmen können und die Phänotypen zumindest zum Teil später kompensieren, so daß die Fliegen bis zum Adultstadium überleben können (Lohmann et al., 2002). Die teilweise auftretenden Fusionen sind daher unter Umständen noch eine Restfunktion des ursprünglichen Fusionsmechanismus im hinteren Abdomen und Telson.

Vielleicht sind auch die gestörten *engrailed* Streifen die Ursache der Asymmetrie. Aber wie werden diese beeinflusst? Peifer und Wieschaus stellten fest, daß *Drosophila* Embryonen ohne maternales und zygotisches Extradenticle in ihrem Phänotyp an *engrailed* Mutanten erinnern: Die Segmentgrenzen verschwinden im Embryo während der Entwicklung und dadurch fusionieren einzelne Segmente. Dies tritt in einem Paarregelmuster auf, da die geradzahigen PS stärker betroffen sind. Aus der Expression von *en* in *exd^{mat+zyg}* Mutanten wurde geschlossen, daß EXD für die Aufrechterhaltung der *en* Expression verantwortlich

ist. *en* wird nämlich wie in *wt* aktiviert, wird dann aber wieder schwächer ab dem Stadium des gestreckten Keimstreifs. Betroffen ist v.a. der ventrale Bereich der Expression, der vollkommen verschwindet (Peifer and Wieschaus, 1990). Die *en* Expression in *wurm* ist teilweise geschwächt und ohne gerade Begrenzung (siehe Abb. 3.7). Im Gegensatz zu *Drosophila* ist aber nicht der ganze Embryo, sondern nur ein kleiner Bereich im Abdomen gestört. Als Folge davon sollte auch die *wingless* Expression verringert sein. Peifer und Wieschaus erwähnen, daß nicht nur die geringere Expression, sondern auch vermehrter Zelltod zum beobachteten Phänotyp führt. Bisher ist nicht bekannt, ob EXD die gleiche Funktion in *Tribolium* ausübt.

Die *wurm* Mutante zeigt zum ersten Mal deutlich, daß in *Tribolium* embryonal 11 abdominale Segmente vollständig angelegt werden, obwohl im Wildtyp der entsprechende *en* Streifen in A11 fehlt. Woher kommt aber das zusätzliche halbseitige oder komplette 12. Segment/12. Stigma? Ist in *wurm* der Zählmechanismus gestört?

Wir wissen derzeit nichts über den Mechanismus in einem wachsenden Keimstreif, der zur Bildung der richtigen Anzahl an Segmenten führt. Verschiedene Modelle dazu werden von Bucher (Bucher, 2002) diskutiert. Daher könnte ein fehlerhaftes Muster durchaus zu einem zusätzlichen Segment führen. Halbseitige Deletionen könnten durch den Zusammenbruch des *engrailed*-Musters auf einer Seite und anschließendem Zelltod entstehen. Die Reste von zwei Segmenten würden sich auf dieser Seite zu einem Segment ergänzen, aber noch in Verbindung mit den beiden Halbsegmenten der anderen Seite stehen. Andererseits tritt ein solcher Zählfehler in keiner der verschiedenen beschriebenen Paarregel- oder Gap-Phänotypen auf, deren Segmentierung z. T. stark gestört ist.

Die alternative Erklärung ist, daß es sich bei der Musterstörung in den dokumentierten Embryonen nicht um die geschwächten Streifen 7 und 8 handelt, sondern um einen geteilten Streifen 7, der aufgrund eines fehlerhaften, unscharfen Musters nicht in der Mitte fusioniert und sich in die jeweils andere Embryohälfte fortsetzen kann (wenn im Wildtyp die *en* Streifen in der Wachstumszone entstehen, erscheinen sie als zwei halbe Streifen, die sich immer mehr annähern und schließlich verbinden). Oder anfangs wird ein fleckenhaftes *en* Signal erzeugt, das sich später in 2 streifenartige Bereiche aussortiert. Für diese Alternative spricht, daß der Abstand zwischen den benachbarten normalen Streifen nur einen Streifen erwarten läßt. Diese Situation könnte dann später wieder zu korrigieren versucht werden und dabei in einigen Fällen zu einseitigen Verdopplungen und damit zu v-förmigen Segmenten führen. Tatsächlich treten zusätzliche Segmente oder Halbsegmente nur bei asymmetrischen Embryonen auf. Wohl nur, wenn sich 2 Streifen aus einem ursprünglichen Streifen entwickeln (siehe Abstandsargument). Das sollten Färbungen mit *Eve* oder einem anderen Paarregelgen ergeben, wodurch bestimmt werden könnte, welcher *en* Streifen betroffen ist,

falls das Paarregelmuster nicht ebenfalls gestört ist. Durch Färbungen mit Gap-Genen, da die Asymmetrien spezifisch ab A7 auftreten, muß gleichzeitig geklärt werden, ob der grundsätzliche Musterbildungsprozeß beeinflusst ist oder nicht. Weitere interessante Färbungen sind z.B. *spalt* und *distalless (dll)*, um die homöotischen Zuordnungen und die Anlage der posterioren Anhänge (Pygopodien und Urogomphi) zu identifizieren.

Generell gibt es eine Schwierigkeit bei Färbungen mit Embryonen von Käfermutanten. Im Gegensatz zu *Drosophila* sind die meisten Stämme und Linien nicht balanziert, also bei embryonal lethalen Mutationen nur durch heterozygote Käfer zu halten. Dadurch ergeben sich in Eiablagen maximal 25% Phänotypen. Da *Tribolium* Embryonen auch nicht so gleichmäßig und klar färben wie normalerweise die von *Drosophila*, ist es meist sehr schwer abweichende Färbungen eindeutig erkennen zu können. Hilfreich ist oft nur, eine zweite Färbung mit zu machen, die mutante Embryonen spezifisch markiert. Im Falle von *wurm* eignet sich dazu bisher am ehesten eine *engrailed* Kontrollfärbung.

***überlänge*^{10d21} ist eine neuartige homöotisches Gen**

überlänge ist ein Gen mit Funktionen an zwei weit entfernten Stellen im Körper, dem zusätzlichen Stigma in T1 und den Transformationen der Segmente A9 und A10 im hinteren Abdomen. Im Bereich der HOX- und HOX-ähnlichen Gene ist weder in *Drosophila* noch in *Tribolium* ein vergleichbarer Phänotyp bekannt (siehe Abb 3.19). Nach der Klonierung von *Tc'sal* und dessen RNAi Phänotyp mußte dieses Gen auch als Kandidat für eine Nullmutante ausgeschlossen werden. Das zusätzliche Stigma in T1 könnte auch ein sekundärer Effekt sein. In den *Tribolium* Embryonen werden auch in T1 und T3 zunächst Stigmen angelegt, die in Kernfärbungen morphologisch sichtbar sind, dann aber später wieder durch einen unbekanntem Mechanismus rückgebildet werden.

Tribolium spalt* ist nach Blast- und Sequenzanalyse das Homolog von *Dm'spalt

Über das Gesamtprotein ist natürlich keine Aussage möglich. Innerhalb des klonierten 1 kb Fragmentes, das vom vermutlich ersten Zinkfingerpaar bis kurz vor das zweite reicht, sind jedoch alle zu erwartenden *spalt* Charakteristiken und eine überzeugende Ähnlichkeit zu den *spalt* Genen anderer Organismen vorhanden: Die Zinkfinger vom Typ C₂H₂, die konservierten Aminosäuren S, A, L und R innerhalb des ersten Zinkfingers, ebenso wie der H/C Link zwischen den beiden Zinkfingern. Die *Sal* Box im Zentrum des zweiten Zinkfingers ist ebenfalls präsent (siehe Ergebnisse).

Mit der angewandten Methode der redundanten PCR wurde kein weiteres *spalt*-ähnliches Fragment amplifiziert. In Bezug auf *Dm'sal-r* wäre mit den gewählten Primern I/1, I/4 und II/5 eine Amplifizierung theoretisch möglich gewesen, wenn auch mit einer etwas geringeren

Effizienz, wegen einer etwas schlechteren Übereinstimmung mit der Sequenz. Es gibt daher also bisher keinen Hinweis auf ein *sal-r* Gen in *Tribolium*, es kann aber auch nicht ausgeschlossen werden. In der Pubmed-Datenbank ist kein weiteres *sal-related* Gen verzeichnet. Für *Anopheles* stehen zwei Einträge in der Blast-Liste, die in der Genkarte an ca. 1 Mb entfernten Loci auf dem Chromosom 3 erscheinen. Es ist bisher nicht zweifelsfrei ersichtlich, ob diese vorläufige Auswertung der *Anopheles*-Daten verlässlich ist. Der für die Klonierung ausgewählte Bereich erlaubt keine eindeutige Unterscheidung von *sal* und *sal-r*, da der zusätzliche einzelne Zinkfinger von *sal-r* erst nach den zweiten Doppelzinkfinger käme. Beim Vergleich der Sequenzen ergibt sich eine Abweichung an der letzten Position des H/C Link des ersten Zinkfingers zwischen *sal* in *Tribolium* und *Drosophila* und *Dm'sal-r*. Letzteres hat dort ein Valin anstatt des erwarteten Lysins. Auch in den relativ gut konservierten Bereichen nach dem ersten Zinkfinger und kurz vor dem zweiten Zinkfinger gibt es einige Abweichungen zwischen *Dm'sal-r* und den anderen Insekten-Sal-Genen (siehe Alignment 3.14).

Der Blast Vergleich liefert eine hohe Ähnlichkeit sowohl zu *Dm'sal* als auch zu den *spalt* Genen anderer Organismen und ordnet *Tc'spalt* eindeutig diesem Gen zu. Deshalb gehe ich davon aus, daß die klonierte Sequenz höchstwahrscheinlich ein Teil des *Tribolium castaneum spalt* Homologs ist. Eine endgültige Aussage über die Zuordnung von *Tc'sal* und dessen phylogenetische Beziehungen wird möglich, wenn das gesamte Gen sequenziert ist. Für die vorliegende entwicklungsbiologische Fragestellung ist die Teilsequenz ausreichend.

Übereinstimmung und Divergenz der *spalt*-Expression zwischen *Drosophila* und *Tribolium*

Die hufeisenförmige Domäne (HD) während des Blastoderms im Bereich der procephalen neurogenen Region und der Acronanlagen ist in *T.c.* nicht vorhanden. Die anteriore Domäne (AD) hingegen ist gut zwischen den beiden Spezies konserviert und damit eine weitere Bestätigung für die Orthologie der Gene, da *Dm'sal-r* nicht im Blastoderm exprimiert ist. Kühnlein et al. beschrieben die Expression des *Drosophila spalt* Genes und analysierten 10,2 kb der genomischen DNS im 5' Bereich auf cis-regulatorische Elemente (Kühnlein et al., 1997; Kühnlein et al., 1994). Sie zeigten, daß die AD in *Drosophila* (PS1-3, schwach in PS4) von Bicoid und Hunchback aktiviert wird, und posterior von Krüppel begrenzt wird. Auf Expressionsebene liegt eine ähnliche Situation in *Tribolium* vor und kann die, im Vergleich zu *Drosophila*, schmälere AD in PS1 und PS2 erklären. *hb* ist nämlich in Käfer nur in Mx und Lb (eventuell noch in anterior T1) exprimiert und nicht wie in der Fliege von anterior bis PS4/aT2. Somit ist die *Tc'hb* Domäne identisch mit *Tc'sal* und das Gen *Tc'Kr* ist ebenfalls weiter anterior, nämlich ab T1 vorhanden und könnte wie in *Drosophila* die posteriore Grenze definieren (Bucher, 2002). Das Zustandekommen der anterioren Grenze ist in *D.m.* unklar:

Sie wird eventuell durch sehr hohe Konzentrationen von BCD und HB oder eine redundante Repression durch Kopfgapgene wie *btd*, *gt*, etc. festgelegt. In *T.c.* gibt es *bcd* nicht, da dieses Gen vermutlich nur in höheren Fliegen vorkommt (Stauber et al., 2002), *gt* ist weitgehend mit *sal* coexprimiert, und *hb* nur als Streifen, aber nicht als Kappe vorhanden. Vielleicht hat Hucklebein (HKB) dann eine anteriore Repressorfunktion (wie in *D.m.* bei der HD) oder der Faktor, der *Tc'hb* begrenzt, wirkt auch auf *sal*. Das einfachste Modell ist, daß *HB* der alleinige Aktivator ist und *sal* daher nur im gleichen Bereich exprimiert wird und hinten durch Kr reprimiert wird. Die Unterbrechung des anterioren Rings in *T.c.* ventral im Bereich des späteren Mesoderms könnte durch *Dorsal* Repression vermittelt werden, so wie dies in *D.m.* bei der HD der Fall ist. Eine weitere Übereinstimmung ist die Coexpression mit *en* an der Vordergrenze von *spalt* Domänen, sowohl in der AD als auch im Käferembryo bei der späteren segmentalen Expression. Caudal (CAD), als Aktivator in *Drosophila*, ist im späten Blastoderm fast in der gesamten hinteren Hälfte des Eis vorhanden und könnte auch in *Tribolium* aktivierend wirken. Unklar ist, wie diese segmentale Expression und die abschließende posteriore Domäne entsteht, ob z.B. auch CAD, Tailless (aktivierend) und HKB (reprimierend), wie in der Fliege, daran beteiligt sind. Eine segmentale Expression ist bei vielen Genen im wachsenden Keimstreif zu beobachten, ohne daß dazu bisher eine funktionelle Relevanz ersichtlich ist.

Die spätere, sehr komplexe Verteilung der *Tc'sal* Transkripte ähnelt wieder sehr stark der in *Drosophila*: dorsale Bereiche, bzw. der dorsale Rand des ausgewachsenen Keimstreifs, verschiedene Gruppen von Zellen lateral in Thorax und Abdomen, Teile des Hinterdarms und des ZNS. Da über die Käferhistologie weitaus weniger bekannt ist und Marker für z.B. Tracheen, Oenozysten, Malpighigefäße oder den Hinterdarm fehlen, kann das Muster derzeit nicht genauer aufgeklärt werden. Das Gleiche gilt für die Flügelscheibe, in der es bei *Drosophila* von DPP/TKV angeschaltet wird und seinerseits *knirps* aktiviert bzw. den *iroquois* Komplex reprimiert. Zu *Tribolium* liegen bisher leider keine Untersuchungen zu Imaginalscheiben vor.

sal Funktion in *Drosophila* und *Tribolium*

Mit den verwendeten Primern für die redundante PCR hätte *sal-r* auch amplifiziert werden können. Da dies nicht der Fall war, ist aber kein Beweis für das Fehlen von *Tc'sal-r*. Selbst wenn in *Tribolium* auch *sal-r* vorhanden ist, kann die Aufgabenteilung bzw. Redundanz beider Gene anders aussehen als in *Drosophila*. Die Analyse der Doppelmutante in der Fliege führte jedenfalls zu einer Reihe von neuen Phänotypeneigenschaften, wie z.B. an den Genitalien und dem Hörorgan der Antenne, wodurch die Tiere taub sind. Diese Befunde zeigen im Vergleich zum Townes-Brocks Syndrom beim Menschen, daß eine deutliche funktionelle Konservierung in der Evolution des *spalt/spalt-related* Genlocus existiert (Dong

et al., 2002). Sollte in *Tribolium* ebenfalls noch ein *spalt-related* Gen mit zu *spalt* redundanter Funktion vorhanden sein, dann würde die *spalt* Funktion mit der RNAi nur zum Teil aufgedeckt werden. Das könnte dann auch der Grund sein, warum die Erhöhung der *sal*-dsRNA Konzentration keine stärkeren Phänokopien erzeugt hat.

In einfachen *Dm'sal* Mutanten treten drei ektopische Tracheenplacoden anterior in PS2, 3 und posterior in PS14 auf. Die überzählige posteriore Placode in A9 von *Tribolium* ist daher erwartet. Anterior ist die Ausgangssituation anders als in *Drosophila*. In PS3/Prothorax wird auch im Wildtyp-Käfer grundsätzlich eine Placode angelegt (wie auch in T3), die dann sekundär verloren geht. In Übereinstimmung damit fehlt *Tc'sal* ja in PS3 durch die, im Vergleich zur Fliege, schmalere Expression. Die vorderste Placode in PS2 wird in *Drosophila* nur reduziert angelegt. In *T.c.* könnte diese ebenfalls nur rudimentär und damit kaum erkennbar angelegt werden, oder auf dieselbe Weise wie in T1 über einen nachgeschalteten Mechanismus rückgebildet werden. Oder aber dadurch, daß für die Placodenbildung notwendige Zusatzfaktoren wie z.B. *Antp* nicht nach PS2 expandieren, könnte trotz fehlendem *spalt* keine Placode angelegt werden. In *Drosophila* sind *sal* und *tsh* Gegenspieler, die „Nicht-Rumpf-“, versus „Rumpf-Identität“ vermitteln. *spalt* reprimiert *teashirt* direkt oder indirekt und begrenzt dessen Expression, und damit den Rumpfbereich, auf PS3/Lbp - PS13/A8a (Roder et al., 1992). Aus der Antennalscheibe von *Drosophila* ist in diesem Zusammenhang bekannt, daß *Antp* eine doppelte Wirkung an dieser Grenze hat. Einerseits wird *spalt* durch *Antp* reprimiert und kann dadurch nicht *tsh* unterdrücken und andererseits aktiviert *Antp* zusätzlich die Expression von *tsh*. *Dm'tsh* Aktivität wiederum ist notwendig für die Funktionsfähigkeit von *Antp* und den *BX-C* Genen, was vermutlich auch in *Tribolium* gilt. Demzufolge sollte in *sal* dsRNAi Käferembryonen daher *tsh* auch in Mx, Lb und mindestens A9 ektopisch vorhanden sein und im Verbund mit *HOM-C* Genen die Segmentidentität verändern. Färbungen mit *tsh* könnten dies bestätigen. Ein *tsh*-Homolog wurde unter dem Namen *tiptop* im Labor von S. Brown aus *Tribolium* kloniert. Eine Veränderung des Labium, wie in *Drosophila*, konnte mit *Tc'sal* RNAi jedenfalls nicht festgestellt werden.

Durch fehlendes *spalt* wird in *Tribolium* die Maxille teilweise in eine Mandibel transformiert. Die Verschaltung der identitätsgebenden Gene im Kopfbereich des Käfers ist sehr komplex, wie die Phänotypen von *mXP* (Denell et al., 1996; Shippy et al., 2000b), *Dfd* (Brown et al., 2000), *scr* (DeCamillis et al., 2001) und auch *giant* dsRNAi zeigen (Bucher Dissertation 2002) (siehe Abb.3.19). Ein einfaches kombinatorisches Modell kann die verschiedenen Segmentidentitäten nicht erklären. Vermutlich ist der HOX- und *Sal*-Code redundant. Die Abhängigkeiten der beteiligten Gene untereinander sind in *Tribolium* bisher noch nicht geklärt. In *Dm'sal* Mutanten ist *Ubx* (normalerweise in PS5-13) auch nach PS3 und 4

expandiert. Daher ist eine Repressorwirkung von *spalt* auf *Ubx* wahrscheinlich (Casanova, 1989). Unter Umständen gibt es im Käfer Interaktionen von *sal* mit den HOX Genen *mxp* oder *Dfd*, die beide Einfluß auf die Bildung des Telopoditen oder des Enditen der Maxille haben. Eine weitere Möglichkeit ist, daß diese Transformation die Folge einer erweiterten *tsh* Expression mit einer daraus entstehenden neuartigen HOX Interaktion ist, die den Endit in Richtung Mandibel verändert.

Die Funktion von *spalt* in der Entstehung des Tracheennetzwerkes von *Tribolium* ist noch nicht untersucht. Die Veränderungen an den Stigmen weisen aber darauf hin. Mit Hilfe von hochauflösenden Konfokalaufnahmen könnte man dies eventuell darstellen.

In *Dm'Abd-B/Dm'sal* Doppelmутanten wird auch der Bereich der posterioren Domäne nach Thorax transformiert. Jürgens sieht damit die Hypothese von Lewis bestätigt, wonach der hintere Kopfbereich (PS1 und 2) und der vordere Schwanzbereich (PS14 und 15) äquivalente Regionen sind, und erst durch die *Abd-B* Funktion sekundär verschieden werden (Jürgens, 1988). *spalt* hätte dann die evolutionäre Funktion, Rumpfsegmente eines myriapodenähnlichen Vorläufers zu entnehmen, um sie für einen modifizierten Kopf oder Schwanz zur Verfügung zu stellen. Der posteriore Phänotyp von *sal* RNAi mit dem zusätzlichen Stigma zeigt also auch die für *Dm'spalt* vorgeschlagene atavistische Mutation zurück zu einem einfachen, metameren Archetyp. Es wäre sehr interessant eine Doppel RNAi von *spalt* und *Abd-B* zu machen, um zu testen, ob in *Tribolium* ähnlich wie in *D.m.* anteriore Strukturen im Bereich von A9 und A10 auftreten.

Tc'spalt ist wie *überlänge* ein Gen mit Funktionen an zwei weit entfernten Stellen im Körper. Der *sal*⁻ Phänotyp unterscheidet sich allerdings deutlich von der Mutante *überlänge*. Die betroffenen anterioren Regionen (Mx in *sal*⁻ und T1 in *übl*) liegen an verschiedenen Positionen der Längsachse und der posteriore Effekt ist zum Teil komplementär (Ug fehlen in *übl*, Pp in *sal*⁻). Demnach muß dieses Gen, zumindest in Form einer Nullmutation, als Kandidat für *überlänge* ausgeschlossen werden.

Segmentale Zuordnung der betroffenen Gewebe in *überlänge* und *spalt*

Um die homöotischen Veränderungen der Mutante *überlänge* und der *spalt* RNAi genau spezifizieren zu können gibt es noch ein Problem. Bisher herrscht Unklarheit darüber welche postabdominalen Segmente welche Anhänge (Urogomphi und Pygopodien) bilden. Dazu gibt es verschiedene Annahmen:

- 1) Laut einer zusammenfassenden morphologischen Übersicht bei Klausnitzer sind die dorsalen paarigen Anhänge (Ug) dem 9. Segment zugehörig, während die oft zur Fortbewegung dienenden Sonderbildungen (z.B. Pygopodien) als Extremitäten von A10 bezeichnet werden (Klausnitzer, 1991). Inwiefern diese Zuordnung entwicklungsbiologisch zutreffend ist, ist nicht erwähnt.
- 2) Aus frühen Arbeiten an *Tribolium* und denen von Sue Haas (Labor Beeman, Kansas) ergibt sich eine andere Zuordnung: El-Kifl (El Kifl, 1953) schloß aus seinen morphologischen Arbeiten an *Tribolium* in Übereinstimmung mit Arbeiten von weiteren Autoren an anderen Käferarten (zitiert in (El Kifl, 1953)), daß in adulten Käfern A9 nur ventral und A10 nur dorsal ausgebildet wird. Beide zusammen erscheinen dann als ein Segment „A9“. Der Phänotyp der bereits erwähnten Mutante *eu* ist in Embryonen, Larven und Puppen zu sehen. Ein zweites Paar von Urogomphi tritt auf der Höhe der Pygopodien, also posterior der normalen Ug auf und führt zu einem etwas elongierten Aussehen. Eine weitere ähnliche Mutante, *ju* hat nur in Adulten eine Veränderung. Die juvenilen Urogomphi bleiben erhalten und sind in einem Bereich lokalisiert, der von El-Kifl als A10 bezeichnet wurde. In einer *ju/eu* Doppelmutante treten dann folgerichtig 2 juvenile Ug im adulten Käfer auf. Da die normalen Ug mit A10 korreliert werden (nach Mutante *ju* allein) und posterior zusätzliche Ug erscheinen, müssen diese nach dieser Argumentation von A11 abstammen. Mit der gleichen Begründung werden die Pygopodien damit auch A11 zugeordnet, während A9 ohne Anhänge wäre.
- 3) Nach den Analysen von Maderspacher und Bucher (Maderspacher et al., 1998) an der vermutlichen *Tribolium* PRG Mutante *scratchy* wird These 1 unterstützt. Der Phänotyp ist *paired* ähnlich, d.h. die ungeraden Segmente sind betroffen, meist deletiert. Dies wurde anhand der *en* Streifen bestätigt. Es fehlen die Md, Lb, T2, A1, A3, A5, A7, sowie dementsprechend A9 und A11. Da die Pygopodien vorhanden sind, die Urogomphi aber nicht, ergibt sich wie unter 1) die Zuordnung: A9 = Ug und A10 = Pp.

Wenn man darin übereinstimmt, daß die Pygopodien posterior der Urogomphi liegen, lassen sich daraus 2 Szenarien darstellen:

Hypothese	A09 =	A10 =	A11 =
Klausnitzer (1) und Maderspacher (3)	Ug	Pp	ohne Anhänge
El Kifl (2)	ohne Anhänge	Ug	Pp

Diese Szenarien führen zu folgender Beurteilung der Phänotypen:

In **überlänge** (Stigma in T1; A9+1-Ug+Pp) wird nach Klausnitzer (1) und Maderspacher (3) A9 nach A8 transformiert, daher fehlen die Ug. A10 fusioniert nicht, ist aber vor allem ventral ausgebildet, die ventralen Pp sind entsprechend vorhanden, dorsales Gewebe fehlt. A11 ist kaum erkennbar.

nach El Kifl (2) wird ebenfalls natürlich A9 nach A8 transformiert. A10 fusioniert nicht und das dorsale Gewebe fehlt, daher keine Ug vorhanden. A11 kaum erkennbar, macht aber die Pp.

Bei ***spalt pRNAi*** (Mx teilweise nach Md; A8+S9+Ug-Pp) wird nach Klausnitzer (1) und Maderspacher (3) A9 teilweise nach A8 transformiert, daher tritt ein ektopisches Stigma auf, die Ug bleiben aber vorhanden. A10 verliert ebenfalls teilweise Identität, daher sind die Pp reduziert oder fehlen. A11 ist unverändert. *sal* wirkt in A9 und A10.

nach El Kifl (2) wird ebenfalls natürlich A9 nach A8 transformiert, daher tritt ein ektopisches Stigma auf. A10 ist unverändert und bildet die Ug. A11 ist reduziert oder transformiert und kann keine Pp bilden. *sal* wirkt in A9 und A11.

Beide Szenarien scheinen möglich. Auch die *spalt* Expression läßt beides zu, da die scharfe posteriore Domäne zum Ende des Keimstreifwachstums von A9p bis A11a reicht. Das erste Szenario ist aber überzeugender bei der Erklärung der Phänotypen, v.a. da sich die *spalt*-Wirkung auf zwei nebeneinanderliegende Segmente erstreckt. Eine Möglichkeit diese Zuordnung von Segmenten und Anhängen molekular zu klären besteht mit *Distalless/Engrailed* Doppelfärbungen, da zumindest die Pygopodien extremitätenhomolog scheinen. Eine *Enhancer trap* Linie aus den Transformationen mit dem 3xP3-EGFP führt zu gefärbten Strukturen in Mundwerkzeugen, Beinen und den Pygopodien.

In welche Gruppe von Genen gehört *wurm* und *überlänge*?

Anhand der genetischen Kreuzungen wissen wir, daß in *wurm* nicht *Abd-B* selbst betroffen ist. Möglicherweise handelt es sich um ein nachgeschaltetes Effektorgen, das allerdings nahezu alle Funktionen von *Abd-B* und einige weitere unabhängige erfüllen müßte. Von den in *Drosophila* bekannten Interaktionen werden, wie teilweise schon erwähnt, *Ubx* und *Abd-A* (Lamka et al., 1992), *Scr* (Andrew et al., 1994) und *unplugged* (Chiang et al., 1995) reprimiert. Aktiviert werden *cut*, *ems*, *nubbin*, *klumpfuss*, *spalt*, *grainyhead*, *trachealess* und *engrailed* (Hu and Castelli-Gair, 1999). Zusätzlich beeinflusst *Abd-B* die Regulation von *18 wheeler* (Chiang and Beachy, 1994), *pannier* (Herranz and Morata, 2001) und *dacapo* (Meyer et al., 2002). In *Drosophila* ist allerdings kein Nicht-HOX-Gen mit *Abd-B* ähnlichem Phänotyp bekannt.

Eine weitere Möglichkeit ist eine Störung im *Polycomb/Trithorax*-Netzwerk (*Pc/Trx*), welches die dauerhafte Repression oder Aktivierung von entwicklungsbiologisch relevanten Genen, v.a. der HOX-Gene, auf Chromatinebene gewährleistet. *Pc*-Gene erfüllen ihre Aufgabe indem sie reprimierte Chromosomenabschnitte in kompakte heterochromatinähnliche Strukturen verpacken. Dazu gehören z.B. die Gene *Polycomb*, *Polycomblike*, *polyhomeotic*, *extra-sex-combs*, *Enhancer-of-zeste* oder *pleiohomeotic* (zusammengefaßt in (Santamaria, 1998; van Lohuizen, 1999). Ihre Antagonisten, die *Trx*-Gene, sind Bestandteile von

Chromatinöffnungskomplexen oder der basalen Transkriptionsmaschine. Beispiele sind *trithorax*, *brahma*, *moira*, *trithoraxlike*, *kismet* (Lopez et al., 2001). Demzufolge haben *Trx* Mutanten z.T. ähnliche Phänotypen wie HOX-LOF (*loss-of-function*) Mutanten und *Pc*-Phänotypen ähneln denen von HOX-GOF Mutationen. Da *Pc* und *Trx* Gene aber die Regulation vieler Gene steuern, sind ihre Phänotypen meist komplexer und aus mehreren Einzeleffekten zusammengesetzt, wie das z.B. auch in *wurm* der Fall ist. In *Tribolium* wurde bisher noch keine solche Mutante charakterisiert. In ersten *Abd-B* und *Abd-A* Färbungen an *wurm* konnten keine auffälligen Expressionsanomalien festgestellt werden, um diese Hypothese zu belegen.

Neben den eigentlichen *Pc* und *Trx* Genen gibt es noch eine weitere Gruppe von Genen, die als deren Regulatoren auftreten, wie z.B. *Enhancer-of-zeste E(z)* (LaJeunesse and Shearn, 1996) oder *corto* (Lopez et al., 2001) und damit die Eigenschaften von *Pc* und *Trx* Genen in sich vereinen.

Das dritte und im Augenblick favorisierte Szenario, weil es keine Expressionsänderung von HOX-Genen erfordert, ist eine Mutation in einem Cofaktor von *Tc'Abd-B*. HOX-Gene sind relativ nahe miteinander verwandt und erkennen selbst nur eine kurze Sequenz von 6 bp mit den Basen TAAT in der Mitte (Ekker et al., 1991). Daher ist ihre Spezifität sehr eingeschränkt. Um dies dennoch zu erreichen wurden Cofaktoren vorgeschlagen, mit deren Hilfe eine genügend differenzierte Zielgenspezifität ermöglicht werden kann. Bis auf einige wenige Arbeiten sind bisher leider kaum derartige Interaktionen ermittelt: So ist Extradenticle (EXD) als Cofaktor für UBX, ABD-A und DFD erforderlich (Pinsonneault et al., 1997), Homothorax (HTH) ist wiederum der für EXD notwendige Faktor zur Kernlokalisierung (Kurant et al., 1998) und Lines (LIN) essentiell für ABD-B.

Beispielhaft für das breite Wirkungsspektrum eines solchen Cofaktors wird *lines* hier kurz beschrieben. Das Gen *lines* wurde ursprünglich als Segmentpolaritätsgen beschrieben (Bokor and DiNardo, 1996), hat aber noch einige weitere Aufgaben. In der *lines* Mutante ist die Polarität der abdominalen Zähnchenbänder verändert, der Kopf ist deformiert, die Analplatte fehlt, der Hinterdarm ist verändert und die hinteren Spirakel fehlen; dafür sind manchmal einige ektopische Zähnchen im nackten Bereich der Kutikula ausgebildet. Castelli-Gair (Castelli-Gair, 1998) konnte zeigen, daß es spezifisch von *Abd-B* benötigt wird, um *empty-spiracles*, *spalt* und *cut* zu aktivieren. *Abd-B* ist allerdings ohne *lines* in der Lage, *Ubx* und *Abd-A* zu reprimieren. Bei der Repression von Zielgenen, im Gegensatz zur Aktivierung, wurde bereits öfters eine direkte und eigenständige Wirkung von HOX-Genen gezeigt. So reprimiert z.B. UBX in den Halteren *spalt* unabhängig von EXD und HTH (Galant et al., 2002). In *wurm* würde man zwar annehmen, daß *Abd-A* dereprimiert ist und den Segmenten A9-A11 eine Identität wie A2-A7 gibt, vielleicht reicht aber die frühe Expression

von *Abd-A* aus, wenn *Abd-B* nicht in der Lage ist seine Zielgene zu aktivieren. In ersten Färbungen mit *Tc'Abd-A* und *Tc'Abd-B* war keine deutliche Veränderung der Expression zu erkennen. Zu erwarten wäre eine längere und sich nicht abschwächende *Tc'Abd-A* Expression. Die zusätzlichen Störungen am Haarmuster und an den Tracheen in der Mutante ließen sich erklären, wenn dieser Cofaktor auch mit anderen (HOX-)Genen wechselwirken würde, wie z.B. EXD mit DFD, UBX und ABD-A.

wurm ist damit ein interessantes Gen mit einem neuartigen, pleiotropen Phänotyp, das vielleicht den HOX Genen übergeordnet ist. Zusätzlich bietet es die Chance mehr über den Korrektur- und Integrationsmechanismus bei der Segmententstehung in *Tribolium* zu erfahren oder sogar den Zählmechanismus im Abdomen zu verstehen.

Nach den genetischen Tests ist *überlänge*, genau wie *wurm*, keine *HOM-C* Mutation. Als mögliche Ursachen verbleiben noch eine *spalt*-GOF Mutation oder eine *tsh*-GOF Mutation. Desweiteren könnte es in *überlänge*, wie schon bei *wurm* diskutiert, zu komplexen Regulationsänderungen im HOX Netzwerk oder bei HOX Cofaktoren gekommen sein. An *übl* Embryonen wurden bisher keine Färbungen vorgenommen, so daß es dazu keine weiteren Hinweise gibt. Wie für *wurm*, wäre eine Positionsklonierung der Mutation ein arbeitsaufwendiger, aber sehr aufschlußreicher Ansatz.

Tc'spalt konnte erfolgreich kloniert und seine Funktion mittels pRNAi untersucht werden. Leider trug dies zwar wenig zur Aufklärung der Mutante *überlänge* bei, das Gen zeigt aber eine deutliche Funktionskonservierung zu *Drosophila* und bietet, aufgrund der differenzierten Strukturen im Käferembryo die besten Möglichkeiten für eine genaue vergleichende Funktionsanalyse. Da in *Drosophila* die Mandibel in den Larven reduziert ist, könnte *Dm'spalt* anterior andere, abgeleitete Funktionen angenommen haben. *Tc'spalt* ist daher interessant, da dessen Funktion im Käferembryo darüber Aufschluß geben kann, wie die Kopfsegmentidentität in ursprünglichen Insekten kontrolliert wird. Zudem kann es als guter Marker für die posteriore Region dienen.

Alle 3 Projekte erweitern das HOX relevante Spektrum in Käfer und Fliege und tragen dazu bei, daß mit Hilfe von *Tribolium* bald detaillierte Vorstellungen entwickeln werden können, wie Organismen mit einem sekundären Embryonalwachstum ihre Musterbildung betreiben.

Zusammenfassung

Im Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit wurde zum ersten Mal die Keimbahn eines Käfers erfolgreich genetisch transformiert. Der von uns zu diesem Zweck in Zusammenarbeit mit Ernst Wimmer entwickelte Transformationsmarker *3xP3-EGFP* hat inzwischen sein Potential als spezies-unabhängiges Markergen auch in weiteren Invertebraten-Spezies unter Beweis gestellt und damit das Spektrum transformierbarer Taxa beträchtlich erweitert.

In *Tribolium* konnten Transformationsereignisse mit *3xP3-EGFP* für drei verschiedene Transposons - *Hermes*, *Minos* und *piggyBac* - erzielt werden. Die Effizienz betrug dabei 1,4% (*Hermes*), 11,4% (*Minos*) bzw. 56% (*piggyBac*) der fertilen G_0 und gehört damit zu den höchsten Werten, die in der Literatur für Insekten berichtet wurden. Bei *Minos* konnte die Effizienz durch die Verwendung von Transposase mRNA statt einem DNA Helper-Plasmid weiter auf 32,4% gesteigert werden. Für *piggyBac* und *Minos* wurde ferner in Zusammenarbeit mit anderen Labors gezeigt, daß es sich bei den meisten Transposoninsertionen um unabhängige Einzelintegrationen handelt, die auf verschiedene Chromosomen verteilt sind und stabil weitervererbt werden. Die Größe zusätzlich transferierter Fremd-DNA kann dabei bei *piggyBac* mindestens bis zu 9,5 kb betragen. Schließlich konnte noch ein *piggyBac* Element durch Helperinjektion mit einer Rate von 28,1% remobilisiert werden. Zusammen mit der Anfälligkeit für *enhancer trap* Effekte können daher mit diesem System alle relevanten Transposon-basierenden Techniken zur funktionellen Genomanalyse angewandt werden.

Als erste praktische Anwendung wurden *D. melanogaster* Sequenzen für anteriore und posteriore mRNA-Lokalisierung (*bicoid*-3'UTR und *oskar*-3'UTR), sowie ein *bicoid*-abhängiger Minimalpromotor in *Tribolium* eingeführt. Allerdings konnten durch diese Ansätze keine Komponenten oder Mechanismen eines ggf. konservierten maternalen Systems nachgewiesen werden. Ein Konstrukt mit 5,2 kb der *upstream* Sequenzen von *Tc'hunchback* mit *lacZ* als Reporter gen war hingegen in der Lage, das endogene *hunchback*-Muster größtenteils nachzubilden. Das frühere Ergebnis von Christian Wolff mit *Tc'hunchback* in *Drosophila*, wonach dieses Fragment alle wesentlichen regulatorischen Elemente enthält, konnte daher in transgenen Käfern bestätigt werden.

Zusätzlich zu dem als sehr riskant eingestuften Transformations-Projekt wurde parallel ein weiteres Projekt durchgeführt, die Analyse der homöotischen Mutanten *wurm* und *überlänge*. In beiden Mutanten ist vor allem die Identität der posterioren Segmente ab A9 verändert. In *wurm* sind die Segmente A9-A11 nach A8 transformiert und die telsonalen Anhänge Urogomphi und Pygopodien fehlen. In *überlänge* ist nur A9 wie A8 ausgebildet und demzufolge nicht mit dem Telson fusioniert. Es fehlen nur die Urogomphi. *überlänge* bildet zusätzlich ein ektopisches Stigma im ersten thorakalen Segment. Es wurde gezeigt, daß es sich bei den betroffenen Genen um zwei verschiedene Loci handelt, die beide nicht im homöotischen Komplex liegen. Obwohl der Phänotyp von *wurm* weitgehend der RNAi-Phänokopie von *Abdominal-B* entspricht, konnte also keiner dieser beiden Loci einem bekannten Hox-Gen zugeordnet werden.

Als mögliches Kandidatengen für diese Loci wurde daher das *Tribolium*-Homolog des regionsspezifischen homöotischen Gens *spalt* kloniert. Die Expression von *spalt* entspricht weitgehend der von *Dm'spalt*, mit einer anterioren und einer posterioren Domäne, einer dorsalen Expression an den seitlichen Rändern des Keimstreifs, sowie einem komplexen Muster im Nervensystem. Mit Hilfe der kürzlich entwickelten Technik der parentalen RNAi wurde die Funktion dieses Gens untersucht. In *sal⁻* Phänokopien finden sich, wie in *Drosophila*, anteriore und posteriore Veränderungen von Segmentidentitäten. So wird das abdominale Segment A9 in Richtung anteriore abdominale Segmente transformiert. Dadurch tritt ein zusätzliches Stigma auf und die Pygopodien gehen verloren, das Segment fusioniert aber weiterhin mit dem Telson. Im Gegensatz zu *Drosophila* wird aber anterior nicht das Labium verändert, sondern die Identität der Maxille wird partiell in Richtung Mandibel transformiert: statt dem Enditen der Maxille wird ein mandibel-ähnlicher Zahn gebildet. Damit kommt offenbar auch *spalt* nicht als Locus in Frage, der in *wurm* oder *überlänge* seine Funktion verloren hat. Möglicherweise spielen diese beiden Loci eine Rolle als den HOX-Genen übergeordnete regulatorische Gene, oder als Co-Faktor von *Abd-B*. Damit sind *wurm* und *überlänge* als interessante (und aus *Drosophila* nicht bekannte) Spieler im homöotischen System der Insekten identifiziert, was weitere Untersuchungen als sehr lohnend erscheinen läßt. Vor allem aber hat dieses Teilprojekt die Evolution des *spalt*-Gens erhellt, das in weniger abgeleiteten Insekten offenbar eine essentielle Rolle bei der Spezifizierung von Mandibel versus Maxille spielt. Diese Funktion ist in *Drosophila* vermutlich im Zuge der Reduktion der Mandibel verloren gegangen.

Anhang

Zu Kapitel 1

A.1. Datentabelle zur Transformationseffizienz mit *piggyBac*

Konstrukt Nr.	1	2	3	4a	4b	4 ges.	5
Stamm	<i>p, Rd, mc, lod</i>						p^2 §
Plasmidversion	pB-G #3	pBafm-G	pBaf-G			pBaf-G	pBafm-G
Konstrukt µg/µl	0,500	0,413	0,535			0,560	0,500
Helper µg/µl	0,375	0,388	0,400			0,465	0,375
Konstrukt/Helper	1,12	0,70	0,80			0,63	0,51
Insert in bp	0	2800	3000			4500	9500
Transposonarme	3700	2900	3700			3700	2900
Mob. Element	3700	5700	6700			8200	12400
Ablage (24° C)	3h - 3h 30'	3h - 4h	3h - 3h 30'	3h	2h 45'	2h 45' - 3h	2h 30' - 3h 40'
Ø Inj.alter	252'	221'	257'	245'	210'	230'	202'
	4h 12'	3h 41'	4h 17'	4h 05'	3h 30'	3h 50'	3h 22'
Minimum	1h 45'	1h 15'	2h 15'	2h 15'	1h 45'	1h 45'	0h 55'
Maximum	6h 30'	6h 15'	6h 15'	6h	5h 25'	6h	5h 30'
Anzahl Eier	509	314	459	334	278	612	392
Anzahl Larven	222	135	223	55	41	96	145
Schlüpftrate %	43,61%	42,99%	48,58%	16,47%	14,75%	15,69%	36,99%
Anzahl Käfer (G ₀)	152	98	166	28	26	54	120
Eclosionsrate %	29,86%	31,21%	36,17%	8,38%	9,35%	8,82%	30,61% *
Traforate in % G ₀	57%	40,00%	23,68%	19,23%	29,17%	24,00%	21,82% *
Unabh. Linien	61 **	38	36	5	7	12	12 *
Ø Clustergröße	29,79% **	24,43%	6,37%	4,29%	6,48%	5,57%	8,16% *
SD		21,85%	5,94%			5,17%	6,55%
Minimum	1,82% **	0,97%	0,55%	0,46%	1,78%	0,46%	0,40% *
Maximum	76,74% **	90,29%	22,78%	9,68%	19,70%	19,70%	21,05% *

Tab. A.1 Daten der verschiedenen *piggyBac* vermittelten Transformationen

Versuche 4a und 4b sind unabhängig ausgewertete Injektionen desselben Konstruktes, die in 4 ges. zusammengefaßt sind. Beschreibung der Plasmidversionen siehe Kap. 1.0 und (Horn and Wimmer, 2000); Konstrukt/Helper = stöchiometrisches Verhältnis von Konstruktplasmid zu Helperplasmid; Insert = in Transposon einklonierte Fremd-DNA; Transposonarme = Länge des Transposonanteils links und rechts in bp; Mob. Element = Gesamtlänge des inserierenden Transposons in bp; Ø Inj.alter = statistisches Alter der Embryonen zum Zeitpunkt der Injektion; Eclosionsrate = Schlüpftrate zum adulten Käfer, bezogen auf die ursprüngliche Anzahl der Eier; Ø Clustergröße = gemittelter Anteil transgener Käfer zu Gesamtzahl der Nachkommen. (§) Stamm homozygot für *pearl*, der durch Auskreuzen des Stammes *p, Rd, mc, lod* mit *wt* gewonnen wurde und noch *Rd, mc, lod* Allele segregiert; (*) nur aus männlichen G₀ berechnet; (**) Kreuzungen zwischen zwei G₀.

A.2. Mobilitätsassays mit *Minos* (weitere Literaturangaben)

Autor	Helper	Konz.	Organismus	Rate	Linien	Konz.
6)	pHSS6hsMi2	75ng/µl	<i>D.m.</i> Embryo	0,231%	8 /3470	Donor 150ng/µl
	pHSS6hsMi2	*	S2 Zellen	0,011%	21 /194600	
	pHSS6hsILMi20	*		0,014%	4 /28000	
	pHSS6hsMi2	*	MOS20 Zellen	0,012%	13 /113080	
	pHSS6hsILMi20	*		0,009%	8 /91940	
	pHSS6hsMi2	*	SF9 Zellen	0%	0 /191000	
	pHSS6hsILMi20	*		0,005	10 /195600	
7)	pHSS6hsMi2	70ng/µl	<i>Bombyx mori</i>	0%	0 /154700	Donor 140ng/µl
	pHSS6hsILMi20	70ng/µl		0,03%	195 /579800	Donor 140ng/µl

Tabelle A.2 Mobilitätsassays mit *Minos* in Embryonen und Zelllinien.

(*) DNA mittels Transfektion eingeführt. 6) (Klinikis et al., 2000a), 7) (Shimizu et al., 2000)

A.3. Datentabelle zur Segregation von *Minos*-Insertionen

Die einzelnen Verteilungen von transgenen und nicht-transgenen G₂ Tieren wurden jeweils einem G-Test auf Basis der Erwartungswerte für 1, 2, 3 oder 4 unabhängig vererbte Transposons unterzogen (G(1) – G(4)). Ein Wert, der kleiner als der Grenzwert des jeweiligen Signifikanzniveaus (95%, 99% und 99,9%) ist, bedeutet also eine Annahme der Hypothese für die jeweilige Anzahl der segregierenden Elemente. Die übrigen Werte sollten dann idealerweise entsprechend über den Grenzwerten liegen (Sokal and Rohlf, 1995)

Clustergröße	Linie	grün	weiß	Segregation grün in %	Ins.	G(1)=	G(2)=	G(3)=	G(4)=	p-Werte:	
DNA I											
14,47%	A205	59	72	45,04%	1	1,292	53,261	134,884	225,346		
1,42%	A308	49	35	58,33%	1	2,344	11,129	44,543	85,691		
6,69%	B209	177	170	51,01%	1	0,141	92,277	273,377	481,726		
20,20%	B315	51	47	52,04%	1	0,163	23,962	73,394	130,709		
4,38%	C205	58	46	55,77%	1	1,388	18,123	64,011	118,983		
4,59%	C206	44	46	48,89%	1	0,044	28,133	78,337	135,256		
4,59%	C106	36	28	56,25%	1	1,003	10,625	38,343	71,707	0,0016	
12,58%	C207	128	135	48,67%	1	0,186	83,537	231,224	398,424		
35,01%	C323	55	21	72,37%	2	15,763	0,275	12,430	33,560		
DNA II											
35,01%	C323	67	42	61,47%	1	5,785	9,677	47,246	95,484	0,0253	0,0027
4,35%	I213	32	39	45,07%	1	0,691	28,807	73,007	122,001		
6,49%	I215	70	68	50,72%	1	0,029	37,532	110,219	193,670		
27,56%	I224	56	9	86,15%	3	37,828	4,893	0,105	4,651	0,0455	1,0000 0,0455
27,56%	I124	37	43	46,25%	1	0,450	30,057	78,260	132,041		
27,56%	I124	37	53	41,11%	1	2,860	46,329	108,395	175,879		
3,76%	K218	42	44	48,84%	1	0,047	26,984	75,033	129,488		
10,87%	K224	36	49	42,35%	1	1,996	40,731	97,561	159,702		

RNA III											
29,90%	D317	216	210	50,70%	1	0,085	116,045	340,574	598,314		
29,90%	D317	154	152	50,33%	1	0,013	85,847	249,085	435,965		
29,90%	E302	239	103	69,88%	2	55,606	4,582	73,686	181,600		0,0455
29,72%	E302	143	151	48,64%	1	0,218	93,585	258,828	445,868		
12,09%	E308	183	182	50,14%	1	0,003	103,908	299,795	523,753		
12,09%	E308	174	204	46,03%	1	2,383	144,086	373,245	628,603		
21,43%	E310	182	157	53,69%	1	1,845	71,904	233,442	423,280		
21,43%	E310	147	156	48,51%	1	0,267	97,323	268,264	461,599		
30,39%	E320	184	195	48,55%	1	0,319	121,436	335,035	576,670		
RNA IV											
5,41%	G310	256	80	76,19%	2	96,951	0,257	32,235	106,266		
5,41%	G310	136	131	50,94%	1	0,094	71,412	211,087	371,693		
8,00%	G320	123	139	46,95%	1	0,978	93,928	248,702	422,078		
46,60%	H305	163	201	44,78%	1	3,974	150,438	378,830	631,606		0,0833
46,60%	H305	106	139	43,27%	1	4,458	111,195	271,210	446,950		0,0455
40,91%	F305	164	164	50,00%	1	0,000	94,360	271,151	473,085		
40,91%	F305	121	160	43,06%	1	5,430	129,115	313,617	516,049		0,0253
95,96%	F312	335	50	87,01%	3	236,396	34,049	0,083	22,018		
95,96%	F312	164	156	51,25%	1	0,200	83,469	249,170	440,141		
RNA V											
95,96%	F312	241	91	72,59%	2	70,289	1,007	52,859	144,050		
95,96%	F312	59	60	49,58%	1	0,008	35,341	100,329	174,346		
8,38%	N305	122	121	50,21%	1	0,004	68,812	198,941	347,790		
4,30%	N314	177	195	47,58%	1	0,871	127,664	343,422	586,030		
23,16%	O305	140	136	50,72%	1	0,058	75,064	220,438	387,339		
23,16%	O305	0	0								
22,34%	O324	188	81	69,89%	2	43,761	3,596	57,926	142,783		
22,34%	O324	255	77	76,81%	2	100,631	0,588	28,716	98,775		
31,88%	P304	129	118	52,23%	1	0,490	59,463	183,275	327,039		
RNA VI											
31,88%	P304	4	2	66,67%		0,686	0,209	1,746	3,932		
4,12%	P307	76	80	48,72%	1	0,103	49,375	136,848	235,909		
4,12%	P307	131	136	49,06%	1	0,094	82,398	230,546	398,699		
6,42%	P315	141	147	48,96%	1	0,125	89,569	249,884	431,720		
4,10%	Q306	163	153	51,58%	1	0,317	80,238	242,088	429,087		
4,10%	Q306	119	116	50,64%	1	0,038	64,348	188,470	330,884		
40,76%	Q308	245	101	70,81%	2	61,793	3,131	67,613	171,951		
40,76%	Q308	137	145	48,58%	1	0,227	90,142	248,918	428,569		
40,76%	Q308	104	125	45,41%	1	1,928	90,879	232,102	388,935		

Signifikanzgrenzwerte für 95%, 99%, 99,9% Konfidenz: 3,84 (X^2 , .05), 6,63 (X^2 , .01), 10,83 (X^2 , .001)

Tab. A.3 G-Test mit a=2, df=1; unkorrigiert

A.4. Zusammenfassende Tabelle der Segregations- und Southern-Blot-Analyse

Tab. A.4 Anzahl der Insertionen pro Linie (G_0) und in einzelnen Gamenten (G_1) für DNA und RNA Helper.

m/w: aus männlichen oder weiblichen G_0 ; grün/ges.: Anzahl transgener Käfer und Gesamtnachkommenzahl; G_0 Ins.: Anzahl der Insertionen in der Keimbahn einer Linie (G_0) nach Bandenmuster; Linie, G_1 X: Nummer der Linie und Auskreuzung eines männlichen G_1 mit dem Parentaltyp zur Segregation des Markers in G_2 ; G_1 Ins.: Anzahl der Insertionen in einem G_1 Käfer (= ein Gamet) nach Bandenmuster; gleich oder gemeinsame Ins.: identische Insertion in zwei verschiedenen G_1 Käfern einer Linie; Plasmidseq.: positives Hybridisierungssignal mit der Plasmidsequenz außerhalb des Transposons.

DNA Linien									
#	G_0 m/w	G_1 Käfer		Cluster	G_0 Ins.	Linie, G_1 X	G_1 Segr.	G_1 Ins.	Art der Insertion
		grün	ges.						
1	m	33	228	14,47%	1	A205,1	1		
2	m	5	352	1,42%	1	A308,1	1		
3	m	23	344	6,69%	1	B209,1	1		
4	m	60	297	20,20%	2	B315,1	1		
5	m	13	297	4,38%	1	C205,1	1		
6	m	13	283	4,59%	1	C206,1	1		gleiche Insertion
						C106,2	1		
7	m	39	310	12,58%	1	C207,1	1		
8	m	118	337	35,01%	3	C323,1	2	3	1 neu, 1 identisch mit ,2
						C323,2	1	2	2 gekoppelt (1x Plasmidseq.)
9	w	15	231	6,49%	1	I215,1	1		
10	w	78	283	27,56%	3	I224,1	3	3	
						I124,2	1		
						I124,3	1	1	
11	w	8	213	3,76%	1	K218,1	1		
12	w	20	184	10,87%	1	K224,1	1		

RNA Linien									
#	G ₀ m/w	G ₁ Käfer		Cluster	G ₀ Ins.	Linie, G ₁ X	G ₁ Segr.	G ₁ Ins.	Art der Insertion
		grün	ges.						
1	m	93	311	29,90%	1	D317,1	1	1	gleiche Insertion
						D317,2	1	1	
2	m	74	249	29,72%	2	E302,1	2	2	eine gemeinsame Insertion
						E302,2	1	1	
3	m	33	273	12,09%	1	E308,1	1	1	gleiche Insertion
						E308,2	1	1	
4	m	69	322	21,43%	2	E310,1	1	1	verschiedene Insertionen
						E310,2	1	1	
5	m	62	204	30,39%	2	E320,1	1	1	
6	m	108	264	40,91%	1	F305,1	1	1	gleiche Insertion
						F305,2	1	1	
7	m	261	272	95,96%	≥4	F312,1	3	4	2 gekoppelte Insertionen gemeinsam
						F312,2	1	2	
						F312,3	2	3	
						F312,4	1	1	
8	m	12	222	5,41%	2	G310,1	2	2	1 gemeinsame Insertion
						G310,2	1	1	
9	m	14	175	8,00%	2	G320,1	1	1	
10	m	89	191	46,60%	≥3	H305,1	1	1	
						H305,2	1	2	2 gekoppelt (1x Plasmidseq.)
11	m	6	330	1,82%	1	H12			
12	w	14	167	8,38%	2	N05			
13	w	11	256	4,30%	2	N14			
14	w	44	190	23,16%	1	O05			
15	w	44	197	22,34%	2	O24			
16	w	66	207	31,88%	2	P04			
17	w	11	267	4,12%	1	P07			
18	m	9	283	3,18%	3	D08			
19	m	103	292	35,27%	2	G05			
20	w	66	207	31,88%	3	O04			(1x Plasmidseq.)
21	w	11	268	4,10%	1	Q06			
22	w	64	157	40,76%	2	Q08			
23	m	8	316	2,53%	3	D16			
24	m	5	334	1,50%	1	D19			

A.5. *mariner* (MOS1) Ergänzung Transformationsplasmid

mariner-ähnliche Elemente sind innerhalb und außerhalb der Insekten weit verbreitet. Von 404 untersuchten Insektenspezies wurden 16,6% mittels PCR positiv getestet. Die meisten davon sind allerdings nicht funktionsfähig (Robertson and MacLeod, 1993). Ein autonom springendes Element, *MOS1* wurde aus *D. mauritiana* isoliert (Medhora et al., 1988). Die 3xP3-Markerplasmide mit dem Transposon *MOS1* sind vorhanden und hatten in *Drosophila* eine Effizienz von 4% (Berghammer et al., 1999b). Da aber in verschiedenen Labors Probleme bei der Aufreinigung des Helpers aufgetreten sind, wurde es bisher noch nicht in *Tribolium* getestet. Ein zweiter Nachteil ist, daß *mariner* Elemente weit verbreitet sind und stabile Linien nicht zu erhalten sind, wenn endogene Homologe vorhanden sind, die wieder mobilisieren können. *MOS1* wurde jedoch bereits erfolgreich zur Transformation im Hühnchen (Sherman et al., 1998) und in dem Protisten *Leishmania major* (Gueiros-Filho and Beverley, 1997) eingesetzt.

Zu Kapitel 2

A.6. Blast-Ergebnislisten für *Tc'sal*

Reference:

Altschul, Stephen F., Thomas L. Madden, Alejandro A. Schäffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, and David J. Lipman (1997), "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402.

Liste 1 Gesamtsequenz *Tc'sal*

BLASTX 2.2.4 [Aug-26-2002]; RID: 1039465230-014976-4493

Query= (1050 letters)

Sequences producing significant alignments:	Score (bits)	E Value
gi 21103981 gb AAM33140.1 spalt [Pheidole morrisi]	223	3e-57
gi 24583686 ref NP_723670.1 CG6464-PA [Drosophila melanoga...]	193	4e-48
gi 3041723 sp P39770 SALM_DROME Homeotic protein spalt-majo...	193	4e-48
gi 730703 sp P39806 SALM_DROVI Homeotic protein spalt-major...	181	1e-44
gi 21293756 gb EAA05901.1 agCP14596 [Anopheles gambiae str...]	177	2e-43
gi 12007282 gb AAG45108.1 AF310007_1 spalt transcription fa...	140	4e-32
gi 6172234 dbj BAA85901.1 Xsal-3 short form [Xenopus laevis]	139	5e-32
gi 6172233 dbj BAA85900.1 Xsal-3 long form [Xenopus laevis]	139	5e-32
gi 7512184 pir JC7116 Xsal-3 protein - African clawed frog	139	5e-32
gi 13699238 gb AAK38370.1 spalt 2 protein [Gallus gallus]	138	1e-31
gi 20521013 dbj BAA21638.2 KIAA0360 [Homo sapiens]	136	6e-31
gi 20542184 ref XP_033473.6 similar to KIAA0360 [Homo sapi...]	136	6e-31
gi 26006149 dbj BAC41417.1 mKIAA0360 protein [Mus musculus]	136	6e-31
gi 7657538 ref NP_056587.1 sal-like 2 (Drosophila) [Mus mu...]	136	6e-31
gi 4688923 emb CAB41399.1 zinc finger protein SALL1 [Homo ...]	135	9e-31
gi 6997249 ref NP_002959.1 sal-like 1 (Drosophila); Hsall;...	135	9e-31
gi 14164331 dbj BAB55673.1 zinc finger protein Sall1 [Mus ...]	135	9e-31
gi 25071263 ref XP_193079.1 similar to zinc finger protein...	135	9e-31
gi 10119977 gb AAG13011.1 AF288697_1 spalt 1 [Gallus gallus]	135	9e-31
gi 11496251 ref NP_067365.1 sal-like 1 (Drosophila) [Mus m...]	135	9e-31
gi 20455242 sp Q62255 SAL3_MOUSE Sal-like protein 3 (Spalt-...)	135	1e-30
gi 1916026 gb AAB51127.1 zinc finger protein sal [Oryzias ...]	134	2e-30
gi 5410340 gb AAD43040.1 spalt protein [Gallus gallus]	133	5e-30
gi 25188195 ref NP_741996.1 C2H2 zinc finger protein SALL3...	133	5e-30
gi 7512186 pir T30341 zinc finger protein - African clawed...	133	5e-30
gi 20882657 ref XP_129051.1 spalt homolog [Mus musculus]	133	5e-30
gi 6688241 emb CAB65124.1 spalt-like zinc finger protein [...]	133	5e-30
gi 11643228 gb AAG39477.1 zinc finger protein spalt-3 [Mus...]	132	1e-29
gi 7512033 pir T13805 spalt-related protein - fruit fly (D...)	108	1e-22
gi 17647913 ref NP_523548.1 spalt-related; Chorion factor ...	108	1e-22
gi 17459843 ref XP_066513.1 similar to Sal-like protein 1 ...	107	4e-22
gi 10047144 ref NP_065169.1 similar to SALL1 (sal (Drosoph...)	103	4e-21
gi 21293678 gb EAA05823.1 agCP11734 [Anopheles gambiae str...]	88	2e-16
gi 20833572 ref XP_145042.1 similar to KRAB zinc finger pr...	76	7e-13
gi 17481743 ref XP_058915.1 similar to Sal-like protein 3 ...	76	7e-13
gi 20347056 ref XP_112110.1 similar to Zinc finger protein...	75	2e-12
gi 20858359 ref XP_136897.1 similar to KRAB zinc finger pr...	75	2e-12
gi 17506637 ref NP_491997.1 SEx Muscle abnormal 4; putativ...	75	2e-12
gi 1399935 gb AAB03334.1 SEM-4 short form	75	2e-12
gi 6172236 dbj BAA85902.1 Xsal-3' long form [Xenopus laevis]	75	2e-12
gi 9931086 emb CAC05356.1 putative spalt protein [Danio re...]	74	4e-12
gi 20863164 ref XP_137197.1 similar to CLL-associated anti...	74	4e-12
gi 9931088 emb CAC05357.1 putative spalt protein [Danio re...]	73	6e-12
gi 20862914 ref XP_137194.1 similar to gonadotropin induci...	73	7e-12

Database: All non-redundant GenBank CDS

translations+PDB+SwissProt+PIR+PRF; Posted date: Dec 5, 2002 5:13 AM

Number of letters in database: 396,279,676

Number of sequences in database: 1,243,088

Lambda K H 0.311 0.132 0.400 Gapped

Lambda K H 0.267 0.0410 0.140
 Matrix: BLOSUM62; Gap Penalties: Existence: 11, Extension: 1
 Number of Hits to DB: 749,702,796
 Number of Sequences: 1243088; Number of extensions: 17280942
 Number of successful extensions: 103394
 Number of sequences better than 10.0: 4887
 Number of HSP's better than 10.0 without gapping: 57084
 Number of HSP's successfully gapped in prelim test: 0
 Number of HSP's that attempted gapping in prelim test: 0
 Number of HSP's gapped (non-prelim): 95633
 length of database: 396,279,676; effective HSP length: 123
 effective length of database: 243,379,852; effective search space used: 55003846552
 frameshift window, decay const: 50, 0.1; T: 12; A: 40
 X1:16 (7.2 bits); X2:38 (14.6 bits); X3:64 (24.7 bits); S1:42 (21.8 bits)

Liste 2 Vorderer Abschnitt von *Tc'sal* (1-228; 76 Aminosäuren)

BLASTX 2.2.5 [Nov-16-2002]; RID: 1040156426-06330-7708

Query= (228 letters)

Sequences producing significant alignments:	Score	E Value
	(bits)	
gi 24583686 ref NP_723670.1 CG6464-PA [Drosophila melanoga...	155	1e-37
gi 3041723 sp P39770 SALM_DROME Homeotic protein spalt-majo...	155	1e-37
gi 730703 sp P39806 SALM_DROVI Homeotic protein spalt-major...	155	1e-37
gi 6172233 dbj BAA85900.1 Xsal-3 long form [Xenopus laevis]	139	7e-33
gi 7512184 pir JC7116 Xsal-3 protein - African clawed frog	139	7e-33
gi 6172234 dbj BAA85901.1 Xsal-3 short form [Xenopus laevis]	139	7e-33
gi 21293756 gb EAA05901.1 agCP14596 [Anopheles gambiae str...]	136	6e-32
gi 20521013 dbj BAA21638.2 KIAA0360 [Homo sapiens]	136	8e-32
gi 20542184 ref XP_033473.6 similar to KIAA0360 [Homo sapi...]	136	8e-32
gi 26346482 dbj BAC36892.1 unnamed protein product [Mus mu...]	136	8e-32
gi 26006149 dbj BAC41417.1 mKIAA0360 protein [Mus musculus]	136	8e-32
gi 7657538 ref NP_056587.1 sal-like 2 (Drosophila) [Mus mu...]	136	8e-32
gi 12007282 gb AAG45108.1 AF310007_1 spalt transcription fa...	135	1e-31
gi 11496251 ref NP_067365.1 sal-like 1 (Drosophila) [Mus m...]	135	1e-31
gi 4688923 emb CAB41399.1 zinc finger protein SALL1 [Homo ...]	135	1e-31
gi 6997249 ref NP_002959.1 sal-like 1 (Drosophila); Hsall;...	135	1e-31
gi 14164331 dbj BAB55673.1 zinc finger protein Sall1 [Mus ...]	135	1e-31
gi 25071263 ref XP_193079.1 similar to zinc finger protein...	135	1e-31
gi 10119977 gb AAG13011.1 AF288697_1 spalt 1 [Gallus gallus]	135	1e-31
gi 20455242 sp Q62255 SAL3_MOUSE Sal-like protein 3 (Spalt-...)	135	2e-31
gi 1916026 gb AAB51127.1 zinc finger protein sal [Oryzias ...]	134	2e-31
gi 13699238 gb AAK38370.1 spalt 2 protein [Gallus gallus]	133	7e-31
gi 20882657 ref XP_129051.1 spalt homolog [Mus musculus]	133	7e-31
gi 25188195 ref NP_741996.1 sal-like 3; C2H2 zinc finger p...	133	7e-31
gi 5410340 gb AAD43040.1 spalt protein [Gallus gallus]	133	7e-31
gi 7512186 pir T30341 zinc finger protein - African clawed...	133	7e-31
gi 6688241 emb CAB65124.1 spalt-like zinc finger protein [...]	133	7e-31
gi 11643228 gb AAG39477.1 zinc finger protein spalt-3 [Mus...]	132	2e-30
gi 21103981 gb AAM33140.1 spalt [Pheidole morrisi]	109	1e-23
gi 7512033 pir T13805 spalt-related protein - fruit fly (D...)	108	2e-23
gi 17647913 ref NP_523548.1 spalt-related; Chorion factor ...	108	2e-23
gi 17459843 ref XP_066513.1 similar to Sal-like protein 1 ...	107	5e-23
gi 26339870 dbj BAC33598.1 unnamed protein product [Mus mu...]	104	3e-22
gi 10047144 ref NP_065169.1 similar to SALL1 (sal (Drosoph...)	103	6e-22
gi 21293678 gb EAA05823.1 agCP11734 [Anopheles gambiae str...]	88	3e-17
gi 17481743 ref XP_058915.1 similar to Sal-like protein 3 ...	76	1e-13
gi 20833572 ref XP_145042.1 similar to KRAB zinc finger pr...	76	1e-13
gi 26337027 dbj BAC32197.1 unnamed protein product [Mus mu...]	76	1e-13
gi 17506637 ref NP_491997.1 SEx Muscle abnormal 4; putativ...	75	2e-13
gi 20347056 ref XP_112110.1 similar to Zinc finger protein...	75	2e-13
gi 20858359 ref XP_136897.1 similar to KRAB zinc finger pr...	75	2e-13
gi 1399935 gb AAB03334.1 SEM-4 short form	75	2e-13
gi 6172236 dbj BAA85902.1 Xsal-3' long form [Xenopus laevis]	75	3e-13
gi 26335493 dbj BAC31447.1 unnamed protein product [Mus mu...]	74	4e-13
gi 20863164 ref XP_137197.1 similar to CLL-associated anti...	74	7e-13
gi 9931086 emb CAC05356.1 putative spalt protein [Danio re...]	74	7e-13
gi 9931088 emb CAC05357.1 putative spalt protein [Danio re...]	73	9e-13

gi 20862914 ref XP_137194.1 	similar to gonadotropin induci...	73	1e-12
gi 25023390 ref XP_205110.1 	similar to Kruppel-related zin...	72	1e-12
gi 9931084 emb CAC05355.1 	putative spalt protein [Danio re...	72	1e-12
gi 23604120 ref XP_142585.2 	similar to hypothetical protei...	72	1e-12
gi 20961740 ref XP_142976.1 	similar to hypothetical protei...	72	2e-12
gi 20945891 ref XP_142545.1 	similar to KRAB zinc finger pr...	72	2e-12
gi 17390222 gb AAH18101.1 	Similar to zinc finger protein 9...	71	3e-12
gi 6756069 ref NP_035895.1 	zinc finger protein 97 [Mus mus...	71	3e-12
gi 20963319 ref XP_143004.1 	similar to hypothetical protei...	71	3e-12
gi 17474262 ref XP_062462.1 	similar to zinc finger protein...	71	3e-12
gi 20964604 ref XP_159729.1 	similar to hypothetical protei...	71	4e-12
gi 22047977 ref XP_171666.1 	similar to Sal-like protein 3 ...	71	4e-12
gi 20562103 ref XP_113861.1 	similar to zinc finger protein...	70	6e-12
gi 481054 pir S37690	DNA-binding protein - largemouth bass	70	7e-12
gi 586938 sp P38621 ZN12_MICSA	ZINC FINGER PROTEIN ZFMSA12A...	70	7e-12
gi 20833430 ref XP_145040.1 	similar to zinc finger protein...	70	7e-12
gi 20961968 ref XP_142981.1 	similar to KRAB zinc finger pr...	70	7e-12
gi 26329385 dbj BAC28431.1 	unnamed protein product [Mus mu...	70	9e-12
gi 20884991 ref XP_146871.1 	similar to hypothetical protei...	70	9e-12

Database: All non-redundant GenBank CDS

translations+PDB+SwissProt+PIR+PRF; Posted date: Dec 17, 2002 4:59 AM

Number of letters in database: 405,425,980

Number of sequences in database: 1,268,393

Lambda K H: 0.318 0.135 0.401 ; Gapped

Lambda K H: 0.267 0.0410 0.140

Matrix: BLOSUM62; Gap Penalties: Existence: 11, Extension: 1

Number of Hits to DB: 192,745,107

Number of Sequences: 1268393; Number of extensions: 3881403

Number of successful extensions: 4441; Number of sequences better than 10.0: 4952

Number of HSP's better than 10.0 without gapping: 14302

Number of HSP's successfully gapped in prelim test: 0

Number of HSP's that attempted gapping in prelim test: 0

Number of HSP's gapped (non-prelim): 41903

length of database: 405,425,980; effective HSP length: 51

effective length of database: 340,737,937; effective search space used: 8177710488

frameshift window, decay const: 50, 0.1; T: 12; A: 40

X1: 16 (7.3 bits); X2: 38 (14.6 bits); X3: 64 (24.7 bits); S1: 41 (21.7 bits)

Liste 3 Mittlerer Abschnitt von *Tc'sal* (229-897; 223 Aminosäuren)

BLASTX 2.2.5 [Nov-16-2002]; RID: 1040156742-010358-15135

Query= (669 letters)

		Score	E
Sequences producing significant alignments:		(bits)	Value
gi 21103981 gb AAM33140.1 	spalt [Pheidole morrisi]	52	5e-06
gi 21302492 gb EAA14637.1 	agCP2591 [Anopheles gambiae str....	46	4e-04
gi 12831207 ref NP_075579.1 	gamma-aminobutyric acid A rec...	42	6e-04
gi 11610622 gb AAG38961.1 AF255385_1	GABA-A epsilon subunit...	42	6e-04
gi 14571747 emb CAC42804.1 	possible protease I [Pneumocyst...	44	0.002
gi 15222649 ref NP_173940.1 	Pto kinase interactor, putativ...	44	0.002
gi 2327063 gb AAB66702.1 	protease 1 [Pneumocystis carinii ...	43	0.004
gi 8393396 ref NP_059065.1 	gamma-aminobutyric acid (GABA-A...	43	0.004
gi 7861746 gb AAF70384.1 AF189263_1	GABA-A receptor epsilon...	43	0.004
gi 18478606 gb AAL73214.1 AF337054_1	repetitive proline ric...	42	0.007

Database: All non-redundant GenBank CDS

translations+PDB+SwissProt+PIR+PRF; Posted date: Dec 17, 2002 4:59 AM

Number of letters in database: 405,425,980

Number of sequences in database: 1,268,393

Lambda K H: 0.307 0.130 0.386 ; Gapped

Lambda K H: 0.267 0.0410 0.140

Matrix: BLOSUM62; Gap Penalties: Existence: 11, Extension: 1

Number of Hits to DB: 456,239,742; Number of Sequences: 1268393

Number of extensions: 10357310; Number of successful extensions: 56035

Number of sequences better than 10.0: 805

Number of HSP's better than 10.0 without gapping: 39824

Number of HSP's successfully gapped in prelim test: 0

Number of HSP's that attempted gapping in prelim test: 0
 Number of HSP's gapped (non-prelim): 50788
 length of database: 405,425,980; effective HSP length: 118
 effective length of database: 255,755,606; effective search space used: 26598583024
 frameshift window, decay const: 50, 0.1; T: 12; A: 40
 X1: 16 (7.1 bits); X2: 38 (14.6 bits); X3: 64 (24.7 bits); S1: 42 (21.6 bits)

Liste 4 Hinterer Abschnitt von *Tc'sal* (898-1050; 51 Aminosäuren)

BLASTX 2.2.5 [Nov-16-2002]; RID: 1040156614-08807-22403

Query= (153 letters)

Sequences producing significant alignments:	Score (bits)	E Value
gi 21103981 gb AAM33140.1 spalt [Pheidole morrisi]	102	1e-21
gi 21293756 gb EAA05901.1 agCP14596 [Anopheles gambiae str...]	63	1e-09
gi 7512033 pir T13805 spalt-related protein - fruit fly (D...)	54	6e-07
gi 17647913 ref NP_523548.1 spalt-related; Chorion factor ...	54	6e-07
gi 24583686 ref NP_723670.1 CG6464-PA [Drosophila melanoga...]	50	1e-05
gi 3041723 sp P39770 SALM_DROME Homeotic protein spalt-majo...	50	1e-05
gi 730703 sp P39806 SALM_DROVI Homeotic protein spalt-major...	49	2e-05
gi 12007282 gb AAG45108.1 AF310007_1 spalt transcription fa...	35	0.28
gi 9931088 emb CAC05357.1 putative spalt protein [Danio re...]	34	0.48
gi 25188195 ref NP_741996.1 sal-like 3; C2H2 zinc finger p...	34	0.48
gi 6688241 emb CAB65124.1 spalt-like zinc finger protein [...]	34	0.48
gi 5410340 gb AAD43040.1 spalt protein [Gallus gallus]	34	0.48
gi 1916026 gb AAB51127.1 zinc finger protein sal [Oryzias ...]	34	0.48
gi 13699238 gb AAK38370.1 spalt 2 protein [Gallus gallus]	34	0.48
gi 20882657 ref XP_129051.1 spalt homolog [Mus musculus]	34	0.48
gi 20455242 sp Q62255 SAL3_MOUSE Sal-like protein 3 (Spalt-...)	34	0.48
gi 7512186 pir T30341 zinc finger protein - African clawed...	34	0.63
gi 10119977 gb AAG13011.1 AF288697_1 spalt 1 [Gallus gallus]	33	1.4
gi 4688923 emb CAB41399.1 zinc finger protein SALL1 [Homo ...]	32	3.1
gi 6997249 ref NP_002959.1 sal-like 1 (Drosophila); Hsall1;...	32	3.1
gi 11496251 ref NP_067365.1 sal-like 1 (Drosophila) [Mus m...]	32	3.1
gi 14164331 dbj BAB55673.1 zinc finger protein Sall1 [Mus ...]	32	3.1
gi 25071263 ref XP_193079.1 similar to zinc finger protein...	32	3.1
gi 9931084 emb CAC05355.1 putative spalt protein [Danio re...]	32	3.1
gi 11643228 gb AAG39477.1 zinc finger protein spalt-3 [Mus...]	30	6.9

Database: All non-redundant GenBank CDS
 translations+PDB+SwissProt+PIR+PRF; Posted date: Dec 17, 2002 4:59 AM
 Number of letters in database: 405,425,980
 Number of sequences in database: 1,268,393
 Lambda K H: 0.305 0.126 0.349 ; Gapped
 Lambda K H: 0.267 0.0410 0.140
 Matrix: BLOSUM62; Gap Penalties: Existence: 11, Extension: 1
 Number of Hits to DB: 113,015,797
 Number of Sequences: 1268393; Number of extensions: 1494007
 Number of successful extensions: 2779; Number of sequences better than 10.0: 50
 Number of HSP's better than 10.0 without gapping: 2761
 Number of HSP's successfully gapped in prelim test: 0
 Number of HSP's that attempted gapping in prelim test: 0
 Number of HSP's gapped (non-prelim): 2778
 length of database: 405,425,980; effective HSP length: 26
 effective length of database: 372,447,762; eff. search space used: 8938746288
 frameshift window, decay const: 50, 0.1; T: 12; A: 40
 X1: 16 (7.0 bits); X2: 38 (14.6 bits); X3: 64 (24.7 bits); S1: 43 (21.9 bits)

Zu weiteren Projekten

A.7.1. SpermienSpeicherung in *Tribolium*

Weibchen und Männchen aus dem Stamm p^2 (Rd, mc, lod) wurden als Puppen getrennt. Ca. 6 Wochen nach dem Schlüpfen wurde ein adultes Weibchen mit drei adulten Männchen auf Vollkornmehl bei 32° C zusammengesetzt. Nach drei Wochen wurden die Männchen wieder entfernt. Zur Kontrolle der Anzahl der Nachkommenschaft wurden alle 48 h Ablagen genommen. Die ersten beiden Ablagen (grau unterlegt) stammen aus den letzten 4 Tagen, als die Männchen noch vorhanden waren, als Test für die Legekapazität mit anwesenden Männchen. Die nachfolgende Tabelle enthält die Ergebnisse aus 36 von 48 parallelen Kreuzungen. 12 wurden ausgeschlossen, da das Weibchen gestorben war.

Weibchen #	je 48h Ablage bis zum Tag:										
	-2	0	2	4	6	8	10	12	14	16	19
1	1	9	7	5	3	1	1	3	2	1	2
2	5	6	7	3	4	1	4	6	6	4	3
3	7	11	11	9	7	7	6	4	3	0	0
4	3	2	11	7	4	3	8	5	4	8	5
5	0	0	1	5	8	3	1	2	12	13	10
6	9	14	17	17	19	1	4	11	9	6	4
8	5	10	7	6	11	0	6	3	5	2	0
10	5	10	3	6	6	5	2	0	0	0	0
11	5	4	10	9	7	5	3	10	4	3	1
14	8	10	12	7	2	0	0	0	0	0	0
15	10	11	14	13	11	4	3	1	0	1	0
16	6	9	7	10	8	1	2	1	4	0	0
17	6	10	10	11	13	0	15	6	10	10	8
19	5	5	2	4	4	4	7	7	4	4	3
23	13	9	12	6	7	5	4	2	0	0	0
24	6	13	11	12	10	7	5	3	6	6	4
25	0	0	14	21	20	10	22	21	17	7	14
26	5	13	10	8	2	10	3	8	4	1	1
27	6	10	7	5	6	7	1	4	3	1	2
29	0	0	5	9	7	3	2	0	0	0	0
30	4	15	14	7	10	2	6	8	11	3	13
32	11	11	17	11	5	4	1	3	0	0	0
35	4	6	12	7	10	6	8	7	2	3	2
36	6	8	12	9	15	4	0	0	0	0	0
37	5	9	12	10	10	6	5	9	8	4	10
38	8	9	4	9	9	6	2	8	4	4	5
39	3	6	6	6	5	4	2	3	5	2	3
40	9	10	12	13	16	14	13	9	3	2	2
41	6	10	1	1	0	0	0	0	0	0	0
42	7	4	5	4	3	0	0	0	1	4	5
43	2	8	8	8	4	6	2	7	1	2	6
44	18	13	8	13	9	12	6	6	5	1	2
45	6	9	12	4	5	2	7	4	3	2	3
46	8	6	5	2	4	3	4	3	4	4	2
47	1	0	3	1	3	5	6	3	0	0	3
48	6	9	5	5	12	9	6	1	2	2	1
Summe	209	289	314	283	279	160	167	168	142	100	114
pro Weibchen	5,8	8,0	8,7	7,9	7,8	4,4	4,6	4,7	3,9	2,8	3,2

Zur Verbesserung der Überlebensfähigkeit wurden je drei unbefruchtete Weibchen (Stamm SB) dazugegeben, die über lange Zeit bereits separat gehalten worden waren. Die Nachkommen wurden als adulte Käfer ausgezählt. Der Legeerfolg der verschiedenen Weibchen ist sehr unterschiedlich. Zusammen mit den Männchen hatten die Weibchen durchschnittlich 5,8 bis 8,0 Nachkommen je 48 h. Dieser Wert ändert sich die ersten 6 Tage ohne die Männchen nicht und fällt dann ab. Das erste Weibchen (#41) hat bereits nach 4 Tagen keinen Nachwuchs (gelb unterlegt) mehr. Die Fähigkeit zur Spermien-speicherung und zum Legen von fertilen Eiern über mehrere Wochen hin, ist jedoch vorhanden. Zum Versuchsende nach 19 Tagen (letzte Ablage 72 h) waren noch 25 der 36 Weibchen in der Lage fertile Eier zu produzieren.

A.7.2. Spermienverdrängung in befruchteten Weibchen

Ein zweiter Versuch wurde identisch wie der Vorhergehende angesetzt. Nachdem die weißäugigen Männchen entfernt waren, wurde dann aber den Weibchen jeweils ein schwarzäugiges Männchen (SB) zugegeben. Die ersten beiden Ablagen (grau unterlegt) sind wieder diejenigen vor dem Männchenwechsel, die weiteren wurden nach dem Wechsel genommen. Die Nachkommen wurden als adulte Käfer ausgezählt. Der erste Teil der Tabelle enthält die Anzahl der weißäugigen Nachkommen, die von den ersten Vätern stammen. Im zweiten Teil ist die Anzahl der schwarzäugigen Nachkommen des jeweiligen Weibchens eingetragen, die von dem SB-Vater stammen müssen. Die nachfolgende Tabelle enthält die Ergebnisse aus 28 von 48 parallelen Kreuzungen. 20 wurden ausgeschlossen, da das Weibchen oder das neue Männchen gestorben war.

Weibchen #	weißäugige Nachkommen (je 48h Ablage) bis zum Tag:									
	-2	0	2	4	6	8	10	12	14	16
1	10	6	0	1	0	0	0	0	0	0
2	12	10	2	0	0	0	0	0	0	0
3	8	9	0	1	0	0	0	0	0	0
7	7	10	1	0	0	0	0	0	0	0
8	10	11	0	0	0	0	0	0	0	0
9	8	13	0	1	0	0	0	0	0	0
11	9	2	0	0	0	0	0	0	0	0
12	5	2	1	0	0	0	0	0	0	0
15	15	12	0	1	0	0	0	0	0	0
16	15	9	1	1	0	0	0	0	0	0
17	14	10	2	0	0	0	0	0	0	0
18	8	4	0	0	0	0	0	0	0	0
19	15	8	3	0	0	0	0	0	0	0
21	14	4	0	0	0	0	0	0	0	0
22	5	3	0	0	0	0	0	0	0	0
23	6	14	4	0	0	0	0	0	0	0
26	12	11	1	0	0	0	0	0	0	0
28	20	8	0	0	0	0	0	0	0	0
32	7	10	0	0	0	0	0	0	0	0
33	12	9	1	0	0	0	0	0	0	0
37	3	9	4	0	0	0	0	0	0	0
38	9	3	0	0	0	0	0	0	0	0
42	12	7	7	2	0	0	0	0	0	0
44	11	10	0	0	0	0	0	0	0	0
45	5	9	3	1	0	0	0	0	0	0
46	5	12	1	0	0	0	0	0	0	0
47	5	10	3	0	0	0	0	0	0	0
48	7	9	1	0	0	0	0	0	0	0
Summe	269	234	35	8	0	0	0	0	0	0
pro Weibchen	9,0	7,8	1,2	0,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

Weibchen #	schwarzäugige Nachkommen (je 48h Ablage) bis zum Tag:									
	-2	0	2	4	6	8	10	12	14	16
1	0	0	9	4	10	7	4	2	7	9
2	0	0	7	6	13	13	12	11	8	8
3	0	0	8	14	10	8	3	4	2	13
7	0	0	0	11	9	7	5	3	3	6
8	0	0	9	13	16	5	11	13	10	16
9	0	0	9	15	20	10	10	20	7	15
11	0	0	0	2	6	4	4	2	1	1
12	0	0	0	7	7	8	3	7	5	4
15	0	0	0	11	8	19	20	16	11	16
16	0	0	0	10	14	15	17	18	14	15
17	0	0	0	22	22	13	14	12	10	16
18	0	0	8	10	12	9	6	11	8	8
19	0	0	0	16	11	11	9	5	6	6
21	0	0	7	3	2	2	8	3	4	5
22	0	0	10	1	0	2	6	2	0	4
23	0	0	7	12	13	8	12	8	10	10
26	0	0	9	14	10	8	8	9	10	10
28	0	0	7	15	15	9	11	10	4	6
32	0	0	14	9	13	10	9	10	9	11
33	0	0	16	15	16	18	16	13	12	13
37	0	0	9	11	8	13	12	10	12	15
38	0	0	6	4	2	5	3	0	4	9
42	0	0	13	13	10	7	5	8	6	8
44	0	0	8	13	8	10	8	5	2	5
45	0	0	4	9	12	10	9	8	3	3
46	0	0	1	16	15	17	13	17	16	15
47	0	0	8	23	19	19	15	26	9	17
48	0	0	9	9	10	9	12	5	2	11
Summe	0	0	178	308	311	276	265	258	195	275
pro Weibchen	0	0	5,933	10,27	10,37	9,2	8,833	8,6	6,5	9,167
Anteil schwarz	0%	0%	84%	97%	100%	100%	100%	100%	100%	100%

Die Zahlen belegen, daß die Spermienverdrängung durch das neue Männchen sehr erfolgreich und schnell stattfindet. Bereits in den ersten 2 Tagen sind in 21 der 28 Kreuzungen schwarzäugige Nachkommen. Der Anteil der SB-Nachkommen aller Kreuzungen dieser Ablage beträgt 83%, in der Ablage bis Tag 4 beträgt er 97% und nach 4 Tagen sind dauerhaft alle Nachkommen schwarzäugig (gelb unterlegt).

Beide Fragestellungen sind für die praktische Arbeit mit Tribolium-Mutanten vor Bedeutung, wenn adulte Käfer für eine bestimmte embryonale Mutation über vorgetestet werden müssen und danach mit anderen Linien gekreuzt werden sollen.

A.8. Analyse von dorso-ventralen Mutanten

Zu Beginn dieser Arbeit wurden auch die dorso-ventralen EMS-Mutanten 7b14 und 11b13 teilweise typisiert. Da dies zu Gunsten anderer Projekte abgebrochen wurde, werden hier die Ergebnisse nur in einigen Stichpunkten dargestellt (Abb. A.8). Beide Mutanten zeichnen sich dadurch aus, daß ventrale Positionen fehlen. Dies ist in der Kutikula an den fusionierten gnathalen Mundwerkzeugen und Beinen zu sehen (7b14 Abb. A.8 A-C; von 11b13 ist keine Ausschnittvergrößerung vorhanden). Der Prägnathos mit Labrum und den Antennen ist nicht verändert. Bei 7b14 ist meist der Körper bis zum Ende des Thorax gebildet und das Abdomen stark reduziert und mißgebildet (A, C), es gibt aber auch kürzere Phänotypen (B). Die Stärke der Fusionen an den Beinen ist variabel und schließt nur die Coxa ein oder reicht bis zum Femur oder bis zum Trochanter (A). Die *in situ* Färbung mit *distalless* an 7b14 Keimstreifen bestätigt dies. Im Gegensatz zum *wt* (E) liegen die gefärbten Bereiche der auswachsenden Extremitätenknospen näher zusammen (F) und bilden nur eine fusionierte Knospe (D) anstatt zwei getrennten (E). An diesen Färbungen ist ebenfalls zu sehen, daß auch im Prägnathos (Labium und Antenne) ventrale Bereiche fehlen (F). Die Antikörperfärbung mit dem mesoderm-spezifischen anti-Twist Antikörper beweist allerdings, daß nicht der gesamte ventrale Bereich fehlt, sondern an beiden Seiten ventro-laterales Gewebe nicht angelegt wird. Die ventral in der Mitte liegenden Zellen, die bei der Gastrulation invaginieren und das Mesoderm bilden, werden also in dieser Mutante 7b14 differenziert. Die Mutante 11b13 ist stärker reduziert als 7b14. In der Regel sind nur einige fusionierte Mundwerkzeuge zu erkennen. Der Rest des Körpers bildet nur noch krümelige, unzusammenhängende Kutikulastücke (H). Die Fuchsinfärbung von 11b13 Embryonen (I) zeigt damit übereinstimmend einen reduzierten Thorax und Abdomen (im Vergleich dazu der *wt* in J). Beiden Mutanten gemeinsam ist, daß der anteriore Abschnitt mit Gnathos und Thorax, der bereits während des Blastoderms angelegt wird, noch grundsätzlich eine Dorso-ventral-Achse besitzt (auch wenn ventro-laterale Schicksale fehlen). Beim Keimstreifwachstum kann diese dann anscheinend nicht mehr richtig aufrechterhalten werden, da der Abdomen als drehrunder Schlauch auswächst und die mesodermalen Zellen rundum zu finden sind (G). Eine Unterscheidung zwischen dem flachen Keimstreif und der dünnen Amnionmembran, wie im Wildtyp (E, J), ist nicht mehr zu erkennen. Der Keimstreif wächst nicht entlang der Serosa aus (J), sondern taucht in den Dotter ab (I). Eine anti-Engrailed Antikörperfärbung zeigt jedoch, daß die Segmentierung noch zumindest einige Zeit weitergeführt wird (nicht gezeigt).

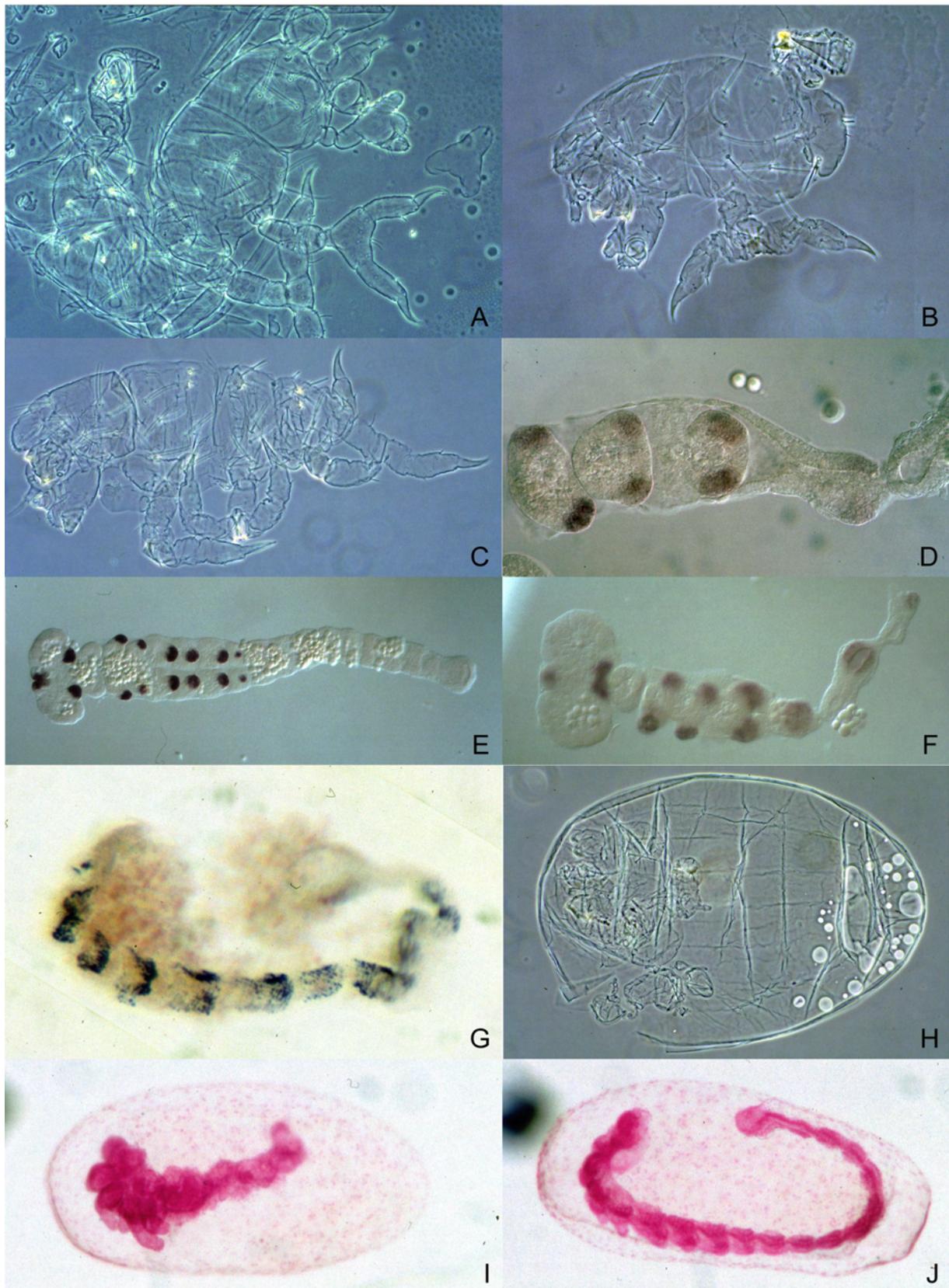


Abb. A.8 Bildzusammenstellung der Dorso-ventral-Mutanten 7b14 und 11b13
 (A-C) Kutikulaphänotypen von 7b14. (D-F) *distalless in situ* Färbungen an wt (E) und 7b14 (D, F). (G) α -Twist Antikörperfärbung an 7b14. (H) Kutikulaphänotyp von 11b13. (I, J) Fuchsinfärbung an 11b13 (I) und wt (J). Die Embryonen sind nicht im gleichen Maßstab abgebildet.

Abkürzungsverzeichnis

wt	Wildtyp
<i>HOM-C</i>	Homöotischer Komplex im <i>Tribolium</i> Genom
G ₀	Adultes Tier aus einer mit Transposon-DNA injizierten Eizelle
G ₁	direkte Nachkommen eines G ₀ , potentiell transgen
DNA	Desoxyribonukleinsäure
RNA	Ribonukleinsäure
ds	doppelsträngig
mRNA	Boten RNA, prozessiertes Transkript
UTR	untranslatierte Region der mRNA
nt	Nukleotid
bp	Basenpaar
kb	Kilobase
aa	Aminosäure (amino acid)
mg	Milligramm
µg	Mikrogramm
ng	Nanogramm
d	Tag(e)
h	Stunde(n)
Min.	Minute(n)
'	Minute(n)
''	Sekunde
°C	Grad Celsius
SD	Standardabweichung (standard deviation)

Material & Methoden

Tribolienstämme und Marker

Das in dieser Arbeit beschriebene Muster der Kutikula wurde nach Dauerpräparaten in Hoyers/Milchsäure angefertigt. Es handelt sich dabei um das erste Larvenstadium (L1) unseres Labor-Wildtyp-Stammes SB. Dieser stammt aus dem Freiburger Labor von Prof. K. Sander und ist vermutlich auf den San Bernadino Stamm von A. Sokoloff aus den USA zurückzuführen; daher die Bezeichnung SB.

Die Beschreibung der verschiedenen morphologischen Marker und weiterer Mutanten ist auf der Internetseite des Labors von Dr. Beeman (Manhattan/Kansas) zu finden. <http://bru.gmprc.ksu.edu/proj/tribolium/index.asp>

SB	San Bernadino, Labor Wildtyp
p, Rd, mc, lod	für alle Marker homozygoter Stamm
p ² (Rd, mc, lod)	einmal mit SB ausgekreuzt; nur für <i>pearl</i> homozygot, für die übrigen Marker auch wt Allele im Stamm
p	<i>pearl</i> , Stamm ohne Augenpigmentierung
vermilion	Tryptophan Oxygenase Mutante, weiße Augen
Rd	Reindeer
mc	microcephalic
lod	light ocular diaphragm
<i>Ey</i>	Eyeless, Balancer für <i>HOM-C</i>
<i>Es</i>	<i>Abdominal</i> (Extra sclerite) <i>A(Es-1)</i> , Balancer für <i>HOM-C</i>
<i>Df(HOM-C)</i>	Defizienz <i>HOM-C</i>
<i>wurm</i>	EMS Linie 10b17 (Klingler Labor)
<i>überlänge</i>	EMS Linie 10d21 (Klingler Labor)
pB A19	<i>piggyBac</i> Marker Insertionslinie mit Muskelenhancer
pH K11	<i>Hermes</i> Marker Insertionslinie
pH K22	<i>Hermes</i> Marker Insertionslinie

Molekularbiologische Methoden

Soweit nicht anders angegeben, wurden die in (Sambrook and Russel, 2001) angegebenen Standardmethoden verwendet. Folgende Methoden wurden entsprechend der Herstellerangaben angewendet:

Plasmidaufreinigung: Qiagen Midi Prep

Bandenaufreinigung: Qiaquick (Qiagen), Jetsorb (Genomed)

Sequenzierung: auf ABI 377 Automated Sequencer mit Cycle Sequencing Big Dye (Applied Biosystems)

Mitosemarkierung: BrdU (Boehringer Mannheim #1299964)

mRNA Herstellung: Capped RNA. Ambion mMessage mMachine mit anschließender Phenol/Chloroform, Chloroform Extraktion und Isopropanol Fällung.

Antikörper

α Eve	monoklonal α EVE (mAb 2B8) (Patel et al., 1994)
α En	monoklonal α EN/INV (mAb 4D9) (Patel et al., 1989)
α PCNA	α Proliferating Cell Nuclear Antigen (PC10), Sigma P8825
α PHO 3	α Phospho Histon H3, Biomol 53271/1
Goat α Mouse-AP	Dianova

α twist	Klaus Handel, Labor S. Roth
α Fluoreszin-AP	Boehringer Mannheim
α Digoxygenin-AP	Roche

Plasmide

pKSHH	<i>Hermes</i> Helper von A. Sarkar
pBachsp	<i>piggyBac</i> Helper von A. Handler
pMiLRTetR	von Tassos Pavlopoulos
pHSS6hsMi2	von Tassos Pavlopoulos
pHSS6hsMi20	von Tassos Pavlopoulos
pBSSKMimRNA	<i>Minos</i> Helper Transkriptionsplasmid
pBstIISK	Stratagene
pZErO-2	Invitrogen
pSL1180	apbiotech

Konstruktion des *Hermes*-Markerplasmids pH[3xP3-EGFP]

Für das *Hermes* Konstrukt wurde das gut 200 bp lange Fragment *Eco* RI/*Apa* I aus dem phsCaSpeR β gal (Sheng et al., 1997) ausgeschnitten und ebenso in den Klonierungsbereich von pHermesEGFP (aus dem Labor Atkinson) eingesetzt.

Konstruktion des *piggyBac*-Markerplasmids pB-G #3

Für das erste *piggyBac* Konstrukt wurde zunächst das EGFP-SV40 poly A mit *Sal* I/*Cla* I aus pHermesEGFP entnommen und in psl1180 (Pharmacia) zwischenkloniert (psIEGFP). Das 3xP3 Fragment wurde dann *Eco* RI/*Sal* I ausgeschnitten und in psIEGFP eingefügt. Das entstandene Markergen (ca. 1,3 kb) wurde *Eco* RI (Klenow blunt)/*Nru* I isoliert und in die *Hpa* I Schnittstelle des *piggyBac* Plasmids p3E1.2 gesetzt.

Konstruktion des *Minos* Markerplasmid pMi[3xP3-EGFP]

Die Markerkassette [3xP3-EGFP-SV40] wurde *Eco* RI/*Fse* I aus pSL[3xP3EGFP] (E. Wimmer) ausgeschnitten und nach Auffüllen des *Fse* I Endes in pBluescript (*Eco* RI/*Sma* I) einkloniert. Dieses wurde dann wieder *Xho* I/*Xba* I entnommen und so zwischen die *Minos* inverted repeats des Plasmids pMiLRTetR (Klinakis et al., 2000a) eingesetzt. Dabei wurde eine interne *Not* I Schnittstelle zwischen dem EGFP Gen und dem SV40 Terminator entfernt, um eine weitere *Not* I Schnittstelle im Polylinker für das Einsetzen zusätzlicher DNA nutzen zu können. (A. Babaratsas, A. Klinakis und C. Savakis)

Konstruktion des Transkriptionsplasmids pBSSKMimRNA

Ein *Pst* I (blunt)/*Not* I Fragment mit der Transkriptionseinheit der *Minos* Transposase wurde aus dem Plasmid pNB40ILTMi (Kapetanaki et al., 2002) entnommen und *Kpn* I (blunt)/*Not* I in pBStSKII+ eingesetzt. Nach Linearisierung mit *Not* I wird mit der T7 Polymerase transkribiert.

Konstruktion von pBaf[*Dm'*hb Δ Nco I-3'bcd]

Das Plasmid pBst-C-P2-hb-bcd Sac II (Labor Tautz Klon #170; (Schulz and Tautz, 1994)) wurde *Nco* I verdaut und religiert, wobei der Bereich 4892-6305 des *Dm'hunchback*-Gens mit Box B und den 4 zentralen Zinkfingern verloren geht (Tautz et al., 1987). Das Rest-Gen wird *Not* I/*Sal* I in psl1180af zwischenkloniert und mit den *Asc* I Schnittstellen in pBaf(EGFP) eingefügt.

Konstruktion von pB[*Dm'hsp70-lacZΔ-3'osk*]

Das Vorläuferplasmid ist psl1180af[*hs-lacZ*]. Dazu wurde *Dm'hsp70-AUGlacZ-SV40* aus dem pCasper-AUGβGal Vektor (Thummel et al., 1988) *Eco RI/Pst I* in psl1180af kloniert. Das *Dm'oskar-3'UTR* stammt aus dem Plasmid pBSosk-3'UTR (Labor Tautz Klon #182), wurde *Eco RV/Sac I* in psl1180af[*hs-lacZ*] kloniert und mit den *Asc I* Schnittstellen in pBafm(EGFP) eingefügt. *AUG-lacZ* wird dabei auf 1,1 kb verkürzt, da *Eco RV* im *lacZ* schneidet und *Sac I* hinter dem Konstrukt im Polylinker von psl1180 schneidet.

Konstruktion von pBaf[4xA3-*lacZ*]

Das komplette Element wurde aus dem pWHL[4xA3-*lacZ*] Plasmid (Labor W. Driever) *Xba I* in psl1180 zwischenkloniert und mit den *Asc I* Schnittstellen in pBaf(EGFP) eingefügt.

Konstruktion von pBafm[*Tc'hb 5,2kb-lacZ*]

Das Promotorfragment mit den Anfang des *lacZ* Reportergens wurde *Xba I/BssH II* aus pCasper-βGal[*Tc'hb-XS5.2*] entnommen (Wolff et al., 1998). Der Rest des *lacZ* mit dem *SV40* Terminator wurde *BssH II/Sal I* aus dem pCasper-AUGβGal (Thummel et al., 1988) isoliert und beide Fragmente zusammen mit dem *Xba I/Sal I* geöffneten psl1180af ligiert. Der Leserahmen für das LacZ Protein blieb somit erhalten. Das Element wurde *Asc I* in pBafm(EGFP) übertragen.

Telt Plasmid Mini Prep (Tautz Labor 1999)

Schema für die Herstellung der Telt Lösung:

Probenzahl	Mengenangabe in µl				
	12x	18x	24x	36x	48x
1M Tris pH 7,5-8	100	150	200	300	400
0,5 M EDTA pH 7,5	260	390	520	780	1,040
10 % Triton-X-100	80	120	160	240	320
3,2 M LiCl	1560	2340	3120	4680	6240
Lysozym 50 mg/ml	200	300	400	600	800
RNAse 10 mg/ml (gekocht)	2	3	4	6	8
TELT Puffer (in µl):	2200	3300	4400	6600	8800

Übernachtukturen (3 ml LB mit Antibiotikum) werden mit einer einzelnen Kolonie von der Platte angeimpft und im Schüttler bei 37°C inkubiert. Am darauffolgenden Tag werden davon 1,5 ml in ein Eppendorfgefäß abgefüllt und 2 Min. lang bei 5000 U/Min. sedimentiert. Der Überstand wird abgenommen, 165 µl Telt Lösung zugefügt und durch vortexen resuspendiert. Nach 5 Min. bei RT, wird die Flüssigkeit 2 Min. bei 95-100°C gekocht und 5 Min. auf Eis abgekühlt. Das ausgefallene Protein wird 10 Min. bei 10000 U/Min. abzentrifugiert und mit einem Zahnstocher oder einer Pasteurpipette entfernt. Dann werden 165 µl Isopropanol zugegeben, gemischt, 5 Min. bei RT stehen gelassen und die DNA durch 15 Min. mit 15000 U/Min. präzipitiert. Der Überstand wird verworfen, mit 600 µl 70 % Ethanol gewaschen, nochmals 10 Min. mit 15000 U/Min. zentrifugiert und wiederum der Überstand abgenommen. Der restliche Alkohol wird in der Vakuumzentrifuge für ca. 3-5 Min. abgedampft und das Pellet in 70 µl TE gelöst. Eine weitere Behandlung von 2 Min. bei 95-100°C zerstört möglicherweise noch vorhandene DNAsen. Die Plasmide können so bei –20°C eingefroren oder im Kühlschrank bei 4°C aufgehoben werden. Der Ertrag sollten etwa 3 µg DNA sein, die vor allem für diagnostische Verdaus verwendet werden können.

Alternativ kann die RNAse Behandlung auch im Auftragspuffer erfolgen. Dazu werden 5 µl RNAse (10 mg/ml) auf 1 ml Puffer gegeben und vor dem Auftragen ca. 5 Min. gewartet.

Allgemeine PCR Bedingungen

0,1 µl	Amplitaq
1 µl	10x Puffer (Mg)
1 µl	dNTP Mix 2mM
1 µl	0,5 µl je Primer (20 µM)
6,9 µl	DNA und H ₂ O
<hr/>	
10 µl	

Klonierung von PCR Produkten in pZErO-2 (Invitrogen)

Die Verwendung des pZErO Vektors erfolgte weitgehend entsprechend den Herstellerangaben. Das Plasmid wurde Eco RV geschnitten, um PCR Produkte ligieren zu können. Mittels Elektroporation wurden TOP10F' Bakterienzellen transformiert und auf Kan/IPTG Platten selektiert (Kan 25 – 50 µg/ml, IPTG 1 mM).

Colony PCR

Aus der PCR werden auch kurze Bruchstücke effizient ligiert. Um schnell testen zu können, welche Plasmide die richtige Größe enthalten, kann man PCRs auch mit einigen wenigen Bakterien verschiedener Kolonien ansetzen und anschließend auf dem Gel analysieren. Ebenso kann man sich auf diese Weise beim Klonieren unbekannter Sequenzen mittels redundanter Primer einen Überblick über die verschiedenen Größenklassen verschaffen.

Dazu wird der PCR Mix fertig pipettiert und auf die Reaktionsgefäße verteilt. Mit einem sterilen Zahnstocher wird eine einzelne Bakterienkolonie von der Platte aufgenommen, zuerst auf eine neue, nummerierte Platte überimpft und dann auch in die PCR Lösung eingetaucht und eingemischt.

1'	94°C	} 30 Zyklen	Aufschmelzen der Stränge
30"	94°C		Annealing (spezifische Temperatur)
45"	z.B. 61°C		Extension
1' je kb	72°C		Vervollständigen
7-10'	72°C		Kühlen bis zur Entnahme
	4°C		

Für Colony PCR von pZErO Ligationen wurde das Primerpaar pBS-A und pBS-E verwendet. Die Distanz zwischen beiden in einem leeren Vektor beträgt 245 bp (Mindestbandengröße).

pBS-A: 5' CTA TGA CCA TGA TTA CGC CAA G 3'
 pBS-E: 5' TGA CCC TTT TGG GAC CGC AAT 3'

Aufreinigung von PCR Produkten

Nach der PCR müssen die Produkte von den unverbrauchten Primern und Nukleotiden getrennt werden, die z.B. die Klonierung behindern würden. Dies ist über ein Gel möglich oder mit Hilfe verschieden großer Filter, wie Microcon 100 oder 50 von Amicon. Sie lassen kleinere Moleküle durch und halten die größeren zurück.

Die Membran muß vorher mit 50 µl H₂O für 15 Min. angefeuchtet werden. Das PCR Produkt wird dann darauf gegeben und mit 500x g (M 100; ≥ 125 ds Nukleotide) oder mit 14000x g (M 50; ≥ 100 ds Nukleotide) zentrifugiert. Nach zweimaligem Waschen mit 450 µl H₂O und jeweils 15 Min. Zentrifugation, wird die DNA auf der Membran mit 10 µl H₂O gelöst und umgekehrt in ein neues Eppendorfgefäß zentrifugiert (3 Min. mit 1000x g)

Klonierung von *Tc'spalt*

Redundante Primer für die Klonierung von *Tc'sal*.

Bezeichnung	Sequenz (5'→3')	Tm	Position in D.m.
<i>Tc'degsal-II/1</i> >	AA(CT) GA(AG) CC(AGCT) TT(CT) TT(CT) AA(AG) CA	51,2°C	7370
<i>Tc'degsal-II/4</i> >	AA(CT) CT(AGCT) AA(AG) GT(AGCT) CA(CT) TT(CT) CA	51,2°C	7514
<i>Tc'degsal-II/5</i> <	A(CT)(AGCT) AC(AG) CA(CT) TG(AG)TT(AGCT) GG(AG) TC	56,3°C	8520

Tm = Schmelztemperatur, Positionsangabe nach Genbank Accessionnummer X75541 (gesamt 12164 bp) (Kühnlein et al., 1994).

Mit der Primerkombination I/1 + II/5 wurden in der PCR zwei deutliche Banden der Größen 0,6 und 1,0 kb amplifiziert. Die Bedingungen waren:

1' 94°C, [1' 94°C, 2' Annealing, 2' 72°C] x40 Zyklen, 7' 72°C

Annealingtemperatur absteigend 54°C 10 Zyklen, 52°C 10 Zyklen, 50°C 20 Zyklen

Diese wurden getrennt reamplifiziert und nach Aufreinigung mit dem Quiaquick Gelextraktions Kit in pZerO-2 kloniert. Einzelne Kolonien wurden mittels Colony-PCR auf Insertionsgrößen untersucht. Von 7 positiven 1,0 kb Banden wurde die Sequenz durch Cyclesequencing mit Amersham Dye Terminator bestimmt. Alle hatten die identische Basenabfolge mit einer maximalen Länge von 1050 bp. Die 0,6 Bande wurde später ebenfalls sequenziert, hatte aber keinerlei Ähnlichkeit mit *sal* ähnlichen Genen. Die Kombination I/4 + II/5 lieferte kein brauchbares Produkt.

Southern Blot Analyse

Genomische DNA wurde mit dem Puregene DNA Isolation Kit (Gentra Systems) isoliert. Je 2 µg davon wurden mit *Pvu* II oder *Alu* I verdaut, mit einem Agarosegel der Größe nach aufgetrennt und auf Protran nitrocellulose Membran (Schleicher & Schuell) übertragen. *Pvu* II schneidet einmal (Sonde *EGFP* Sequenz) und *Alu* I schneidet zweimal im Transposon (Sonde Sequenz der Transposonarme). Die Hybridisierung mit radioaktiven Sonden erfolgte nach Standardbedingungen.

Genetische und Embryologische Methoden

Bei den Arbeiten mit *Drosophila* wurde im wesentlichen nach den in Ashburner (1989) beschriebenen Standardmethoden verfahren. Für Kontrolltransformationen mit verschiedenen genetischen Konstrukten wurde der Stamm yellow/white (yw) genommen.

Die Angaben zur Kultivierung von *Tribolium* sind der Monographie von Sokoloff (1974) entnommen. Stammhaltung und Identifizierung von Mutanten, sowie selbstentwickelte Gerätschaften sind in (Berghammer et al., 1999a) beschrieben.

Die meisten der hier beschriebenen Protokolle sind auch online auf der Internetseite des Klingler Labors abzurufen: <http://www.tribolium.net>

Keimbahntransformation

Beschrieben werden ausführlich zwei Variationen von Embryoinjektionen zur Generierung von transgenen Käfern

1) Vorbereitung:

Apfelagarplatten und Injektionsapparatur wie bei *Drosophila* Transformationen

In Wasser gelöste DNAs (Qiagen Midi Prep®, Wasser Millipore® Qualität) für Konstrukt und Helper werden im entsprechenden Verhältnis frisch zusammenpipettiert und durch Ultrafree-MC Filter (0,45 µm, Kat.Nr. UFC30HV00) in der Tischzentrifuge zentrifugiert, um Partikel zu entfernen. Zur Sichtkontrolle während der Injektion wird 20-25% Phenolrotlösung (Sigma P-0290) zugegeben. Fein ausgezogene Glaskapillaren werden vorne abgeschnitten, mit der DNA Lösung gefüllt und in die Apparatur eingespannt.

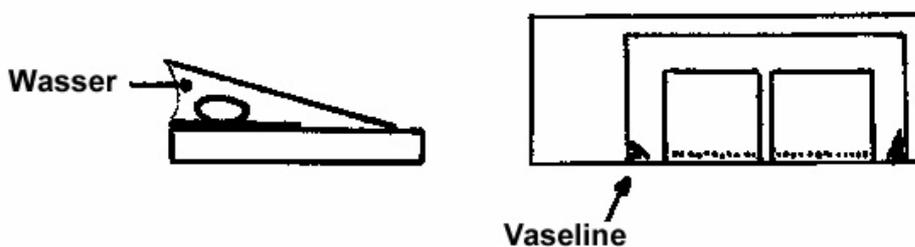
Für Methode I zusätzlich: Deckgläser, die an einer Seite mit Heptankleber (ca. 5 µl) bestrichen sind.

2) Aufreihen (Raum und Arbeitsmaterialien auf 24°C)

Eier aus dem weißen Mehl absieben (3h Ablage bei 24°C). Jeweils ein Aliquot davon in einem Netzchen vorsichtig dechorionieren (ca. 5 Tropfen pro Blockschälchen mit Wasser) bis das Mehl sich abgelöst hat (bis zu 1 Min.). Danach gründlich mit Wasser spülen. Die Eier mit einem Pinsel auf einen Streifen Apfelagar überführen und sofort einzeln verteilen, da sie sonst zusammenkleben.

Injektionsmethode I unter Wasser (nach einem Protokoll von (Chang and Wade, 1996))

Z.B. mit einer Präpariernadel die Eier am Rande des Apfelagars so aufreihen, daß das spitzere Ende nach innen zeigt. Das Deckglas mit dem Klebestreifen wird mit der Pinzette knapp hinter die Embryonen gestellt und vorsichtig in Richtung der Eier gekippt, bis diese ankleben. Anschließend das Deckglas mit etwas Vaseline auf einem Objektträger befestigen, so daß dessen Rand mit den Eiern mit dem Rand des Objektträgers abschließt. Auf diese Weise 2-3 Objektträger vorbereiten. Ein zweites, größeres Deckglas wird dazu benutzt eine Kammer über den Embryonen zu bauen. Dazu wird unter den beiden vorderen Ecken Vaseline als Abstandshalter verwendet und leicht angedrückt (siehe Zeichnung). Die Eier dürfen nicht gequetscht werden. Vor dem Injizieren wird die Kammer mit einer Eppendorfpipette zügig mit Wasser gefüllt, damit die Wasserspannung nicht das obere Deckglas herunterzieht. Der Objektträger wird vorsichtig eingespannt und die Eier injiziert. Dabei läuft immer etwas DNA Lösung aus der Kapillare. Direkt danach wird das obere Deckglas abgelöst, indem der Objektträger in eine mit Wasser gefüllte Petrischale gelegt wird, wodurch das Deckglas abgehoben wird. Der Objektträger mit den Eier wird so gut als möglich getrocknet und dann wird zum nächsten übergegangen.



Injektionsmethode II in Luft (nach Sue Brown)

Eine wesentlich einfachere Möglichkeit ist es direkt in Luft zu injizieren, allerdings erfordert dies mehr Erfahrung beim Einstechen und Einbringen der DNA, da die Sichtkontrolle stark eingeschränkt ist und die Eier sich leichter lösen. Ein weiterer Vorteil ist, daß weniger geschlüpfte Larven am Heptankleber verloren gehen. Hierzu werden die Eier direkt auf einem Deckglas aufgereiht und auf einem Objektträger befestigt. Wenn der Wasserfilm darum abtrocknet, kleben die Embryonen durch die Mehl- und Chorionreste von selbst fest und können injiziert werden.

Jeweils immer 2-3 Objektträger so verarbeiten, dann mit dem nächsten Aliquot fortfahren. Bei beiden Methoden kann mit der Eiablage bis zu 3h gearbeitet werden. Dann sollte neu abgeseibt werden, um immer junge Blastodermstadien zu haben.

3) Inkubation

Am Ende des Injektionstages werden alle Deckgläser von den Objektträgern gelöst und mit den Embryonen nach oben in Petrischalen mit Apfelagar gelegt. Da die Eier durch das Dechorionieren ihres Austrocknungsschutzes beraubt sind, müssen sie sich in ausreichend feuchter Umgebung weiterentwickeln. Diese Petrischalen werden mit Deckel in einer weiteren verschließbaren Plastikbox bei 24 bis 33°C aufbewahrt. Da an den Embryonen bei zu viel Feuchtigkeit das Wasser kondensiert und dann die Larven schlecht schlüpfen, eignet sich eine feuchte Kammer weniger. Jeden Tag sollte die Feuchtigkeit kontrolliert werden und gegebenenfalls etwas ablüften können. Wenn die Eier sich verformen, ist die Luftfeuchte zu gering. Ca. 1d vor dem voraussichtlichen Schlupfzeitpunkt werden die Plastikboxen geöffnet, um die Luftfeuchtigkeit zu verringern; später, kurz vor dem Schlüpfen, dann auch den Deckel der Petrischalen abnehmen, damit der Agar austrocknet. Die Schlüpftrate ist stark reduziert, wenn es zu feucht ist. Die Larven sollten möglichst bald (mindestens 2x am Tag) abgesammelt werden, um zu verhindern, daß sie sich zu sehr im Heptankleber verfangen oder an feuchten Stellen naß werden. Dazu werden sie z.B. mit einer Präpariernadel auf ein kleines Stück Whatman-Papier transferiert, welches dann in eine mit Vollkornmehl gefüllte Box gelegt wird. Vorsicht mit Plastikgefäßen, da durch die elektrostatische Aufladung die Larven weggeschleudert werden können. Bei der Luftmethode können die trockenen Deckgläser zum Schlupfzeitpunkt auch verkehrt herum in das Vollkornmehl gebracht werden, wenn die Anzahl der geschlüpften Embryonen nicht so kritisch ist.

Weitere Anmerkungen:

- Zu lange oder zu starke Dechorionierung senkt die Überlebensrate
- Die Eier sollten nicht zu lange unter Wasser bleiben
- Die Schlüpfraten sollten zwischen 30 und 50% liegen (uninjiziert bis zu 70%)
- Wenn die Larven zu sehr am Heptankleber hängen bleiben, kann dieser verdünnt werden

Apfelagar

40 g Agar (Roth 5210.2) und 1 l Leitungswasser in einen 2 l Kolben füllen und zum Lösen autoklavieren. Solange dies noch heiß ist, 33 g Sucrose in 1/3 l Apfelsaft lösen und in einem Wasserbad auf 60°C erwärmen. Dann 2 g Nipagin (Fungizid) in 8 ml Ethanol lösen, in den Apfelsaft geben und diesen langsam und ohne Blasenbildung in den Agar gießen. Alles mit einem Rührer durchmischen und die Petrischalen befüllen. Wenn die Platten fest sind, können sie in einem Plastikbeutel bei 4°C für mehrere Wochen aufgehoben werden.

Heptankleber

Ungefähr 30 cm eines braunen Paketklebebandes (Tesa 4124, Beiersdorf AG) werden in einem 50 ml Falcongefäß mit 15 ml Heptan für mehrere Stunden geschüttelt bis sich der Kleber von dem Plastikband gelöst hat.

RNAi

Die Experimente mit doppelsträngiger RNA zur spezifischen Unterdrückung von Genexpression beruhen auf der Arbeit von (Fire et al., 1998)

Dieses Protokoll beschreibt eine sehr einfache und effiziente Methode zur Herstellung von dsRNA, ohne daß die Mengen getrennt produzierter Stränge gemessen, gemischt und annealt werden müssen. Dazu wird in einer PCR die Ausgangs DNA vervielfältigt, und falls nötig ein T7 Promotor angefügt. Bei Gensequenzen, die in ein Standardplasmid kloniert wurden, können entsprechend Standardprimer verwendet werden. Der Ansatz ist wie folgt:

13,8 µl	DNA und H ₂ O (5 bis 50 ng DNA)
2 µl	10x Puffer
2 µl	dNTP Mix
1 µl	Primer T7 (z.B.)
1 µl	Primer T7-SP6 (z.B.)
0,2 µl	Taq Polymerase
<u>20 µl</u>	

PCR Reaktionsbedingungen:

1'	94°C	
30"	94°C	┌
1'	40°C	└ 30 Zyklen
1'	72°C	└
2'	72°C	
	4°C	

Zum Niederschlag werden zunächst 2 µl 3 M NaAc und 1 µl Glykogen zugegeben, gut gemischt und mit 50 µl Ethanol 2 h bei -20°C gefällt. Nach Zentrifugation für 1 h bei 15000 U/Min. in der Tischzentrifuge, wird mit 500 µl 70 % Ethanol gewaschen und das Pellet dann in der Vakuumzentrifuge getrocknet. Es wird in 10 µl H₂O durch pipettieren resuspendiert und zusätzlich für 15 Min. auf dem Rüttler geschüttelt. Zur Bestimmung der Konzentration wird 1 µl davon 1:10 verdünnt und 1 und 5 µl dieser Verdünnung auf ein Gel aufgetragen. Die 5 µl Bande sollte etwa 25 ng DNA enthalten.

Für die in vitro Transkription wurde der T7 Megascript Kit von Ambion benutzt. Da an beiden Enden nach der PCR ein T7 Promotor ist, werden mit demselben Enzym beide Stränge gleichzeitig hergestellt und annealt. Der Ansatz wird bei RT zusammenpipettiert, um das Ausfallen von einzelnen Komponenten zu verhindern:

8 µl	des PCR Produktvolumens
2 µl	10x Puffer
8 µl	von jedem rNTP 2 µl
2 µl	Enzym Mix
<u>20 µl</u>	für 3h bei 37°C

Anschließend wird mit LiCl gefällt (30 µl H₂O, 25 µl LiCl Lsg, 1h bei -20°C). Die Flüssigkeit gefriert dabei, wird dann herausgenommen und 30 Min. mit 15000 U/Min. zentrifugiert. Nach Abnehmen des Überstandes und Lufttrocknen wird mit 50 µl Annealing Puffer resuspendiert. Zur Konzentrationsbestimmung wird 1 µl entnommen, auf 100 µl mit H₂O verdünnt und die OD gemessen. Für die Injektionen kann 10 % Phenolrot beigemischt werden. Wegen eventueller nichtgelöster Partikel wird auch noch durch einen 45 µm Ultrafree-MC Filter (Millipore) zentrifugiert.

Primersequenzen:

T7: 5' gaa ttg taa tac gac tca cta tag g 3'
 T7-T3: 5' taa tac gac tca cta tag gaa tta acc ctc act aaa ggg 3'
 T7-SP6: 5' taa tac gac tca cta tag gat tta ggt gac act ata ga 3'

Annealing Puffer: 20 mM Kaliumphosphat, 3 mM Natriumcitrat, mit KOH auf pH 7,5

Parentale RNAi (pRNAi)

Die Injektion von dsRNA in die Hämolymphe von Puppen wurde im Labor Klingler von Gregor Bucher entwickelt und ist in (Bucher et al., 2002) beschrieben.

Die DNA-Vorlagen für die doppelsträngige *Tc'spalt* RNA wurde per PCR erzeugt (siehe oben). Die Primer dazu waren entweder spezifische *sal* Primer flankiert von T7 Promotorsequenzen oder SP6–T7 und T7 Primer, die die Vektorsequenzen nutzen. Diese *sal* dsRNAi wurde in weibliche Puppen vom Stamm SB injiziert (etwa 4-5 µl pro 20 Puppen).

T7-sal5': 5' taa tac gac tca cta tag gaa aag tct tcg gct ctg a 3'

T7-sal3': 5' taa tac gac tca cta tag ggt ttc cga cgt ttt tgt c 3'

Annealing Temperatur: 57°C

Test der Hitzetoleranz von *Tribolium castaneum*

Um einen Annäherungswert für die hitzeinduzierte Induktion von Proteinen zu ermitteln wurden Pools von relativ jungen *pearl* Käfern (ca. 1 Monat adult) verschiedenen Temperaturen unterschiedlich lange ausgesetzt und deren Auswirkungen auf Mortalität und Legefähigkeit gemessen. Mehrere hundert Käfer wurden jeweils in ein Glas mit Schraubdeckel gegeben, welches ca. 1 cm hoch mit weißem Mehl gefüllt war (Gefäßhöhe ca. 12,5 cm, Durchmesser ca. 9 cm; Deckel mit Belüftungsloch von ca. 2 cm Durchmesser). Für die Hitzeschocks wurden diese für 30 oder 60 Minuten mehrere Zentimeter tief in ein Wasserbad gestellt. Das Belüftungsloch wurde als Schutz gegen die Feuchtigkeit vorübergehend abgeklebt. Diese Behandlung wurde drei Tage lang ca. alle 12 Stunden durchgeführt. Die übrige Zeit wurden die Kulturen bei 24°C gehalten. Anschließend an den Versuch wurden die Käfer abgeseibt und ausgezählt und das Mehl, mit zusätzlichem Vollkornmehl, zur Aufzucht der Nachkommenschaft aufbewahrt. Die Käfer bei 55°C waren sofort nach dem ersten Hitzeschock tot, bei 50°C waren die Tiere deutlich angeschlagen, erholten sich zwischen den Hitzeschocks teilweise wieder, aber überstanden die wiederholten Behandlungen nicht. Bei 46°C hingegen konnte kein negativer Einfluß auf die Überlebensfähigkeit und die Fortpflanzung im Vergleich zum Parentaltyp festgestellt werden. Da der Wert nur noch vier Grad unter dem 100% lethalen Wert lag, wurde er für die Hitzeschockinduktion verwendet.

	Gesamtzahl	Tote Käfer	in %	Nachkommen
42°C / 30'	594	0	0	++
60'	636	3	0,5	++
46°C / 30'	410	7	1,7	++
60'	362	8	2,2	++
50°C / 30'	284	alle	100	o
60'	199	alle	100	o
55°C / 30'	526	alle	100	o
60'	558	alle	100	o
Kontrolle 24°C	1009	2	0,2	++
	150	5	3,3	++

Eiablagen und Fixierung von Embryonen

Zum Absammeln der Eier werden die Käfer auf feines weißes oder doppelgriffiges Mehl gesetzt. Doppelgriffiges Mehl läßt sich zwar leichter absieben, hinterläßt aber beim Ablösen mit der Klorixlösung mehr Rückstände, die z.B. Kutikulapräparate unsauber machen. Nach der entsprechenden Ablagedauer werden die Eier mit einem 300 µm feinen Sieb vom Mehl getrennt. In Netzchen werden diese für 2-4 Min. in einer 1:1 verdünnten Klorixlösung unter mehrfachem Durchspülen dechorioniert und danach ausgiebig mit Wasser gespült.

Mit Pinsel oder Spatel werden die Embryonen in das Szintillationsröhrchen mit der Fixierungslösung gebracht und für 30 Min. geschüttelt, so daß sie ausreichend Kontakt zum

Heptan und zum Fixativ haben. Anschließend wird die wässrige Phase unten mit einer Pasteurpipette abgesaugt, ca. 8 ml Methanol dazugegeben und zum Devitellinisieren sofort kräftig geschüttelt oder gevortext. Die abgesunkenen Eier sind frei von der Vitellinmembran und werden in einem Eppendorfgesäß gesammelt. Bei älteren Keimstreifen, die sehr schlecht devitellinisieren, wird dies durch mehrfaches aufziehen und ausdrücken einer Plastikspritze mit Kanüle erreicht. Die gewonnenen Embryonen werden einige Male mit frischem Methanol gewaschen, um Heptanreste zu entfernen und dann in -20°C zur Aufbewahrung eingefroren.

PEMS:

0,1 M Pipes, 2 mM MgSO_4 , 1 mM EDTA, pH 6,9
(400 ml: 12,08 g Pipes, 800 μl 1 M MgSO_4 , 800 μl 0,5 M EDTA, auf pH 6,9 mit NaOH)

***in situ* Hybridisierung mit antisense RNA**

Ein für *Tribolium* angepaßtes Protokoll für Doppelfärbungen, das auf Angaben von Christian Wolff basiert, wurde in (Prpic et al., 2001) veröffentlicht. Bei Einzelfärbungen wird einfach um die zweite markierte Probe und die entsprechende Färbung gekürzt. Je nach den Erfordernissen, kann das die Reaktion mit der Signalverstärkung sein (Biotinylierung) oder die direkte Enzymreaktion. Die Embryonen sollten sobald als möglich fotografiert werden, da die β -Galaktosidase Färbung oft nachdunkelt und im Lauf der Zeit diffundiert.

Digoxigenin/Fluoreszin markierte RNA für *in situ* Hybridisierung

Das Plasmid wird mit einem Restriktionsenzym hinter der Zielsequenz geschnitten (bevorzugt mit glatten Enden oder 5' Überhang) und mit einer Phenol/Chloroform Proteinextraktion und Ethanolpräzipitation gereinigt. Für eine *in vitro* Reaktion wird folgender Ansatz pipettiert und 2 h bei 37°C inkubiert:

1 μl	DNA (500 ng)
5 μl	H_2O
1 μl	10x Puffer
1 μl	rNTP Mix (DIG oder Fluoreszin Markierung; Roche)
1 μl	RNase Inhibitor (20 Einheiten; Roche)
1 μl	RNA Polymerase (T3, T7, Sp6 ; Roche)
<hr/>	
10 μl	

Zur Volumenerhöhung werden 90 μl H_2O zugegeben. Als Kontrolle werden 5 μl davon auf ein Minigel (0,8 % Agarose, 60 V, 15 Min. Laufzeit) aufgetragen und mit 25 ng Plasmid DNA in der Nebenspur verglichen. Die RNA Bande sollte etwa 10x so stark erscheinen. Zum übrigen Ansatz wird 1 μl tRNA (20 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) und 16 μl 3,2 M Lithiumchlorid gegeben, gemischt und mit 400 μl Ethanol präzipitiert (2 h bei -20°C). Das gut sichtbare Pellet wird 20 Min. bei 15000 U/Min. in der Tischzentrifuge zentrifugiert und mit 500 μl 70 % Ethanol gewaschen; eventuell nochmals zentrifugiert. Nach Trocknung in der Vakuumzentrifuge (für ca. 5 Min.) wird das Pellet in 100 μl DEPC behandeltem H_2O resuspendiert, aliquotiert und bei -80°C aufbewahrt. In Testfärbungen muß die optimale Konzentration ermittelt werden (etwa zwischen 1 und 4 μl).

Antikörperfärbung (Klingler Labor nach einem Protokoll von Sue Brown)

Frische Embryonen werden in einem Netzchen mit einer Klorixlösung (1:4 Verdünnung einer 5 % Natriumhypochlorid-Lösung (NaOCl , normaler Haushaltsreiniger) für 2 Min. gründlich dechorioniert. Danach wird ausführlich mit deionisiertem Wasser gespült. Die sauberen Eier werden mit einem Spatel oder Pinsel in das Szintillationsröhrchen mit dem Fixativ überführt und 30 Min. geschüttelt. Anschließend wird die untere, wässrige Phase mit einer Pasteurpipette entfernt und die Embryonen durch Zugabe von 8 ml Methanol und sofortigem starken Schütteln/Vortexen devitellinisiert. Nach Abnahme der oberen Heptanphase und

Zugabe von weiterem Methanol sinken alle Eier ab und werden in ein Eppendorfgefäß pipettiert. (Im Gegensatz zu RNA *in situ* Färbungen können bei Antikörpern auch Embryonen verwendet werden, die nicht komplett devitellinisiert sind, sondern nur aufgeplatzt sind. Um ein Ankleben an den Gefäßwänden zu verhindern, wird allerdings die Konzentration des Detergents von 0,02 % auf 0,1 % erhöht). Durch zweimaliges Waschen mit Methanol werden Heptanreste entfernt, um dann nach PBT' umzupuffern und mit der Färbung zu beginnen (R W10 W20 W20 W20).

Alternativ können auch in Methanol eingefrorene Eier verwendet werden, die mit PBT' rehydriert werden (R W10 W20 W20). Methanolbehandlung zerstört jedoch viele Antigene, so daß frische Embryonen bevorzugt werden sollten.

Die zu färbenden Eier werden mit dem primären Antikörper inkubiert, während ein weiteres Aliquot zur Präabsorption des sekundären Antikörpers genauso behandelt wird (4 h bei RT oder über Nacht bei 4°C auf dem Drehrad). Die Embryonen werden mit PBT' gewaschen (R W10 W20 W20) und dann der Überstand des 2. Aliquots mit dem sekundären Antikörper zugegeben (2 h bei RT auf dem Drehrad). Anschließend wird ausgiebig mit PBT' gewaschen (R R W10 W20 W20 W30), in den Färbepuffer überführt (2x W) und schließlich in der Färbelösung inkubiert. Der Fortgang der Färbung wird in Blockschälchen unter dem Stereomikroskop kontrolliert. Die Färbereaktion wird durch mehrmaliges Waschen mit PBT' im Eppendorfgefäß gestoppt (W W10 W20 W30).

Die Embryonen können dauerhaft z.B. in Euparal (Roth 7356.1) oder nach Präparieren des Keimstreifs vom Dotter in 50 % Glyzerin eingebettet werden.

(jeweils mit 1 ml Flüssigkeit; R = spülen, ohne invertieren des Eppendorfgefäßes, W = waschen, mit invertieren, W10 = 10 Min. Waschen auf dem Drehrad)

PBS 10x:

320 g NaCl, 8 g KCl, 8 g KH₂PO₄, 46 g Na₂HPO₄, mit H₂O auf 4 l, pH= 7,4

PBT:

PBS mit 0,02 % Tween 20 (720 ml dH₂O, 80 ml 10x PBS, 0,8 ml 20 % Tween 20)

PBT':

PBS plus 0,1 % Tween 20 (716 ml dH₂O, 80 ml 10x PBS, 4 ml 20 % Tween 20)

Färbepuffer (frisch vorbereitet):

2 ml 1 M Tris pH 9,5, 1 ml 1 M MgCl₂, 400 µl 5 M NaCl, 100 µl 20% Tween 20, H₂O ad 20 ml

Färbelösung:

1 ml Färbepuffer mit 4,5 µl NBT und 3,5 µl X-phosphat

(NBT Lösung: 4-nitro blue tetrazolium chloride, 75 mg/ml in 70 % Dimethylformamid (in Wasser); Aufbewahrung bei -20° C.

X-phosphat Lösung: 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphat, Toluidinium Salz, 50mg/ml in 100% Dimethylformamid (DMF); Aufbewahrung bei -20° C.)

Kutikulapräparation (*Drosophila* / *Tribolium*)

Dechorionierte und gewaschene Eier werden im Netzchen auf einem Papierhandtuch etwas trockengetupft. Einen Objektträger mit Bleistift beschriften (Tinte würde beim Klären bleichen) und 2 separate Tropfen Hoyers-Milchsäure (H/M) aufbringen. Je bis zu 100 Embryonen mit Spatel oder Pinsel aus dem Netzchen in die Tropfen H/M geben. Gut vermischen und zwei separate Deckgläschen auflegen. Eines der Deckgläschen vorsichtig quetschen, das heißt unter Binokular mit Präpariernadel o. ä. auf das Deckgläschen drücken bis die Embryonen aus der Eihülle (Vitellinmembran) herausplatzen. Nicht zu stark drücken, sonst zerreißt die Kutikula. Die Eier unter dem 2. Deckgläschen intakt lassen. Danach noch weiteres H/M seitlich an die Deckgläschen heranbringen, bis sie regelrecht aufschwimmen, da bei einer zu geringen Menge H-M die Embryonen nicht klären und beim Austrocknen Luft unter das Deckgläschen gelangt. Zum Klären werden die Präparate über Nacht bei 60° inkubiert. Die Auswertung erfolgt bei kleiner Vergrößerung im Dunkelfeld, oder bei mittlerer Vergrößerung mit Phasenkontrast. Auch bei mittlerer Vergrößerung kann ein Dunkelfeld-Effekt erzeugt werden, indem man den Phasen-Schieber halb herauszieht.

Hoyers Medium:

30 g Gummi Arabicum (Sigma G-9752) mit 50 ml Wasser, 200 g Chloralhydrat ($\text{Cl}_3\text{C}_2(\text{OH})_2$) und 20 g Glycerin mischen. Zum Gebrauch als Einbettungsmedium 1:1 mit Milchsäure verdünnen (Hoyers-Milchsäure). Gut verschlossen bei RT aufbewahren.

DAPI bzw. H 33342 (bisBenzimid)- Kernfärbung

Fixierte Embryonen können mit oder ohne Vitellinmembran gefärbt werden.

Ohne Devitellinisieren werden die Embryonen aus der Interphase abgenommen (zuerst Wasserphase unten absaugen) und in ein Eppendorfgefäß gegeben und 4-5x mit PBS/0,3 % Triton-X-100 oder H_2O /0,3 % Triton-X-100 gewaschen, um etwas leichter abzusinken. Gegebenenfalls kann 1 Min. mit bis zu 1000 Umdrehungen in der Tischzentrifuge abzentrifugiert werden.

Mit oder ohne Vitellinmembran werden die Eier für 1 h auf dem Drehrad abgedeckt mit der Hoechst Lösung inkubiert (Stammlösung 1:1000 in PBS/0,3 % Triton-X-100). Anschließend wird 2-3x in PBS/0,3 % Triton-X-100 gewaschen und auf einem Objektträger eingebettet (Deckglas mit Plastilinfüßchen, im Dunklen aufbewahren).

Hoechst No. 33342 bisBenzimid (zB. von Sigma # B2261)

Zunächst 250 mg Pulver in 1,25 ml H_2O lösen (Konzentration 0,2 mg/ μl)

Stammlösung: 5 μl davon mit 995 μl H_2O verdünnen (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)

Endkonzentration in der Färbung dann 1pg/ μl

Fuchsinfärbung

Eine für *Tribolium* adaptierte Fuchsin-Zellkernfärbung für morphologische Zwecke ist veröffentlicht in (Wigand et al., 1998)

Geräte

Nadelziehgerät

Sutter Instrument Co. USA, Model P-97, geliefert von Fa. Bachofer, Reutlingen
Einstellungen: Heat 362, Pull 97, Vel. 70, Time 150, unlocked, P=500

Kapillaren

Kwik-Fil, Borsilikat Glaskapillaren, 1B100F-4, Fa. World Precision Instruments, Inc.

Injektionsapparat

Leitz (Wetzlar) Mikromanipulatortisch mit manuellem Luftdruckbetrieb

Fluoreszenzbinokular

Leica MZ12, Planapo 1,6x mit einer 100W Hg Lampe (Type 307-072.057) und einem GFP+ Fluoreszenz Filter oder dem GFP Illuminator der Kramer Scientific Corp.

Mikroskop

Zeiss Axioplan

Kamera

Analog: Wild MPS 51S Kamera mit MPS 45 Photoautomat
Digital: ProgRes C14, Jenoptik

Literatur

- Akam, A., Dawson, I. and Tear, G.** (1988). Homeotic genes and the control of segment diversity. *Development* **104 Suppl.**, 123-133.
- Andrew, D. J., Horner, M. A., Petitt, M. G., Smolik, S. M. and Scott, M. P.** (1994). Setting limits on homeotic gene function: restraint of Sex combs reduced activity by teashirt and other homeotic genes. *Embo J* **13**, 1132-44.
- Barrio, R., de Celis, J. F., Bolshakov, S. and Kafatos, F. C.** (1999). Identification of regulatory regions driving the expression of the Drosophila spalt complex at different developmental stages. *Dev Biol* **215**, 33-47.
- Barrio, R., Shea, M. J., Carulli, J., Lipkow, K., Gaul, U., Frommer, G., Schuh, R., Jäckle, H. and Kafatos, F. C.** (1996). The spalt-related gene of Drosophila melanogaster is a member of an ancient gene family, defined by the adjacent, region-specific homeotic gene spalt. *Dev Genes Evol* **206**, 315-325.
- Beeman, R. W., Stuart, J. J., Brown, S. J. and Denell, R. E.** (1993). Structure and function of the homeotic gene complex (HOM-C) in the beetle, Tribolium castaneum. *Bioessays* **15**, 439-44.
- Beermann, A., Jay, D. G., Beeman, R. W., Hulskamp, M., Tautz, D. and Jurgens, G.** (2001). The Short antennae gene of Tribolium is required for limb development and encodes the orthologue of the Drosophila Distal-less protein. *Development* **128**, 287-97.
- Bennett, R. L., Brown, S. J. and Denell, R. E.** (1999). Molecular and genetic analysis of the Tribolium Ultrathorax ortholog, Ultrathorax. *Dev Genes Evol* **209**, 608-19.
- Berghammer, A., Bucher, G., Maderspacher, F. and Klingler, M.** (1999a). A system to efficiently maintain embryonic lethal mutations in the flour beetle Tribolium castaneum. *Dev Genes Evol* **209**, 382-9.
- Berghammer, A. J., Klingler, M. and Wimmer, E. A.** (1999b). A universal marker for transgenic insects. *Nature* **402**, 370-1.
- Bokor, P. and DiNardo, S.** (1996). The roles of hedgehog, wingless and lines in patterning the dorsal epidermis in Drosophila. *Development* **122**, 1083-92.
- Bonneton, F., Shaw, P. J., Fazakerley, C., Shi, M. and Dover, G. A.** (1997). Comparison of bicoid-dependent regulation of hunchback between Musca domestica and Drosophila melanogaster. *Mech Dev* **66**, 143-56.
- Boulet, A. M., Lloyd, A. and Sakonju, S.** (1991). Molecular definition of the morphogenetic and regulatory functions and the cis-regulatory elements of the Drosophila Abd-B homeotic gene. *Development* **111**, 393-405.
- Brennan, M. D., Rowan, R. G. and Dickinson, W. J.** (1984). Introduction of a functional P element into the germ-line of Drosophila hawaiiensis. *Cell* **38**, 147-51.
- Brown, S., DeCamillis, M., Gonzalez-Charneco, K., Denell, M., Beeman, R., Nie, W. and Denell, R.** (2000). Implications of the Tribolium Deformed mutant phenotype for the evolution of Hox gene function. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 4510-4.
- Brown, S. J., Fellers, J. P., Shippy, T. D., Richardson, E. A., Maxwell, M., Stuart, J. J. and Denell, R. E.** (2002a). Sequence of the Tribolium castaneum Homeotic Complex. The region corresponding to the drosophila melanogaster antennapedia complex. *Genetics* **160**, 1067-74.
- Brown, S. J., Hilgenfeld, R. B. and Denell, R. E.** (1994a). The beetle Tribolium castaneum has a fushi tarazu homolog expressed in stripes during segmentation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 12922-6.
- Brown, S. J., Parrish, J. K., Denell, R. E. and Beeman, R. W.** (1994b). Genetic control of early embryogenesis in the red flour beetle, Tribolium castaneum. *Am Zool* **34**, 343-52.
- Brown, S. J., Patel, N. H. and Denell, R. E.** (1994c). Embryonic expression of the single Tribolium engrailed homolog. *Dev Genet* **15**, 7-18.
- Brown, S. J., Shippy, T. D., Beeman, R. W. and Denell, R. E.** (2002b). Tribolium Hox genes repress antennal development in the gnathos and trunk. *Mol Phylogenet Evol* **24**, 384-7.
- Bucher, G.** (2002). The Evolution of Gap Gene Orthologues. In *Fakultät für Biologie*, (ed. München: Ludwig-Maximilians-Universität).

- Bucher, G., Scholten, J. and Klingler, M.** (2002). Parental RNAi in *Tribolium* (Coleoptera). *Current Biology* **12**, R85-R86.
- Buckland, P. C.** (1981). The early dispersal of insect pests of stored products as indicated by archaeological records. *J. stored Prod. Res.* **17**, 1-12.
- Calvi, B. R., Hong, T. J., Findley, S. D. and Gelbart, W. M.** (1991). Evidence for a common evolutionary origin of inverted repeat transposons in *Drosophila* and plants: hobo, Activator, and Tam3. *Cell* **66**, 465-71.
- Cary, L. C., Goebel, M., Corsaro, B. G., Wang, H. G., Rosen, E. and Fraser, M. J.** (1989). Transposon mutagenesis of baculoviruses: analysis of *Trichoplusia ni* transposon IFP2 insertions within the FP-locus of nuclear polyhedrosis viruses. *Virology* **172**, 156-69.
- Casanova, J.** (1989). Mutations in the spalt gene of *Drosophila* cause ectopic expression of Ultrabithorax and Sex combs reduced. *Roux Arch. dev. Biol.* **198**, 137-140.
- Castelli-Gair, J.** (1998). The lines gene of *Drosophila* is required for specific functions of the Abdominal-B HOX protein. *Development* **125**, 1269-74.
- Catteruccia, F., Nolan, T., Loukeris, T. G., Blass, C., Savakis, C., Kafatos, F. C. and Crisanti, A.** (2000). Stable germline transformation of the malaria mosquito *Anopheles stephensi*. *Nature* **405**, 959-62.
- Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W. W. and Prasher, D. C.** (1994). Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* **263**, 802-5.
- Chang, N. W. and Wade, M. J.** (1996). An improved microinjection protocol for the transfer of *Wolbachia pipientis* between infected and uninfected strains of the flour beetle *Tribolium confusum*. *Can J Microbiol* **42**, 711-4.
- Chapman, R. N.** (1928). The quantitative analysis of environmental factors. *Ecology* **9**, 111-122.
- Chiang, C. and Beachy, P. A.** (1994). Expression of a novel Toll-like gene spans the parasegment boundary and contributes to hedgehog function in the adult eye of *Drosophila*. *Mech Dev* **47**, 225-39.
- Chiang, C., Young, K. E. and Beachy, P. A.** (1995). Control of *Drosophila* tracheal branching by the novel homeodomain gene unplugged, a regulatory target for genes of the bithorax complex. *Development* **121**, 3901-12.
- Curtis, C. D., Brisson, J. A., DeCamillis, M. A., Shippy, T. D., Brown, S. J. and Denell, R. E.** (2001). Molecular characterization of Cephalothorax, the *Tribolium* ortholog of Sex combs reduced. *Genesis* **30**, 12-20.
- Davis, G. K., Jaramillo, C. A. and Patel, N. H.** (2001). Pax group III genes and the evolution of insect pair-rule patterning. *Development* **128**, 3445-58.
- Davis, G. K. and Patel, N. H.** (2002). Short, long, and beyond: molecular and embryological approaches to insect segmentation. *Annu Rev Entomol* **47**, 669-99.
- de Celis, J. F., Barrio, R. and Kafatos, F. C.** (1996). A gene complex acting downstream of dpp in *Drosophila* wing morphogenesis. *Nature* **381**, 421-4.
- DeCamillis, M. A., Lewis, D. L., Brown, S. J., Beeman, R. W. and Denell, R. E.** (2001). Interactions of the *Tribolium* Sex combs reduced and proboscipedia orthologs in embryonic labial development. *Genetics* **159**, 1643-8.
- Denell, R. E., Brown, S. J. and Beeman, R. W.** (1996). Evolution of the organization and function of insect homeotic complexes. *Seminars in Cell and Developmental Biology* **7**, 527-538.
- Dong, P., Todi, S., Eberl, D. and Panganiban, G.** (2002). A *Drosophila* model for Towns-Brocks Syndrome: spalt/ spalt-related mutants exhibit hearing, appendage and genital defects. *A. Dros. Res. Conf.* **43**, 35.
- Driever, W., Thoma, G. and Nusslein-Volhard, C.** (1989). Determination of spatial domains of zygotic gene expression in the *Drosophila* embryo by the affinity of binding sites for the bicoid morphogen. *Nature* **340**, 363-7.
- Ekker, S. C., Young, K. E., von Kessler, D. P. and Beachy, P. A.** (1991). Optimal DNA sequence recognition by the Ultrabithorax homeodomain of *Drosophila*. *Embo J* **10**, 1179-86.
- El Kifl, A. H.** (1953). Morphology of the adult *Tribolium confusum* Duv. and its differentiation from *Tribolium* (*Stene*) *castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae). *Bull. Soc. Fouad I. Ent.* **37**.

- Elick, T. A., Bauser, C. A., Principe, N. M. and Fraser, M. J., Jr.** (1996). PCR analysis of insertion site specificity, transcription, and structural uniformity of the Lepidopteran transposable element IFP2 in the TN-368 cell genome. *Genetica* **97**, 127-39.
- Emmons, S. W., Yesner, L., Ruan, K. S. and Katzenberg, D.** (1983). Evidence for a transposon in *Caenorhabditis elegans*. *Cell* **32**, 55-65.
- Feldmar, S. and Kunze, R.** (1991). The ORFa protein, the putative transposase of maize transposable element Ac, has a basic DNA binding domain. *Embo J* **10**, 4003-10.
- Felsenstein, J.** (1989). PHYLIP- Phylogeny Interference Package (Version 3.2). *Cladistics* **5**, 164-166.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E. and Mello, C. C.** (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **391**, 806-11.
- Franch-Marro, X. and Casanova, J.** (2002). spalt-induced specification of distinct dorsal and ventral domains is required for *Drosophila* tracheal patterning. *Dev Biol* **250**, 374-82.
- Franz, G., Loukeris, T. G., Dialektaki, G., Thompson, C. R. and Savakis, C.** (1994). Mobile Minos elements from *Drosophila hydei* encode a two-exon transposase with similarity to the paired DNA-binding domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 4746-50.
- Franz, G. and Savakis, C.** (1991). Minos, a new transposable element from *Drosophila hydei*, is a member of the Tc1-like family of transposons. *Nucleic Acids Res* **19**, 6646.
- Fraser, M. J., Brusca, J. S., Smith, G. E. and Summers, M. D.** (1985). Transposon-mediated mutagenesis of a baculovirus. *Virology* **145**, 356-61.
- Fraser, M. J., Cary, L., Boonvisudhi, K. and Wang, H. G.** (1995). Assay for movement of Lepidopteran transposon IFP2 in insect cells using a baculovirus genome as a target DNA. *Virology* **211**, 397-407.
- Fraser, M. J., Ciszczon, T., Elick, T. and Bauser, C.** (1996). Precise excision of TTAA-specific lepidopteran transposons piggyBac (IFP2) and tagalong (TFP3) from the baculovirus genome in cell lines from two species of Lepidoptera. *Insect Mol Biol* **5**, 141-51.
- Frei, E., Schuh, R., Baumgartner, S., Burri, M., Noll, M., Jürgens, G., Seifert, E., Nauber, U. and Jäckle, H.** (1988). Molecular characterization of spalt. *Embo J* **7**, 197-204.
- Galant, R., Walsh, C. M. and Carroll, S. B.** (2002). Hox repression of a target gene: extradenticle-independent, additive action through multiple monomer binding sites. *Development* **129**, 3115-26.
- Garza, D., Medhora, M., Koga, A. and Hartl, D. L.** (1991). Introduction of the transposable element mariner into the germline of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **128**, 303-10.
- Good, N. E.** (1936). The flour beetles of the genus *Tribolium*. *USDA Technical Bulletin* **498**, 1-58.
- Gueiros-Filho, F. J. and Beverley, S. M.** (1997). Trans-kingdom transposition of the *Drosophila* element mariner within the protozoan *Leishmania*. *Science* **276**, 1716-9.
- Hama, C., Ali, Z. and Kornberg, T. B.** (1990). Region-specific recombination and expression are directed by portions of the *Drosophila* engrailed promoter. *Genes Dev* **4**, 1079-93.
- Handel, K., Grunfelder, C. G., Roth, S. and Sander, K.** (2000). *Tribolium* embryogenesis: a SEM study of cell shapes and movements from blastoderm to serosal closure. *Dev Genes Evol* **210**, 167-79.
- Handler, A.** (2002). Use of the piggyBac transposon for germ-line transformation of insects. *Insect Biochem Mol Biol* **32**, 1211.
- Handler, A. M.** (2001). A current perspective on insect gene transformation. *Insect Biochem Mol Biol* **31**, 111-28.
- Handler, A. M. and Harrell, R. A., 2nd.** (1999). Germline transformation of *Drosophila melanogaster* with the piggyBac transposon vector. *Insect Mol Biol* **8**, 449-57.
- Handler, A. M. and McCombs, S. D.** (2000). The piggyBac transposon mediates germ-line transformation in the Oriental fruit fly and closely related elements exist in its genome. *Insect Mol Biol* **9**, 605-12.
- Handler, A. M., McCombs, S. D., Fraser, M. J. and Saul, S. H.** (1998). The lepidopteran transposon vector, piggyBac, mediates germ-line transformation in the Mediterranean fruit fly. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 7520-5.
- Hauck, B., Gehring, W. J. and Walldorf, U.** (1999). Functional analysis of an eye specific enhancer of the *eyeless* gene in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 564-9.

- Herranz, H. and Morata, G.** (2001). The functions of pannier during *Drosophila* embryogenesis. *Development* **128**, 4837-46.
- Holleman, T., Schuh, R., Pieler, T. and Stick, R.** (1996). *Xenopus* Xsal-1, a vertebrate homolog of the region specific homeotic gene spalt of *Drosophila*. *Mech Dev* **55**, 19-32.
- Horn, C., Offen, N., Nystedt, S., Hacker, U. and Wimmer, E. A.** (2003). piggyBac-Based Insertional Mutagenesis and Enhancer Detection as a Tool for Functional Insect Genomics. *Genetics* **163**, 647-61.
- Horn, C., Schmid, B. G., Pogoda, F. S. and Wimmer, E. A.** (2002). Fluorescent transformation markers for insect transgenesis. *Insect Biochem Mol Biol* **32**, 1221-35.
- Horn, C. and Wimmer, E. A.** (2000). A versatile vector set for animal transgenesis. *Dev Genes Evol* **210**, 630-7.
- Hu, N. and Castelli-Gair, J.** (1999). Study of the posterior spiracles of *Drosophila* as a model to understand the genetic and cellular mechanisms controlling morphogenesis. *Dev Biol* **214**, 197-210.
- Hughes, C. L. and Kaufman, T. C.** (2002). Hox genes and the evolution of the arthropod body plan. *Evol Dev* **4**, 459-99.
- Jacobson, J. and Hartl, D.** (1985). Coupled instability of two X-linked genes in *Drosophila mauritiana*: germinal and somatic mutability. *Genetics* **111**, 57-65.
- Jasinskiene, N., Coates, C. J. and James, A. A.** (2000). Structure of hermes integrations in the germline of the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. *Insect Mol Biol* **9**, 11-8.
- Jürgens, G.** (1988). Head and tail development of the *Drosophila* embryo involves spalt, a novel homeotic gene. *Embo J* **7**, 189-196.
- Kapetanaki, M. G., Loukeris, T. G., Livadaras, I. and Savakis, C.** (2002). High frequencies of Minos transposon mobilization are obtained in insects by using in vitro synthesized mRNA as a source of transposase. *Nucleic Acids Res* **30**, 3333-40.
- Kelsh, R., Dawson, I. and Akam, M.** (1993). An analysis of abdominal-B expression in the locust *Schistocerca gregaria*. *Development* **117**, 293-305.
- Klausnitzer, B.** (1991). Die Larven der Käfer Mitteleuropas. Krefeld: Goecke & Evers Verlag.
- Klausnitzer, B.** (2002). Wunderwelt der Käfer. Heidelberg: Spektrum, Akademischer Verlag.
- Klinakis, A. G., Loukeris, T. G., Pavlopoulos, A. and Savakis, C.** (2000a). Mobility assays confirm the broad host-range activity of the Minos transposable element and validate new transformation tools. *Insect Mol Biol* **9**, 269-75.
- Klinakis, A. G., Zagoraiou, L., Vassilatis, D. K. and Savakis, C.** (2000b). Genome-wide insertional mutagenesis in human cells by the *Drosophila* mobile element Minos. *EMBO Rep* **1**, 416-21.
- Kohlhase, J., Taschner, P. E., Burfeind, P., Pasche, B., Newman, B., Blanck, C., Breuning, M. H., ten Kate, L. P., Maaswinkel-Mooy, P., Mitulla, B. et al.** (1999). Molecular analysis of SALL1 mutations in Townes-Brocks syndrome. *Am J Hum Genet* **64**, 435-45.
- Kohlhase, J., Wischermann, A., Reichenbach, H., Froster, U. and Engel, W.** (1998). Mutations in the SALL1 putative transcription factor gene cause Townes-Brocks syndrome. *Nat Genet* **18**, 81-3.
- Krause, G.** (1939). Die Eitypen der Insekten. *Biolog. Zentralblatt* **59**, 495-536.
- Kühnlein, R. P., Bronner, G., Taubert, H. and Schuh, R.** (1997). Regulation of *Drosophila* spalt gene expression. *Mech Dev* **66**, 107-18.
- Kühnlein, R. P., Frommer, G., Friedrich, M., Gonzalez-Gaitan, M., Weber, A., Wagner-Bernholz, J. F., Gehring, W. J., Jackle, H. and Schuh, R.** (1994). spalt encodes an evolutionarily conserved zinc finger protein of novel structure which provides homeotic gene function in the head and tail region of the *Drosophila* embryo. *Embo J* **13**, 168-79.
- Kühnlein, R. P. and Schuh, R.** (1996). Dual function of the region-specific homeotic gene spalt during *Drosophila* tracheal system development. *Development* **122**, 2215-23.
- Kurant, E., Pai, C. Y., Sharf, R., Halachmi, N., Sun, Y. H. and Salzberg, A.** (1998). Dorsototals/homothorax, the *Drosophila* homologue of meis1, interacts with extradenticle in patterning of the embryonic PNS. *Development* **125**, 1037-48.
- LaJeunesse, D. and Shearn, A.** (1996). E(z): a polycomb group gene or a trithorax group gene? *Development* **122**, 2189-97.

- Lamka, M. L., Boulet, A. M. and Sakonju, S.** (1992). Ectopic expression of UBX and ABD-B proteins during *Drosophila* embryogenesis: competition, not a functional hierarchy, explains phenotypic suppression. *Development* **116**, 841-54.
- Lewis, D. L., DeCamillis, M. and Bennett, R. L.** (2000). Distinct roles of the homeotic genes *Ubx* and *abd-A* in beetle embryonic abdominal appendage development. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 4504-9.
- Lidholm, D. A., Gudmundsson, G. H. and Boman, H. G.** (1991). A highly repetitive, mariner-like element in the genome of *Hyalophora cecropia*. *J Biol Chem* **266**, 11518-21.
- Lidholm, D. A., Lohe, A. R. and Hartl, D. L.** (1993). The transposable element mariner mediates germline transformation in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **134**, 859-68.
- Lohmann, I., McGinnis, N., Bodmer, M. and McGinnis, W.** (2002). The *Drosophila* Hox gene *deformed* sculpts head morphology via direct regulation of the apoptosis activator reaper. *Cell* **110**, 457-66.
- Lopez, A., Higuete, D., Rosset, R., Deutsch, J. and Peronnet, F.** (2001). *corto* genetically interacts with *Pc-G* and *trx-G* genes and maintains the anterior boundary of *Ultrabithorax* expression in *Drosophila* larvae. *Mol Genet Genomics* **266**, 572-83.
- Lorenzen, M. D., Berghammer, A. J., Brown, S. J., Denell, R. E., Klingler, M. and Beeman, R. W.** (2003). piggyBac-mediated germline transformation in the beetle *Tribolium castaneum*. *Insect Mol Biol* **12**, 433-40.
- Loukeris, T. G., Arca, B., Livadaras, I., Dialektaki, G. and Savakis, C.** (1995a). Introduction of the transposable element *Minos* into the germ line of *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 9485-9.
- Loukeris, T. G., Livadaras, I., Arca, B., Zabalou, S. and Savakis, C.** (1995b). Gene transfer into the medfly, *Ceratitis capitata*, with a *Drosophila hydei* transposable element. *Science* **270**, 2002-5.
- Lozovskaya, E. R., Nurminsky, D. I., Hartl, D. L. and Sullivan, D. T.** (1996). Germline transformation of *Drosophila virilis* mediated by the transposable element *hobo*. *Genetics* **142**, 173-7.
- MacDonald, P. M.** (1990). *bicoid* mRNA localization signal: phylogenetic conservation of function and RNA secondary structure. *Development* **110**, 161-71.
- Macdonald, P. M. and Struhl, G.** (1988). cis-acting sequences responsible for anterior localization of *bicoid* mRNA in *Drosophila* embryos. *Nature* **336**, 595-8.
- Maderspacher, F., Bucher, G. and Klingler, M.** (1998). Pair-rule and gap gene mutants in the flour beetle *Tribolium castaneum*. *Dev Genes Evol* **208**, 558-68.
- McGinnis, W., Shermoen, A. W. and Beckendorf, S. K.** (1983). A transposable element inserted just 5' to a *Drosophila* glue protein gene alters gene expression and chromatin structure. *Cell* **34**, 75-84.
- Medhora, M. M., MacPeck, A. H. and Hartl, D. L.** (1988). Excision of the *Drosophila* transposable element mariner: identification and characterization of the *Mos* factor. *Embo J* **7**, 2185-9.
- Meyer, C. A., Kramer, I., Dittrich, R., Marzodko, S., Emmerich, J. and Lehner, C. F.** (2002). *Drosophila* p27^{Dacapo} expression during embryogenesis is controlled by a complex regulatory region independent of cell cycle progression. *Development* **129**, 319-28.
- Nagy, L. M. and Carroll, S.** (1994). Conservation of wingless patterning functions in the short-germ embryos of *Tribolium castaneum*. *Nature* **367**, 460-3.
- O'Brochta, D. A. and Atkinson, P. W.** (1996). Transposable elements and gene transformation in non-drosophilid insects. *Insect Biochem Mol Biol* **26**, 739-53.
- O'Brochta, D. A. and Handler, A. M.** (1988). Mobility of P elements in drosophilids and nondrosophilids. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**, 6052-6056.
- O'Brochta, D. A., Warren, W. D., Saville, K. J. and Atkinson, P. W.** (1994). Interplasmid transposition of *Drosophila* *hobo* elements in non-drosophilid insects. *Mol Gen Genet* **244**, 9-14.
- O'Brochta, D. A., Warren, W. D., Saville, K. J. and Atkinson, P. W.** (1996). *Hermes*, a functional non-*Drosophilid* insect gene vector from *Musca domestica*. *Genetics* **142**, 907-14.
- Ott, T., Kaestner, K. H., Monaghan, A. P. and Schutz, G.** (1996). The mouse homolog of the region specific homeotic gene *spalt* of *Drosophila* is expressed in the developing nervous system and in mesoderm-derived structures. *Mech Dev* **56**, 117-28.
- Park, T.** (1934). Observations on the general biology of the flour beetle *Tribolium confusum* Duval. *Q. Rev. Biol.* **9**, 36-54.

- Patel, N. H., Condrón, B. G. and Zinn, K.** (1994). Pair-rule expression patterns of even-skipped are found in both short- and long-germ beetles. *Nature* **367**, 429-34.
- Patel, N. H., Martín-Blanco, E., Coleman, K. G., Poole, S. J., Ellis, M. C., Kornberg, T. B. and Goodman, C. S.** (1989). Expression of engrailed proteins in arthropods, annelids, and chordates. *Cell* **58**, 955-68.
- Peifer, M. and Wieschaus, E.** (1990). Mutations in the Drosophila gene extradenticle affect the way specific homeo domain proteins regulate segmental identity. *Genes Dev* **4**, 1209-23.
- Perkins, H. D. and Howells, A. J.** (1992). Genomic sequences with homology to the P element of Drosophila melanogaster occur in the blowfly *Lucilia cuprina*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 10753-7.
- Phelps, C. B. and Brand, A. H.** (1998). Ectopic gene expression in Drosophila using GAL4 system. *Methods* **14**, 367-79.
- Pinsonneault, J., Florence, B., Vaessin, H. and McGinnis, W.** (1997). A model for extradenticle function as a switch that changes HOX proteins from repressors to activators. *Embo J* **16**, 2032-42.
- Poulson, D. F.** (1943). Induced chromosome deficiencies. Their effect on normal individuals. *Yale Sci* **17**, 3-5.
- Poulson, D. F.** (1945). Chromosomal control of embryogenesis in Drosophila. *Am Nat* **79**, 340-363.
- Prpic, N. M., Wigand, B., Damen, W. G. and Klingler, M.** (2001). Expression of dachshund in wild-type and Distal-less mutant *Tribolium* corroborates serial homologies in insect appendages. *Dev Genes Evol* **211**, 467-77.
- Rivera-Pomar, R. and Jackle, H.** (1996). From gradients to stripes in Drosophila embryogenesis: filling in the gaps. *Trends Genet* **12**, 478-83.
- Roberts, D. B.** (1986). Drosophila. A practical approach. Oxford: IRL Press.
- Robertson, H. M.** (1993). The mariner transposable element is widespread in insects. *Nature* **362**, 241-5.
- Robertson, H. M. and MacLeod, E. G.** (1993). Five major subfamilies of mariner transposable elements in insects, including the Mediterranean fruit fly, and related arthropods. *Insect Mol Biol* **2**, 125-39.
- Roder, L., Vola, C. and Kerridge, S.** (1992). The role of the teashirt gene in trunk segmental identity in Drosophila. *Development* **115**, 1017-33.
- Ronchi, E., Treisman, J., Dostatni, N., Struhl, G. and Desplan, C.** (1993). Down-regulation of the Drosophila morphogen bicoid by the torso receptor-mediated signal transduction cascade. *Cell* **74**, 347-55.
- Rong, Y. S. and Golic, K. G.** (2000). Gene targeting by homologous recombination in Drosophila. *Science* **288**, 2013-8.
- Rubin, G. M. and Spradling, A. C.** (1982). Genetic transformation of Drosophila with transposable element vectors. *Science* **218**, 348-53.
- Rubin, G. M. and Spradling, A. C.** (1983). Vectors for P element-mediated gene transfer in Drosophila. *Nucleic Acids Res* **11**, 6341-51.
- Sambrook, J. and Russel, D. W.** (2001). Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Santamaria, P.** (1998). Genesis versus epigenesis: the odd jobs of the Polycomb group of genes. *Int J Dev Biol* **42**, 463-9.
- Sarkar, A., Coates, C. J., Whyard, S., Willhoeft, U., Atkinson, P. W. and O'Brochta, D. A.** (1997a). The Hermes element from *Musca domestica* can transpose in four families of cyclorrhaphan flies. *Genetica* **99**, 15-29.
- Sarkar, A., Yardley, K., Atkinson, P. W., James, A. A. and O'Brochta, D. A.** (1997b). Transposition of the Hermes element in embryos of the vector mosquito, *Aedes aegypti*. *Insect Biochem Mol Biol* **27**, 359-63.
- Scavarda, N. J. and Hartl, D. L.** (1984). Interspecific DNA transformation in Drosophila. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**, 7515-9.
- Schuh, R., Aicher, W., Gaul, U., Cote, S., Preiss, A., Maier, D., Seifert, E., Nauber, U., Schroder, C., Kemler, R. et al.** (1986). A conserved family of nuclear proteins containing structural elements of the finger protein encoded by Kruppel, a Drosophila segmentation gene. *Cell* **47**, 1025-32.

- Schulz, C. and Tautz, D.** (1994). Autonomous concentration-dependent activation and repression of Kruppel by hunchback in the Drosophila embryo. *Development* **120**, 3043-9.
- Sheng, G., Thouvenot, E., Schmucker, D., Wilson, D. S. and Desplan, C.** (1997). Direct regulation of rhodopsin 1 by Pax-6/eyeless in Drosophila: evidence for a conserved function in photoreceptors. *Genes Dev* **11**, 1122-31.
- Sherman, A., Dawson, A., Mather, C., Gilhooley, H., Li, Y., Mitchell, R., Finnegan, D. and Sang, H.** (1998). Transposition of the Drosophila element mariner into the chicken germ line. *Nat Biotechnol* **16**, 1050-3.
- Shimizu, K., Kamba, M., Sonobe, H., Kanda, T., Klinakis, A. G., Savakis, C. and Tamura, T.** (2000). Extrachromosomal transposition of the transposable element Minos occurs in embryos of the silkworm *Bombyx mori*. *Insect Mol Biol* **9**, 277-81.
- Shippy, T. D., Brown, S. J. and Denell, R. E.** (1998). Molecular characterization of the Tribolium abdominal-A ortholog and implications for the products of the Drosophila gene. *Dev Genes Evol* **207**, 446-52.
- Shippy, T. D., Brown, S. J. and Denell, R. E.** (2000a). Maxillopedia is the Tribolium ortholog of proboscipedia. *Evol Dev* **2**, 145-51.
- Shippy, T. D., Guo, J., Brown, S. J., Beeman, R. W. and Denell, R. E.** (2000b). Analysis of maxillopedia expression pattern and larval cuticular phenotype in wild-type and mutant tribolium. *Genetics* **155**, 721-31.
- Sokal, R. R. and Rohlf, F.** (1995). Biometry: W. H. Freeman and Company.
- Sommer, R. J. and Tautz, D.** (1993). Involvement of an orthologue of the Drosophila pair-rule gene hairy in segment formation of the short germ-band embryo of Tribolium (Coleoptera). *Nature* **361**, 448-50.
- Sommer, R. J. and Tautz, D.** (1994). Expression patterns of twist and snail in Tribolium (Coleoptera) suggest a homologous formation of mesoderm in long and short germ band insects. *Dev Genet* **15**, 32-7.
- Spradling, A. C. and Rubin, G. M.** (1982). Transposition of cloned P elements into Drosophila germ line chromosomes. *Science* **218**, 341-7.
- St Johnston, D. and Nusslein-Volhard, C.** (1992). The origin of pattern and polarity in the Drosophila embryo. *Cell* **68**, 201-19.
- Stauber, M., Jackle, H. and Schmidt-Ott, U.** (1999). The anterior determinant bicoid of Drosophila is a derived Hox class 3 gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 3786-9.
- Stauber, M., Prell, A. and Schmidt-Ott, U.** (2002). A single Hox3 gene with composite bicoid and zerknullt expression characteristics in non-Cyclorrhaphan flies. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 274-9.
- Stuart, J. J., Brown, S. J., Beeman, R. W. and Denell, R. E.** (1993). The Tribolium homeotic gene Abdominal is homologous to abdominal-A of the Drosophila bithorax complex. *Development* **117**, 233-43.
- Sulston, I. A. and Anderson, K. V.** (1996). Embryonic patterning mutants of Tribolium castaneum. *Development* **122**, 805-14.
- Sundararajan, P., Atkinson, P. W. and O'Brochta, D. A.** (1999). Transposable element interactions in insects: crossmobilization of hobo and Hermes. *Insect Mol Biol* **8**, 359-68.
- Tautz, D., Friedrich, M. and Schröder, R.** (1994). Insect Embryogenesis - what is ancestral and what is derived? *Dev. Suppl.*, 193-199.
- Tautz, D., Lehmann, R., Schnürch, H., Schuh, R., Seifert, E., Kienlin, A., Jones, K. and Jäckle, H.** (1987). Finger protein of novel structure encoded by hunchback, a second member of the gap class of Drosophila segmentation genes. *Nature* **327**, 383-389.
- Theodosiou, N. A. and Xu, T.** (1998). Use of FLP/FRT system to study Drosophila development. *Methods* **14**, 355-65.
- Thibault, S. T., Luu, H. T., Vann, N. and Miller, T. A.** (1999). Precise excision and transposition of piggyBac in pink bollworm embryos. *Insect Mol Biol* **8**, 119-23.
- Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. and Higgins, D. G.** (1997). The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* **25**, 4876-82.

- Thummel, C. S., Boulet, A. M. and Lipshitz, H. D.** (1988). Vectors for Drosophila P-element-mediated transformation and tissue culture transfection. *Gene* **74**, 445-56.
- van Lohuizen, M.** (1999). The trithorax-group and polycomb-group chromatin modifiers: implications for disease. *Curr Opin Genet Dev* **9**, 355-61.
- Wang, H. G. and Fraser, M. J.** (1993). TTAA serves as the target site for TFP3 lepidopteran transposon insertions in both nuclear polyhedrosis virus and *Trichoplusia ni* genomes. *Insect Mol Biol* **1**, 109-16.
- Warren, W. D., Atkinson, P. W. and O'Brochta, D. A.** (1994). The Hermes transposable element from the house fly, *Musca domestica*, is a short inverted repeat-type element of the hobo, Ac, and Tam3 (hAT) element family. *Genet Res* **64**, 87-97.
- Wigand, B., Bucher, G. and Klingler, M.** (1998). A simple whole mount technique for looking at *Tribolium* embryos. *Tribolium Information Bulletin (TIB)* **38**, 281.
- Wilson, D., Sheng, G., Lecuit, T., Dostatni, N. and Desplan, C.** (1993). Cooperative dimerization of paired class homeo domains on DNA. *Genes Dev* **7**, 2120-34.
- Wolff, C., Schroder, R., Schulz, C., Tautz, D. and Klingler, M.** (1998). Regulation of the *Tribolium* homologues of caudal and hunchback in Drosophila: evidence for maternal gradient systems in a short germ embryo. *Development* **125**, 3645-54.
- Wolff, C., Sommer, R., Schroder, R., Glaser, G. and Tautz, D.** (1995). Conserved and divergent expression aspects of the Drosophila segmentation gene hunchback in the short germ band embryo of the flour beetle *Tribolium*. *Development* **121**, 4227-36.
- Zagoraiou, L., Drabek, D., Alexaki, S., Guy, J. A., Klinakis, A. G., Langeveld, A., Skavdis, G., Mamalaki, C., Grosveld, F. and Savakis, C.** (2001). In vivo transposition of Minos, a Drosophila mobile element, in mammalian tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 11474-8.

Hiermit erkläre ich, die vorliegende Arbeit selbst verfaßt und keine anderen als die angegebenen Quellen benutzt zu haben.

München im Dezember 2003

Andreas J. Berghammer

Lebenslauf

Name: Berghammer, Andreas Josef
geboren am: 26.02.1967 in München
Nationalität: deutsch

1973 – 1977 Grundschule an der Wilhelmstraße, München
1977 – 1986 Oskar-von-Miller-Gymnasium, München

Juli 86 – Sept. 87 Grundwehrdienst

Okt. 87 – April 95 Biologiestudium, Ludwig-Maximilians-Universität, München
Abschluß Diplom Biologe Univ.
Dipl.arbeit am Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried
Abt. Zellbiologie, Dr. G. Gerisch, AG Dr. M. Maniak

Aug. 92 – Juli 93 Studienaufenthalt an der Universidad de Costa Rica, San José
im Rahmen des IAS-Programmes des Deutschen
Akademischen Austauschdienstes (DAAD)

Juni 95 – Okt. 95 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Max-Planck-Inst. für
Biochemie Abteilung Prof. Dr. Oesterhelt

April 96 – Sept. 96 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Zoologischen Institut der
Universität München, Abteilung Prof. Dr. D. Tautz

Okt. 96 – Sept. 03 Promotion am Zoologischen Institut der Universität München,
Arbeitsgruppe PD Dr. M. Klingler

seit Okt. 2002 Geschäftsführer der Dt. Zoologischen Gesellschaft e.V.

Fortbildungsveranstaltung für Projektleiter und Beauftragte für die biologische Sicherheit
(nach dt. Gentechnologiegesetz, 1994 (AZ 821-8761.3.9 III))