

**Bone Morphogenetic Proteins (BMP)
in der Embryonalentwicklung von
*Tribolium castaneum***

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades

der Fakultät für Biologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von
Markus Weber
aus Homburg/Saar

Almere, 2006

Tag der Einreichung: 2. August 2006

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Harry MacWilliams
 2. Berichterstatter: Prof. Dr. George Boyan
- Sondergutachter: Prof. Dr. Martin Klingler

Tag der mündlichen Prüfung: 21. Dezember 2006

Für Maria

Les insectes
sont nés du soleil qui les nourrit.
Ils sont les baisers du soleil...
A. N. Scriabin

Danksagung

An erster Stelle möchte ich Prof. Dr. Martin Klingler ganz herzlich für die Betreuung der Arbeit bedanken. Seine langjährige Unterstützung und viele kritische Diskussionen ermöglichten erst das Gelingen. Herrn Prof. Dr. Harry MacWilliams gilt mein besonderer Dank, da er sich direkt bereit erklärte, das Erstgutachten zu übernehmen und das Promotionsverfahren an der LMU zu vertreten. Ebenso möchte ich Herrn Prof. Dr. George Boyan danken, der sich als zweiter Berichterstatter zur Verfügung stellte. In München zeigten mir Christoph Eckert und Gregor Bucher experimentelle Wege zu Genen und Klonen, während mir Andeas Berghammer, Johannes Scholten und Hildegard Wohlfrom die Käferwelt näher brachten. Gabi Büttner und Traudl Feldmaier-Fuchs wußten immer Rat, wenn sonst alles versagte. Allen Münchner Kollegen möchte ich für den schier unglaublichen Einsatz bei einem „Großprojekt“ danken, das in eine sehr kritische Episode meiner Promotionszeit fiel. Hier möchte ich aber Tim & Brigitte, Barbara, Sylvain und ganz besonders Johannes noch einmal erwähnen. Sandra Gottschaller schulde ich besonderen Dank für ihre feinmotorische Meisterleistung und ihre Geduld beim Aufreihen abertausender Käfereier. In Erlangen erleichterten Ralph Rübsam und Prof. Dr. Jürgen Büning die Ankunft am neuen Institut nicht zuletzt durch ihren besonderen Humor, der auch morgens um halb acht schon den Tag bereicherte. Beiden sei dafür herzlich gedankt. Bei Michael Schoppmeier möchte ich mich ganz besonders für das kritische Lesen großer Teile des Manuskripts bedanken.

Die *long range*-Wirkung von Frank Steines und Gabriele Weber löste bisher noch jedes Computerproblem irgendwie, außer den Mac-Problemen natürlich, für deren Kommen und Gehen ich wohl Martin danken sollte. Meinem Vater möchte ich für seinen besonders rasanten Einsatz bei logistischen Problemen danken. Kristina Hilpert sei besonders – aber nicht nur – für ihre bibliothekarische Unterstützung gedankt.

Alexander Cerny, zeigte mir das „fine tuning“ der in situ-Kunst, versorgte mich unermüdlich mit sonst unzugänglicher Literatur und beeindruckte mich ganz besonders auf der Zielgeraden mit kollegialer Hilfsbereitschaft. Danke!

Catja und Jochen haben stets dafür gesorgt, daß der „ferne Osten“ nicht als Exil empfunden wurde, ich danke Euch!

Eva Neumair gewährte in den Umzugszeiten und auch sonst ad hoc Asyl und hielt immer die Balance, wenn „living at the edge“ wieder mal die Maxime zu sein schien.

Meine Familie hat mich über die Jahre hinweg immer nach allen Kräften unterstützt. Ihnen allen möchte ich dafür sehr herzlich danken.

Maria, danke für Deine Liebe und unendliche Geduld!

| | |
|---|-----------|
| ABKÜRZUNGEN UND DEFINITIONEN..... | 5 |
| 1 EINLEITUNG..... | 8 |
| 1.1 <i>Tribolium</i> als Modellorganismus in der Entwicklungsgenetik..... | 8 |
| 1.2 Bone Morphogenetic Proteins in der Embryogenese von <i>Tribolium castaneum</i> | 11 |
| 1.3 Die TGF β -Proteinfamilie..... | 13 |
| 1.4 Dpp als Morphogen..... | 15 |
| 1.5 Ausgewählte ontogenetische Prozesse bei <i>Drosophila melanogaster</i> und <i>Tribolium castaneum</i> | 16 |
| 1.5.1 Die Bildung der Dorsoventralachse des Embryos..... | 16 |
| 1.5.2 Aspekte der Extremitätenentwicklung in <i>Drosophila</i> und <i>Tribolium</i> | 24 |
| 1.5.3 Die Flügelentwicklung von <i>Drosophila melanogaster</i> als Modell für die Interaktion zweier BMP-Liganden..... | 29 |
| 1.5.4 Funktionen von <i>dpp</i> als „prepattern“-Gen bei der Anlage der proneuralen Cluster..... | 39 |
| 1.5.5 Rolle der BMP bei der Entwicklung des Tracheensystems und der Telsonregion..... | 39 |
| 1.5.6 Funktionen von BMP 6/7/8-Orthologen bei Anlage und Differenzierung neuraler Strukturen..... | 41 |
| 1.6 Ziele dieser Arbeit..... | 42 |
| 2 MATERIAL UND METHODEN..... | 43 |
| 3 ERGEBNISSE..... | 52 |
| 3.1 Decapentaplegic – <i>dpp</i> | 52 |
| 3.1.1 Die embryonale Expression von <i>dpp</i> in <i>Tribolium castaneum</i> -Wildtyp..... | 52 |
| 3.1.2 Knock down-Experimente mit <i>dpp</i> -Morpholino-Oligonucleotiden und RNA- Interferenz..... | 76 |

| | | |
|------------|---|------------|
| 3.1.3 | Expressionsmuster molekularer Marker in <i>dpp</i> -RNAi-Embryonen und <i>dpp</i> -Morpholino-Embryonen | 87 |
| 3.2 | Glass bottom boat – <i>gbb</i> | 101 |
| 3.2.1 | Embryonale Expression von <i>gbb</i> in <i>Tribolium</i> -Wildtyp | 101 |
| 3.2.2 | Knock down der <i>gbb</i> -Funktion durch embryonale RNAi | 120 |
| 3.2.3 | Adult-parentale RNAi | 133 |
| 3.2.4 | Expression molekularer Marker in <i>gbb</i> -RNAi-Embryonen | 134 |
| 3.2.5 | Befunde zur Anlage der Trachealplakoden in <i>Tribolium</i> | 150 |
| 4 | DISKUSSION..... | 153 |
| 4.1 | <i>Dpp</i> ist essentiell für die dorsoventrale Musterbildung im Blastoderm.. | 154 |
| 4.1.1 | <i>Dpp</i> determiniert dorsale Anlagen im Blastoderm..... | 155 |
| 4.1.2 | Die anteriore <i>dpp</i> -Expression unterliegt zunehmend dorsoventralen Einflüssen | 156 |
| 4.1.3 | Eine distinkte Zellpopulation zwischen Serosa und Embryo exprimiert <i>dpp</i> | 157 |
| 4.1.4 | Randliche Serosazellen exprimieren <i>dpp</i> und <i>gbb</i> | 158 |
| 4.1.5 | <i>Dpp</i> spielt möglicherweise eine Rolle bei der Determinierung der anterioren Amnionanlage | 159 |
| 4.1.6 | <i>Dpp</i> ist für die Determination dorsaler Anlagen im wachsenden Keimstreif erforderlich | 159 |
| 4.2 | Das Amnion entsteht aus drei unterschiedlichen Anlagen | 160 |
| 4.2.1 | Die anteriore Amnionanlage bedeckt den Vorderkopf und bildet das Serosafenster | 161 |
| 4.2.2 | Mittlere Amnionbereiche entstehen aus <i>pannier</i> -exprimierenden Zellen des dorsalen Blastoderms | 163 |
| 4.2.3 | Das <i>dpp</i> -exprimierende Wachstumszonendach generiert Amnionepithel . | 163 |
| 4.2.4 | Die <i>dpp</i> -Expression der Wachstumszone bildet durch anteriore Expansion eine zusammenhängende amniotische <i>dpp</i> -Domäne..... | 164 |
| 4.2.5 | Dorsoventrale Musterbildung im Ektoderm durch amniotisches Dpp..... | 165 |
| 4.3 | <i>Gbb</i> ist für Amniogenese und dorsoventrale Musterbildung in der Wachstumszone notwendig..... | 167 |

| | | |
|------------|--|------------|
| 4.3.1 | <i>Gbb</i> unterdrückt ektopische <i>dpp</i> -Expression in der medialen Säule des Neuroektoderms | 167 |
| 4.3.2 | Starke <i>gbb</i> -RNAi-Phänotypen liefern Hinweise auf eine Selbstaktivierung der <i>dpp</i> -Expression..... | 168 |
| 4.3.3 | Die dorsale ektodermale <i>dpp</i> -Domäne könnte aus einer Autoaktivierung aus dem Amnion resultieren | 169 |
| 4.3.4 | <i>Gbb</i> ist für Bildung bzw. Differenzierung posterioren Amnionepithels durch die Wachstumszone erforderlich..... | 170 |
| 4.3.5 | Ist <i>gbb</i> für dorsale Schicksale in der Wachstumszone notwendig? | 172 |
| 4.3.6 | Modell zur dorsoventralen Musterbildung in <i>Tribolium</i> entsprechend dem <i>Drosophila</i> -Paradigma | 173 |
| 4.3.7 | Ist das <i>gbb-dpp</i> -System Teil eines autonomen Musterbildungssystems in der Wachstumszone?..... | 176 |
| 4.4 | BMP-Funktionen in der Extremitätenentwicklung | 179 |
| 4.4.1 | Duplikation der proximodistalen Achse der Extremitäten in <i>gbb</i> -RNAi-Embryonen | 179 |
| 4.4.2 | Ein BMP-Liganden-Transportsystem der dorsoventralen Musterbildung könnte bei der Etablierung der Proximodistal-Achse der Extremitätenanlagen mitwirken | 182 |
| 4.4.3 | Proliferative Funktionen der BMP | 185 |
| 4.5 | Hinweise auf die Funktionen von BMP in den Trachealplakoden von <i>Tribolium castaneum</i> | 186 |
| 4.5.1 | Zwei unterschiedliche metamere <i>dpp</i> -Expressionen bilden die ventrolaterale <i>dpp</i> -Domäne von <i>Tribolium</i> | 186 |
| 4.5.2 | Die schwachen anterioren <i>dpp</i> -Domänen könnten eine Funktion bei der Anlage der Trachealplakoden erfüllen | 187 |
| 4.5.3 | Ektopische <i>dpp</i> -Domänen könnten eine Duplikation der Plakode oder eine gestörte Musterbildung innerhalb der Plakode bewirken..... | 188 |
| 4.6 | Mögliche weitere Funktionen von <i>gbb</i> in der Embryonalentwicklung von <i>Tribolium</i>..... | 188 |
| 4.6.1 | <i>Gbb</i> in neuralen Anlagen..... | 188 |
| 4.6.2 | <i>Gbb</i> in der Entwicklung von Urogomphi, Telson und Proctodaeum..... | 189 |

| | | |
|------------|---|------------|
| 4.7 | Überlegungen zur BMP-Liganden-Wechselwirkung in Insekten..... | 190 |
| 4.7.1 | Geschachtelte BMP-Domänen mit <i>gbb</i> in dualer Funktion | 191 |
| 4.7.2 | Dpp als Morphogen in der Flügelimaginalscheibe | 191 |
| 4.7.3 | Die dorsoventrale Musterbildung im <i>Drosophila</i> -Blastoderm..... | 192 |
| 5 | ZUSAMMENFASSUNG..... | 193 |
| | LITERATUR..... | 194 |
| | ERKLÄRUNG..... | 218 |
| | CURRICULUM VITAE..... | 219 |

ABKÜRZUNGEN UND DEFINITIONEN

Nicht angegebene Einheiten folgen internationaler Nomenklatur.

| | |
|-------------|--|
| A | Abdomen |
| ACV | anterior cross vein (Querader des Drosophilaflügels zwischen L3 & L4) |
| An | Antennensegment |
| AP | alkaline phosphatase |
| AP- | anteroposterior |
| aRNAi | adulte RNAi (durch Injektion in Imagines) |
| ASC | <i>achaete-scute-complex</i> |
| Bn | Bein |
| bp | Basenpaar |
| CR | cysteinreiche Domänen |
| DIC | Differential-Interferenz-Kontrast |
| DIG | Digoxigenin |
| Dm' | Ortholog aus <i>Drosophila melanogaster</i> |
| <i>dppM</i> | zu einem <i>Tc'dpp</i> -Fragment sequenzhomologes Morpholino-Oligonucleotid, siehe "Material und Methoden" |
| dsRNA | Doppelstrang-RNA |
| DV- | dorsoventral |
| eRNAi | embryonale RNAi (durch Injektion in Eier) |
| EGFR | Epidermal Growth Factor Receptor |
| EL | Eilänge |
| EMS | Ethylmethansulfonat |
| FGF | Fibroblast Growth Factor |
| Flu | Fluorescein |
| GOF | gain of function |
| h | Stunde |
| JNK | c-Jun N-terminale Kinase |
| kb | Kilobasenpaare |
| L1 - L5 | erstes bis fünftes Larvenstadium von <i>T. castaneum</i> |
| L2 - L5 | Längsadern des Drosophilaflügels (longitudinal veins, LV) |
| Lb | Labialsegment |
| LE | leading edge (beim embryonalen Rückenschluß von <i>D. melanogaster</i>) |
| Lr | Labralsegment |
| LSM | laser scanning microscope |

INHALTSVERZEICHNIS

| | |
|------------|--|
| LV | longitudinal vein, Längsader des Drosophilaflügels |
| Mad | mothers against <i>dpp</i> |
| MAPK | mitogen-activated protein kinase |
| min. | Minute |
| Mio. | Millionen |
| Mn | Mandibularsegment |
| <i>Mrt</i> | <i>Moonrat/hedgehog</i> -GOF-Mutante |
| Mx | Maxillarsegment |
| n | Stichprobenumfang |
| NfκB | Nuclear Factor kappa B |
| Oc | Ocularsegment |
| PBS | phosphatgepufferte Salzlösung |
| PBT | phosphatgepufferte Salzlösung mit Tween-20 (oder Triton X-100) |
| PCV | posterior cross vein (Querader des Drosophilaflügels zwischen L4 & L5) |
| PD | proximale Domäne (BMP-Expression) |
| PD- | proximodistal |
| PEMS | PIPES/EGTA/MgSO ₄ /Sorbitol-Puffer |
| pMad | phosphoryliertes Mad-Protein |
| POD | Peroxidase |
| PP | Pleuropodium |
| pRNAi | parentale RNAi (durch pupale Injektion) |
| RNAi | RNA-Interferenz |
| rpm | revolutions per minute |
| RT | Raumtemperatur |
| SB | San Bernardino-Stamm von <i>T. castaneum</i> |
| SEM | scanning electron microscope |
| SMAD | Sma- and Mad-related protein |
| SOP | sensory organ precursor |
| T | Thorax |
| T1-T3 | Thoraxsegment 1-3 |
| Tc' | Ortholog aus <i>Tribolium castaneum</i> |
| wt | Wildtyp |
| ZNS | Zentralnervensystem |

Definitionen nicht allgemein gebräuchlicher Begriffe:

| | |
|---|---|
| Boden der Wachstumszone | "outer layer" + "inner layer", im ausgewachsenen Keimstreif jedoch nur durch "outer layer" gebildet. |
| Dach der Wachstumszone | Während des Keimstreifwachstums dickes, dorsales Epithel der Wachstumszone; enthält Amnionanlagen. |
| dorsale Domäne | <i>Dpp</i> - oder <i>gbb</i> -Domäne am Keimstreifrand, ektodermale Anlage dorsaler Epidermis. |
| Endplatte | Posteriores Ende der aktiven Wachstumszone: dickes Epithel, das vorwiegend von einer <i>twist</i> exprimierenden zentralen Region gebildet wird, die keine BMP exprimiert. |
| geschachtelte Expression engl. „nested expression“ | Eine kleinere Domäne eines Gens (z.B. <i>dpp</i>) liegt in einer ähnlich geformten, aber größeren Domäne eines zweiten Gens (z.B. <i>gbb</i>). Eine zentrale Koexpressionszone wird von einer ausschließlichen Expression des zweiten Gens gesäumt. |
| globular mass | Zellmasse, die der "inner layer" zumindest transient auf der Dotterseite aufliegt, enthält Keimzellen und unterscheidet sich von "inner layer"-Zellen im Cytoskelett (Handel et al., 2005; Schröder, 2006). |
| inner layer | Gewebe, das lateral von Seitenplatten begrenzt wird und nur im posterioren Teil <i>twist</i> exprimiert, vermutlich Mesoderm (Handel et al., 2005). |
| intermediäre Zellen | Zellen des differenzierten Blastoderms, die zwischen Serosa und Embryo (sensu strictu) liegen und sich durch intermediären DNA-Gehalt und Zellgröße gegen diese beiden Epithelien abgrenzen lassen. |
| proximale Domäne | Isoliert liegende, punktförmige <i>Dpp</i> - oder <i>gbb</i> -Domäne in der proximalen Extremitätenanlage des Thorax. |
| Seitenplatte(n) | Ektoderm des Keimstreifs und der Wachstumszone ("outer layer", Handel et al., 2005). |
| Serosa-Embryo-Grenze (SEG) | Außengrenze der Serosa, unabhängig davon welches Epithel sich anschließt (Amnion oder Embryo sensu stricto). |
| mittlere Säule des Neuroektoderm | engl. „medial column“, <i>ventral nerve cord defective</i> -Domäne (<i>vnd</i>) (Wheeler et al., 2005). |
| Übergangszone | Zone differenzierender Segmente in der anterioren Wachstumszone. |

1 EINLEITUNG

Die Fruchtfliege *Drosophila* liefert als Modellsystem seit Jahrzehnten Einblicke in genetische und zellbiologische Vorgänge. Aus entwicklungsbiologischer Sicht war sie bestens geeignet, eine Fülle von Daten zu generieren. Gerade ihre, experimentell vorteilhafte Spezialisierung zu einer möglichst schnellen Entwicklung zum Imago erschwert jedoch die Ableitung von Prinzipien für die Insektenentwicklung oder gar die Entwicklung von Arthropoden. Die verminderte Regulationsfähigkeit bei Langkeiminsekten wie *Drosophila* (Davis & Patel, 2002), erleichterte sicherlich die Identifizierung grundlegender Mechanismen und Hierarchien. Möglicherweise hätte man diese, in stärker regulierten bzw. stärker redundanten Systemen so nicht ableiten können (zur Übersicht z.B. Wilkins, 2002). Andererseits verschränkt dieser Entwicklungsmodus auch den Blick auf Mechanismen einer solchen Plastizität, die doch wesentlich zur „Evoluierbarkeit“ (evolvability) biologischer Systeme beizutragen scheint (Gerhart & Kirschner, 1997; Tautz, 1992; Wagner, 1996).

1.1 *Tribolium* als Modellorganismus in der Entwicklungsgenetik

In den letzten Jahren hat sich *Tribolium castaneum* zu einem attraktiven Modelorganismus entwickelt, weil die bereits geleisteten Vorarbeiten einen experimentellen Zugang zu vielen entwicklungs- und evolutionsbiologischen Fragen erleichtern oder erstmals ermöglichen. So stehen in *Tribolium* etwa 100 spontane, EMS-generierte, sowie Röntgen-induzierte Mutanten zur Verfügung, die neben Segmentierung und Beinentwicklung unterschiedlichste Prozesse betreffen (Klingler nicht veröff., Beeman et al., 1989; Klingler, 2004; Maderspacher et al., 1998; Sulston & Anderson, 1996). Verfahren zur Haltung embryonal lethaler Mutanten (Berghammer et al., 1999a) sind ebenso entwickelt, wie ein effizientes transposonbasiertes Transformationssystem und geeignete transgene Marker (Berghammer et al., 1999b; Lorenzen et al., 2003; Pavlopoulos et al., 2004). Funktionelle Analysen werden darüber hinaus durch unterschiedliche RNA-Interferenz-Techniken (Brown et al., 1999; Bucher et al., 2002; Tomoyasu & Denell, 2004) und die Anwendung von Morpholino-Oligonucleotiden ermöglicht (Bucher & Klingler, 2004). Eine Reihe entwicklungsbiologischer Studien zur anteroposterioren Achsenbildung, Segmentierung und dorsoventralen Musterbildung verschaffen im Vergleich zu *Drosophila* Einblicke in die

Evolution von Entwicklungsprozessen und zeigen die phylogenetische Konservierung vieler Schlüsselmechanismen, aber auch signifikante Unterschiede. Ein herausragendes, abgeleitetes Merkmal der *Drosophila*-Entwicklung ist die Anlage aller Segmente im Blastodermstadium. Diese sogenannte „Langkeimentwicklung“ steht ursprünglicheren Modi gegenüber, in denen nur die anterioreren Segmente blastodermal angelegt werden, während die posterioren durch die Aktivität einer Wachstumszone sukzessiv angegliedert werden. Innerhalb der Coleoptera, deren Vorfahren sich vor etwa 250 Mio. Jahren von denen anderer holometaboler Taxa abgespalten haben, sind alle Modi von Kurzkeimer bis Langkeimer vertreten. Der durch *Tribolium* repräsentierte Kurzkeimtypus ist ein ursprünglicher Entwicklungsmodus (Tautz et al., 1994), der wesentliche Merkmale mit der Entwicklung basaler Insekten gemein hat. Zwar ist prinzipiell die asymmetrische Lokalisation maternaler Determinanten in *Tribolium* belegt (Bucher et al., 2005), doch müssen wesentliche Prozesse der Achsenbildung hier in einer zellulären Umgebung erfolgen, während sie in *Drosophila* durch heterochrone Verschiebung ins Stadium des syncytialen Blastoderm durch Gradienten diffusibler Faktoren geleistet werden können. Auch die Entstehung der Wachstumszone, Mechanismen ihrer Aktivität und insbesondere die Aufrechterhaltung der dorsoventralen Polarität durch die Wachstumszone sind weitgehend ungeklärt. Gerade in diesen beiden Komplexen könnte extrazellulär wirksamen Morphogenen in der Entwicklung von *Tribolium* eine besondere Funktion zukommen. Die Ausprägung der Blastokinese von *Tribolium* mit superfiziellen Keim stellt gegenüber Insekten wie *Oncopeltus* (Hemiptera) einen nicht zu unterschätzenden experimentellen Vorteil dar. Sie ist jedoch bei Weitem nicht so reduziert wie in *Drosophila* und läßt daher die Untersuchung dieser Prozesse und der voll entwickelten extraembryonalen Gewebe zu. Eine Übersicht über die blastokinetischen Bewegungen von *Tribolium* bis zum Schluß des Serosafensters (Anatrepsis) zeigt Abb.1.

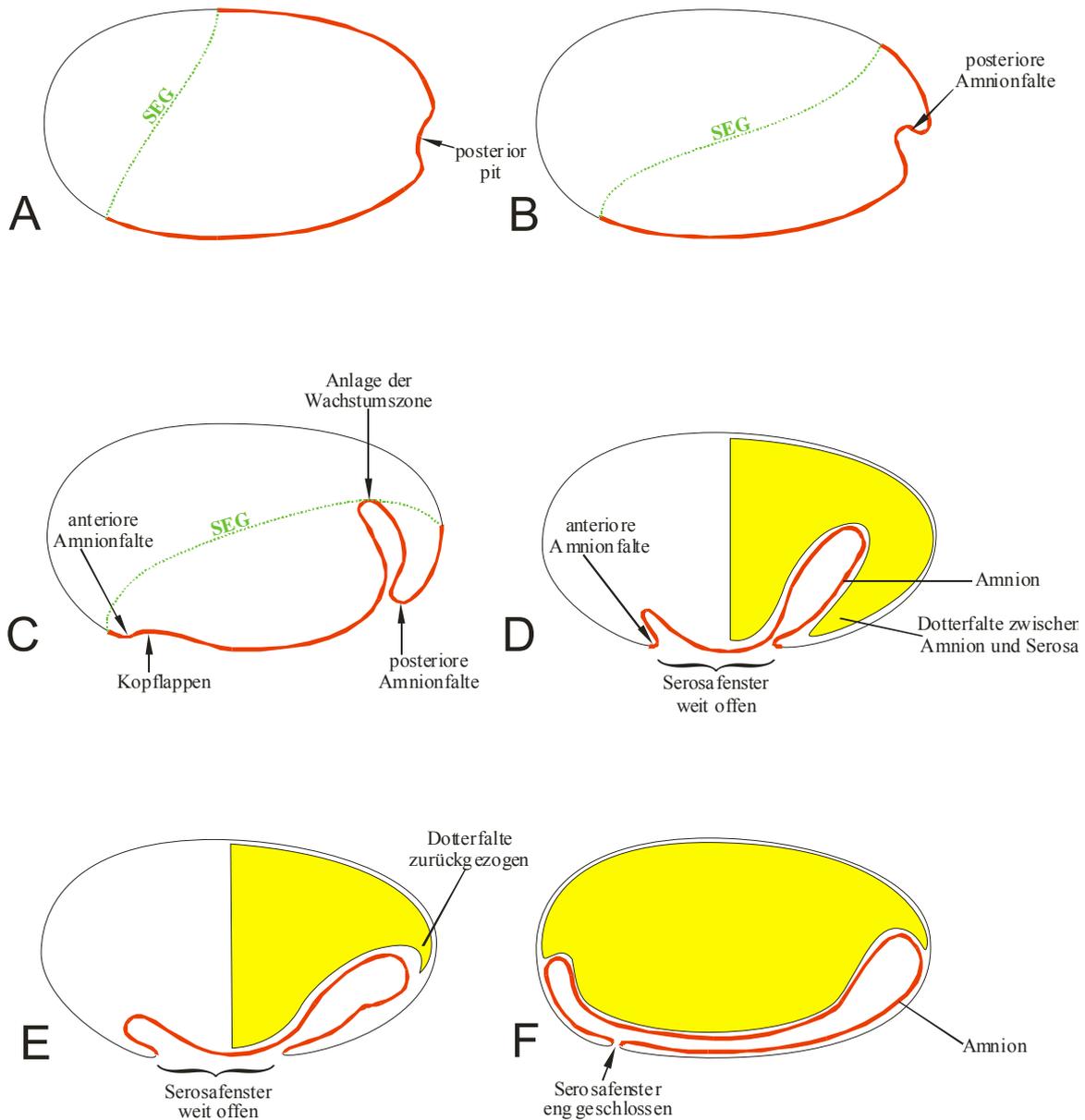


Abb. 1: Morphogenetische Bewegungen von *Tribolium castaneum* bis zum Schluß des Serosafensters (Anatrepsis), vereinfachter, schematischer Sagittalschnitt. Der Verlauf des Serosarandes auf der Eioberfläche ist in A – C als Serosa-Embryo-Grenzlinie (SEG) eingezeichnet, amniotische und embryonale Epithelien (beide rot) werden nicht unterschieden. **A**, posterior pit-Stadium; **B**, Beginn der Ausbildung der posterioren Amnionfalte; **C**, Beginn der Ausbildung der anterioren Amnionfalte, die Kopflappen beginnen sich einzusenken und die Wachstumszonenanlage ist bereits tief in den Dotter eingesenkt, ein Großteil der posterioren Amnionanlage liegt noch außerhalb; **D**, das Serosafenster ist zunehmend kreisförmig aber weit offen, die gesamte posteriore Amnionanlage ist in den Dotter eingesenkt, eine Dotterfalte („Dotterkeil“) trennt amniotisches „Blatt“ und „Serosa-Blatt“ der posterioren Amnionfalte; **E**, die Dotterfalte hat sich aus der posterioren Amnionfalte zurückgezogen, das posteriore Amnion liegt der Serosa an; **F**, das Serosafenster ist lochförmig verengt und der Keimstreif durchspannt die gesamte Länge des Eies. Schwarze, dünne Linie = Serosa; rote, dicke Linie = Anlagen von Embryo + Amnion; grüne, punktierte Linie (SEG) = Serosa-Embryo-Grenze.

Extremitäten werden in *Tribolium* embryonal angelegt, während die Entwicklung von Imaginalscheiben in apoden Larven als stark spezialisiert angesehen werden kann. Im Gegensatz zu zweidimensionalen Imaginalscheiben sind die Extremitätenknospen dreidimensionale Gebilde, sodaß Musterbildungsprozesse hier anderen Voraussetzungen unterliegen. Dabei muß auch die Frage untersucht werden, ob Prozesse und Entwicklungsstadien in Imaginalscheiben überhaupt mit solchen in embryonalen Anlagen zu homologisieren und damit vergleichbar sind (Abzhanov & Kaufman, 2000). Die ausgeprägte Regulationsfähigkeit von *Tribolium* während Embryonal- und Larvalentwicklung (z.B. Davis & Patel, 2002; Maxton-Küchenmeister et al., 1999; van der Zee et al., 2005 und diese Arbeit) wird sicher eine experimentelle Herausforderung darstellen; sie liefert aber gleichzeitig in viel größerem Maße Einblicke in die zugrundeliegenden universellen Prozesse als dies von *Drosophila* zu erwarten wäre.

1.2 Bone Morphogenetic Proteins in der Embryogenese von *Tribolium castaneum*

In allen untersuchten Metazoa spielt Signaltransduktion durch sezernierte Proteine der Bone Morphogenetic Protein-Familie eine entscheidende Rolle im Laufe der Entwicklung. Die Bezeichnung „Bone Morphogenetic Proteins“ leitet sich ursprünglich aus der Eigenschaft ab, in Vertebraten Knochenbildung zu induzieren. Erst später hat man das breite Funktionsspektrum dieser Signalproteine erkannt. Aufgrund ihrer Struktur bilden BMP eine Unterfamilie innerhalb der Superfamilie der TGF β -Liganden, die alle autokrine und parakrine Cytokine darstellen. Die Transforming Growth Factors (TGF β) geben auch dem Signalweg den Namen, über den all diese Proteine ihre biologische Wirkung umsetzen. Bei der Ontogenese von *Drosophila* spielen sie in sehr unterschiedlichen Prozessen und zu verschiedenen Zeitpunkten der Entwicklung eine Rolle: sowohl in der Embryogenese, wie auch während der Larval- und Pupalentwicklung.

Unter den drei derzeit in *Drosophila* bekannten BMP *decapentaplegic* (*dpp*) (Irish & Gelbart, 1987; Padgett et al., 1987), *glass bottom boat* (*gbb*) (Doctor et al., 1992; Wharton et al., 1991) und *screw* (*scw*) (Arora et al., 1994) ist *dpp* insofern das prominenteste, als daß es ein gut untersuchtes Beispiel eines klassischen Morphogens darstellt (Tabata & Takei, 2004). *Dpp* spielt u.a. eine entscheidende Rolle in der Beinentwicklung, sowohl bei Positionierung der Beinanlagen, wie auch bei der Musterbildung. Die anderen beiden BMP hingegen sind bei *Drosophila* aus jetziger Sicht vornehmlich, wenn auch nicht ausschließlich, an Aktivierung

und Kontrolle des Dpp-Signalwegs beteiligt. Die Funktion von *screw*, dessen Expression in der frühen Embryogenese endet, beschränkt sich auf die dorsoventrale Musterbildung im Embryo (Arora et al., 1994; Shimmi et al., 2005c). Die frühesten Hinweise auf die Beteiligung eines weiteren Liganden lieferten genetische Untersuchungen der BMP-Rezeptor-Gene *thickveins* (*tkv*) und *saxophone* (*sax*). Der Phänotyp von *tkv*- bzw. *sax*-Mutanten unterscheidet sich wesentlich von dem der *dpp*-Mutanten (Brummel et al., 1994; Singer et al., 1997; Twombly et al., 1996). Dies wäre nicht zu erwarten, würden diese Rezeptoren nur durch diesen einen Liganden aktiviert werden.

Aus der genetischen Analyse von *gbb*-Mutanten lassen sich embryonale Funktionen bei der Morphogenese von Mitteldarm und Telson ableiten, während in Larven die Ausbildung des Fettkörpers betroffen ist. Ebenso wurden Funktionen in der Entwicklung der Imaginalscheiben (Khalsa et al., 1998) und der proneuralen Cluster beschrieben. Neben einer offenbar unmittelbar mit der *dpp*-Funktion in Zusammenhang stehenden, eher modulierenden Rolle (Chen et al., 1998a) sind für *gbb* auch *dpp*-unabhängige Funktionen wahrscheinlich. So scheinen z.B. Telson- und Fettkörperentwicklung von einer Störung der *dpp*-Expression unbeeinflusst. (Wharton et al., 1999). Ein viertes TGF β -Protein aus *Drosophila* – *maverick* – ist nach phylogenetischen Analysen nicht den BMP zuzuordnen (Nguyen et al., 2000).

Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit ist die Untersuchung der Funktionen von *glass bottom boat* in der Embryonalentwicklung von *Tribolium castaneum*. Der vergleichende Ansatz ermöglicht es, aus den Verhältnissen im ursprünglicheren Insekt *Tribolium* mögliche Grundprinzipien der BMP-Signaltransduktion abzuleiten, die auch die Befunde bei *Drosophila* in einen größeren Rahmen setzen.

In *Tribolium* ist *gbb* offenbar in nahezu alle Prozesse involviert, in denen BMP-Signaltransduktion eine Rolle spielt (diese Arbeit). Dies ist ein wesentlicher Unterschied zu dem auf die frühe Embryonalentwicklung von *Drosophila* beschränkten *screw*. Neben diesem Aspekt ergibt sich durch die offensichtlich in bestimmten Kontexten antagonistische Beziehung dieser beiden BMP auch ein qualitativer Unterschied zu *Drosophila*: *gbb* bestimmt als zweiter Ligand wesentlich Stärke und räumliche Präzision des *dpp*-Signals. Im Folgenden werden kurz die wichtigsten Aspekte der *dpp*-Funktionen in der Musterbildung von *Drosophila* zusammengefaßt. In der Beinimaginalscheibe sind derzeit nur Expressionsdaten von *gbb* verfügbar, während funktionelle Daten noch fehlen (Khalsa et al., 1998). Die Beteiligung von *gbb* bei der Extremitätenentwicklung von *Tribolium* ist jedoch evident. Bezüglich der molekularen Wechselwirkungen von *gbb* ist die Flügelimaginalscheibe von *Drosophila* derzeit das am besten untersuchte Modell. Für das Verständnis der bei *Tribolium*

weitaus vielfältigeren Rolle von *gbb* in der frühen Embryonalentwicklung bis hin zur Organogenese ist man daher auf einen Vergleich mit diesem System angewiesen.

Auch innerhalb des BMP-Projektes ergab sich eine gewisse Verschiebung des Schwerpunktes. Ausgangspunkt war zunächst die Rolle der BMP in der Beinentwicklung. Je mehr verschiedene ontogenetische Prozesse durch die Beteiligung von *gbb* in das Blickfeld rückten, um so mehr entwickelte sich die Betrachtung jedes einzelnen zur Fallstudie und um so mehr wurde die Interaktion der beiden BMP-Liganden Gbb und Dpp selbst zum Kernanliegen. Die Realisierung des Projektes wurde erst durch die Vorarbeiten von Mark Joseph Pincus in der Arbeitsgruppe um John Doctor, Pittsburgh möglich. Sie stellten großzügigerweise das von ihnen klonierte *gbb*-Fragment und ein Manuskript mit ersten Expressionsdaten zur Verfügung (Pincus et al., in Vorbereitung). Grundlegende Expressionsdaten von *dpp* in *Tribolium* wurden durch Sanchez-Salazar, Pletcher et al. (1996) und Chen, Handel et al. (2000) veröffentlicht.

1.3 Die TGF β -Proteinfamilie

Die TGF β -Proteine lassen sich aufgrund ihrer Struktur und Eigenheiten der Transduktion in zwei Gruppen unterteilen: die BMP/GDF/MIS-Subfamilie und die TGF β /Activin/Nodal-Subfamilie. Durch somatische Mutationen in TGF β -Genen oder entsprechenden downstream-Genen erlangt der TGF β -Signaltransduktionsweg humanmedizinische Bedeutung in der Carcinogenese. Insbesondere Rezeptoren und SMAD-Proteine scheinen hier Schlüsselrollen zu spielen. Darüber hinaus werden einige erbliche Erkrankungen mit genetischen Defekten dieses Signalweges assoziiert (Massague, 1990). Die TGF β -Proteine sind Liganden für membrangebundene Serin/Threonin-Kinasen. Die Proteine werden obligat als Dimer sezerniert, das durch hydrophobe Wechselwirkung und eine Disulfidbrücke zusammengehalten wird. Die Dimerisierung erfolgt im endoplasmatischen Reticulum. Insbesondere für BMP der Vertebraten ist gezeigt, daß Heterodimere zweier verschiedener BMP den funktionellen Liganden darstellen (Ray & Wharton, 2001a; Shimmi et al., 2005c). Die proteolytische Spaltung zum aktiven Liganden erfolgt durch Proteine der SPC/Furin-Familie (Constam & Robertson, 1999; Cui et al., 1998). Dieser Schritt stellt zugleich eine Kontrollebene des Signalweges dar (Cui et al., 2001). Die Aktivierung der Signaltransduktion durch BMP-Liganden verläuft über hochaffine Bindung an Typ-I-Rezeptoren. In *Drosophila* sind bisher Thickveins (Tkv) und Saxophone (Sax) als BMP-bindende Typ-I-Rezeptoren bekannt. Der dritte, Baboon (Babo) bindet Activin (Wrana et al.,

1994). Erst der durch die Ligandenbindung präformierte Komplex hat eine nennenswerte Affinität zu Typ-II-Rezeptoren, wie den aus *Drosophila* bekannten Punt (Put) (Letsou et al., 1995; Ruberte et al., 1995; Simin et al., 1998) und Wishful thinking (Wit) (Lee-Hoeflich et al., 2005). Im Typ-I-Typ-II-Rezeptortetramer aktiviert die Kinaseaktivität des Typ-II-Rezeptors die Kinase des Typ-I-Rezeptors. Deren direkte Substrate, die R-SMADs trimerisieren mit unterschiedlichen Co-SMADs. Sogenannte I-SMADs üben hier eine inhibierende Funktion aus. Nach Import in den Zellkern gibt es weitere Wechselwirkungen mit einer Reihe von Kofaktoren, welche die differentielle Transkription des Zielgens bewirken (Shi & Massague, 2003). Die Spezifität der Bindung zwischen R-SMAD und Typ-I-Rezeptor bestimmt die Art des weitergeleiteten Signals (Brummel et al., 1999; Chen et al., 1998b). Allein die Existenz alternativer Komponenten des Signalweges auf allen Ebenen ergibt durch unterschiedliche Kombination komplexe Regulationsmöglichkeiten und ermöglicht die Einbindung dieses Signalweges in sehr unterschiedliche Kontexte. Weiterhin gibt es klare Hinweise auf SMAD-unabhängige BMP-Signaltransduktion (Derynck & Zhang, 2003; Hassel et al., 2003; Itoh et al., 2003), dies trifft insbesondere auf BMP-2 zu (Nohe et al., 2002).

Ein Merkmal von TGF β -Proteinen sind 7 konservierte Cysteinreste, von denen einer, zusätzlich zu hydrophoben Wechselwirkungen, die Monomere zum biologisch aktiven, dimeren Liganden verbindet. Die anderen sechs bilden einen sogenannten Cysteinknoten.

Ein Vergleich unterschiedlicher *dpp*/BMP4-Proteine zeigt, daß die mature Domäne von *Tribolium*-Dpp eine signifikant niedrigere Homologie (63-67%) zu den Orthologen aus *Drosophila melanogaster*, *Schistocerca americana*, *Precis coenis* und *Homo sapiens* hat als letztere untereinander. Bemerkenswerterweise liegt dabei auch die Homologie der Insekten-Orthologen zu dem Wirbeltier-Orthologen mit 73-77% Übereinstimmung deutlich höher (Sanchez-Salazar et al., 1996). Sequenzähnlichkeit in der Prodomäne und andere charakteristische Primärstrukturmerkmale belegen jedoch eindeutig die Homologie des *Tribolium*-Gens zu *Dm*'*dpp*, HsBMP2 und HsBMP4. Ebenso ist die Position des Intron in der Prodomänensequenz konserviert.

Das von Pincus et al. (in Vorbereitung) aus *Tribolium* isolierte *glass bottom boat*/60A-Homologe läßt sich durch Sequenzvergleich der BMP-5,6,7,8-Gruppe zuordnen. Die Sequenzübereinstimmung der maturen Domäne mit der des humanen BMP5 ist mit 76% höher als die zu *Drosophila melanogaster* und *Drosophila virilis* mit 72%. Ähnlich hoch sind die Übereinstimmungen mit den humanen BMP6, -7 und -8. Auch mit dem Urochordaten-Homolog BMPa werden fast 60% erreicht. Ein wesentlicher Unterschied zu *Dm*'*gbb* sind die

4 Introns, die Tc'*gbb* mit den Wirbeltierhomologen BMP6, BMP7 und BMP8 gemeinsam hat (Pincus et al., in Vorbereitung). Den *Drosophila melanogaster*- und *Drosophila virilis*-Homologen fehlen Introns (Wharton et al., 1991).

1.4 Dpp als Morphogen

Das Morphogenkonzept geht auf Alan Turing (Turing, 1952) zurück. Morphogene breiten sich durch Diffusion von einer Quelle aus und legen damit einen Gradienten über ein Gewebe, vornehmlich über Epithelien (z.B. Lawrence, 1966b; Locke, 1959). In dem so erzeugten Feld ist an jedem Punkt die Position durch die lokale Konzentration des Morphogens und die Richtung durch das Gefälle des Gradienten definiert (Lawrence et al., 1972; Wolpert, 1969). Morphogene können als Teil selbstorganisierender Systeme in der biologischen Musterbildung die initiale Information für morphogenetische Prozesse liefern (Übersicht in Koch & Meinhardt, 1994; Meinhardt, 2001). Dementsprechend erzeugt der Gradient eine lokal konzentrationsabhängige Antwort der Zellen im Feld (Lawrence, 1966a). Morphogene aktivieren häufig Signaltransduktionswege oder sind selbst Transkriptionsfaktoren. Prominente Kandidatenmoleküle in *Drosophila* sind u. a. Bicoid (Bcd), Dorsal (Dl), Hedgehog (Hh), Wingless (Wg) und Dpp. In zellulären Systemen wirken Morphogene meist, aber möglicherweise nicht ausschließlich (s.u.) an der Zelloberfläche. Die Funktion der BMP als Morphogene setzt eine sehr präzise Regulation ihrer Sekretion an der Quelle, ihrer Ausbreitung im Gewebe oder ihrer Wirkung am Zielgewebe voraus, meist erfolgt eine Kontrolle auf all diesen Ebenen.

Morphogengradienten zeichnen sich häufig durch erhebliche Stabilität gegenüber Störungen aus (Robustheit, robustness, Eldar et al., 2002). Die molekularen und subzellulären Prozesse, die diese Eigenschaft begründen, sind wenig verstanden (Vincent & Dubois, 2002). Während es in der Flügelimaginalscheibe Schwierigkeiten bereitet, die Reichweite des Gradienten zu erklären, bereitet in der dorsoventralen Musterbildung eher der scharfe Konzentrationsgipfel über der Amnioserosa argumentative Schwierigkeiten, wenn man eine freie Diffusion der Liganden voraussetzt. Diese spielt bei der lumenalen Ausbreitung von Dpp von der Peripodialmembran zur Imaginalscheibe möglicherweise eine Rolle (Gibson et al., 2002). In diesem Zusammenhang wirkt Dpp zwar als Cytokin, wohl aber nicht als Morphogen im engeren Sinne. Gerade das Dilemma eine großen Reichweite des Gradienten und die limitierte Fähigkeit von Zellen einen beliebig flachen Morphogengradienten zu detektieren motiviert die Suche nach möglichen Mechanismen und Komponenten. Eine Exposition von

Dpp an der Epitheloberfläche läßt sich sowohl für die Flügelimaginalscheibe, wie für den *Drosophila*-Embryo belegen (Teleman & Cohen, 2000; Wang & Ferguson, 2005). Das alternative Konzept der planaren Transcytose (Entchev et al., 2000; Teleman & Cohen, 2000) betont die Bedeutung dynaminabhängiger Endocytose-Resekretions-Zyklen (Belenkaya et al., 2004), um die Reichweite zu erklären. Gerade der für die Transcytose-Hypothese wichtige Befund von Morphogen-Schatten hinter dynamin-defekten Klonen, könnte eventuell auch durch hohe Rezeptorkonzentrationen auf diesen Zellen erklärt werden, die als Ligandenfalle wirken. Die mathematische Modellierung dieser Prozesse wird ebenso kontrovers diskutiert wie die experimentelle Herangehensweise (Kruse et al., 2004; Lander et al., 2002; Merkin & Sleeman, 2005). Als vesikel-basierter, aber dynamin-unabhängiger Mechanismus wird die Bildung von sogenannte Argosomen, derzeit v.a. bei Wg-Morphogen-Transport diskutiert (Greco et al., 2001). Auch mehrten sich Hinweise auf eine spezifische und aktiv regulierte Beteiligung von Heparansulfat-Bestandteilen der extrazellulären Matrix (Fujise et al., 2003). Möglicherweise sind auch Zellfortsätze von Zielzellen zu Dpp-sezernierenden Zellen, sogenannte Cytonemen an der Dpp-Signalübertragung beteiligt (Akiyama-Oda & Oda, 2003; Ramirez-Weber & Kornberg, 1999) Es konnte gezeigt werden, daß der Rezeptor Tkv auf Cytonemen exprimiert ist und daß die Ausbildung von Cytonemen *dpp*-abhängig ist (Hsiung et al., 2005). Die auf diese Weise vermittelte *long range*-Aktivierung der BMP-Signaltransduktion liegt außerhalb des eigentlichen Morphogenkonzeptes. Auch bei der lumenalen Ausbreitung, sind spezielle Fortsätze der Zelloberfläche zumindest beteiligt (Gibson & Schubiger, 2000). Alle genannten Vorgänge können von Zellen aktiv beeinflusst werden und stellen damit weitere Kontrollebenen neben den cytosolischen Komponenten der BMP-Sinaltransduktion dar.

1.5 Ausgewählte ontogenetische Prozesse bei *Drosophila melanogaster* und *Tribolium castaneum*

1.5.1 Die Bildung der Dorsoventralachse des Embryos

An der Etablierung der Dorsoventralachse in *Drosophila* sind maternale und zygotische Faktoren beteiligt (zusammengefaßt in Roth, 2003). Zu den ersten asymmetrischen Ereignissen gehört die Bewegung des ursprünglich terminal gelegenen Oocytenkerns in eine dorsale Position. Wegen der begrenzten Diffusionsweite des Gurken-Proteins, wird nur in dorsalen Follikelzellen der EGFR-Signalweg aktiviert. Ventrale Follikelzellen hingegen, in

denen keine solche Aktivierung erfolgen kann, sezernieren Faktoren, die im abgelegten Ei eine Kaskade von proteolytischen Aktivierungsreaktionen über den perivitellinen Spalt hinweg in Gang setzen. Resultat ist ein Konzentrationsgradient von Spätzle entlang der Oozytenmembran von ventral nach dorsal (Morisato & Anderson, 1994), wobei eine negative feedback-Kontrolle aus dem Ei (Misra et al., 1998), sowie die hohe Konzentration des Toll-Rezeptors die Form des Gradienten bestimmen. Dieses dorsoventral asymmetrische Signal wird über Aktivierung des Toll-Rezeptors und Translokation des Dorsal-Proteins in die Kerne des Präblastoderms übertragen (Roth et al., 1989; Rushlow et al., 1989; Steward, 1989). Mit dem resultierenden Gradienten nucleären Dorsalproteins ist im Ei eine dorsoventrale Polarität etabliert. In der Folge determiniert die von Dorsal kontrollierte Transkription von Targetgenen Zellschicksale entlang der DV-Achse (Ray et al., 1991). Eines dieser Targetgene, *dpp*, wird von einem unbekanntem Faktor aktiviert und von Dorsal negativ reguliert (Huang et al., 1993). Zur Übersicht über Expressionsdomänen und Anlagenplan siehe Abb. 2.

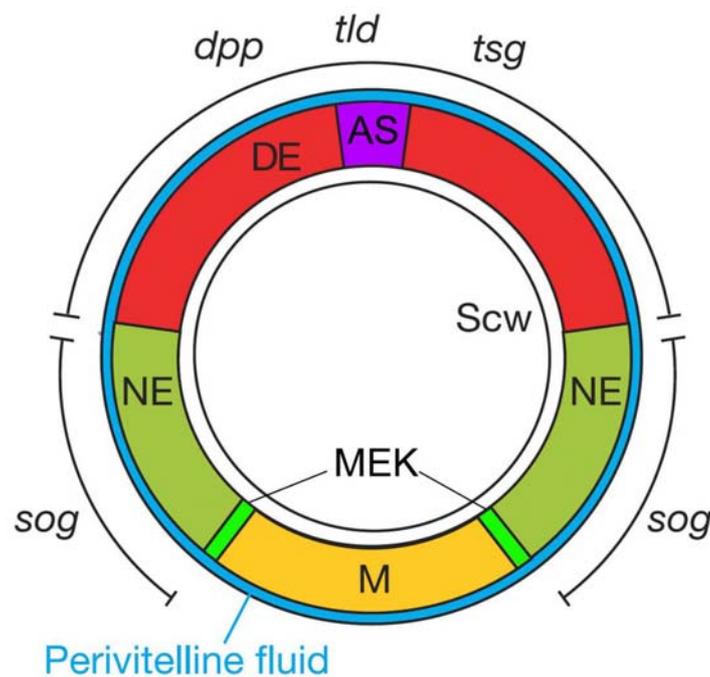


Abb. 2: Dorsoventrale Musterbildung. Schematischer Anlagenplan des *Drosophila*-Embryos (Transversalschnitt) mit den Expressionsdomänen der an der Etablierung des BMP-Aktivitäts-Gradienten beteiligten Gene. Details im Text. DE: dorsales Ektoderm; AS: Amnioserosa; NE: Neuroektoderm; ME Mesektoderm; M: Mesoderm. Verändert aus (Eldar et al., 2002)

Die differentielle Aktivierung des BMP-Signalweges durch den resultierenden dorsalen Dpp-Gradienten determiniert in Kombination mit dem neuroektodermal exprimierten Repressor *brinker* (*brk*) mindestens drei Aktivierungsschwellen für *dpp*-Targetgene (Ashe et al., 2000; Sutherland et al., 2003). Hierdurch werden dorsale Zellschicksale in die Anlagen von Amnioserosa und dorsalem Ektoderm unterteilt. Der erforderliche steile Dpp-Gradient wird durch die Interaktion der Proteine Screw (*Scw*), Short Gastrulation (*Sog*), Twisted gastrulation (*Tsg*), Tolloid (*Tld*) und Dpp (Marques et al., 1997) sowie der BMP-Rezeptoren Saxophone (*Sax*, Typ I), Thickveins (*Tkv*, Typ I) und Punt (*Put*, Typ II) etabliert. Nur die Gene *sog*, *tsg*, *tld* und *dpp* werden asymmetrisch exprimiert: *sog* im ventralen Ektoderm, *tsg* als anteriore Kappe und in einem schmalen Streifen dorsaler Zellen (Mason et al., 1994), *tld* (Kirov et al., 1994; Shimell et al., 1991) und *dpp* in einer größeren Domäne der dorsalen 40% des Eiumfangs (St Johnston & Gelbart, 1987). Obwohl es unbestritten ist, daß der Ligand Screw in der dorsoventralen Musterbildung von *Drosophila* eine obligate Funktion erfüllt (Dorfman & Shilo, 2001), sind Details, wie er zur differentiellen Aktivierung des BMP-Signalweges beiträgt, noch nicht völlig klar. Insbesondere die Relevanz von Heterodimeren mit Dpp (Arora et al., 1994) wird kontrovers diskutiert (Neul & Ferguson, 1998; Nguyen et al., 1998a; Shimmi et al., 2005c; Wang & Ferguson, 2005). Die Bedeutung von BMP-Heterodimeren wird durch Befunde aus Vertebraten gestützt (Nishimatsu & Thomsen, 1998; Schmid et al., 2000; Zhu et al., 2004). Aufgrund der überlappenden Expression von Screw und Dpp kann die Existenz von Heterodimeren als nahezu sicher gelten (Arora et al., 1994; Gray & Mason, 1990). Theoretisch ist auch eine Internalisierung von Homodimeren und eine Isomerisierung zu Heterodimeren denkbar (Entchev et al., 2000; Shimmi et al., 2005c). Weiterhin aktivieren Heterodimere die Signaltransduktion weitaus effektiver (Aono et al., 1995; Shimmi et al., 2005c; Suzuki et al., 1997). Dpp-Scw-Heterodimere haben auch eine höhere Sog-Affinität als Dpp-Homodimere und Scw-Homodimere (Shimmi et al., 2005c). Darüber hinaus würden um Sog-Tsg-Transportkomplexe konkurrierende Screw-Homodimere die Robustheit eines Dpp-Homodimergradienten herabsetzen. Wahrscheinlich kommt es dabei zur Bildung eines quarternären, leicht diffusiblen Komplexes [Scw-Dpp/Sog/Tsg] (Ashe & Levine, 1999; Decotto & Ferguson, 2001; Shimmi & O'Connor, 2003), der die Rezeptorbindung der BMP-Liganden am Ort ihrer Sekretion verhindert (Holley et al., 1996). Aus dem Komplex würde dann lokal, durch proteolytische Spaltung durch das BMP1-Homolog Tolloid, der dimere Ligand frei gesetzt werden (Marques et al., 1997; Shimmi & O'Connor, 2003). Der erzeugte Nettoflux für die Rezeptorbindung verfügbarer Liganden führt so zu einem eng lokalisierten BMP-Signal in den äußerst dorsal gelegenen Bereichen (7-9

Zellen breit, O'Connor et al., 2006; Shimmi et al., 2005c). Zusätzlich wird durch einen Dynamamin-abhängigen Mechanismus (*shibire*) aktives Sog in der dorsalen Region aus dem extrazellulären Raum entfernt (Srinivasan et al., 2002). Die Beweglichkeit des Komplexes und der „source-sink“-Mechanismus könnten die steile Form des Aktivierungsgradienten erklären, die für die Determinierung der Amnioserosa sorgt (Rushlow et al., 2001). Ein weiterer Mechanismus, der die Form des dorsalen BMP-Signales bedingt ist ein positives feedback durch die Dpp-Rezeptorbindung. Dieser feedback-Mechanismus führt zu einer Sensibilisierung bereits durch Dpp aktivierter Zellen gegenüber dem Dpp-Signal, und hat damit einen stabilisierenden Effekt. Über welche *dpp*-Targetgene dieser Effekt zustande kommt ist noch unklar, offensichtlich ist das SMAD-Protein Medea daran beteiligt (Wang & Ferguson, 2005). Es konnte belegt werden, daß dieser Effekt nicht auf einer vermehrten Freisetzung von Dpp aus Sog-Komplexen durch eine transkriptionellen Aktivierung von *tld* beruht (Wang & Ferguson, 2005). Die BMP-aktivierte Expression eines Membran-assoziierten BMP-bindenden Proteins, das die Ligand-Rezeptor-Bindung fördert (siehe Abb. 3) – in Analogie zu Cv-2 in der Flügeladerentwicklung (siehe unten) – wird diskutiert (O'Connor et al., 2006). Im dorsalen Ektoderm könnten Homodimere von Dpp und Scw eine schwächere Aktivierung gewährleisten und neurogene Faktoren unterdrücken (Abb. 4) (Ashe, 2005; O'Connor et al., 2006).

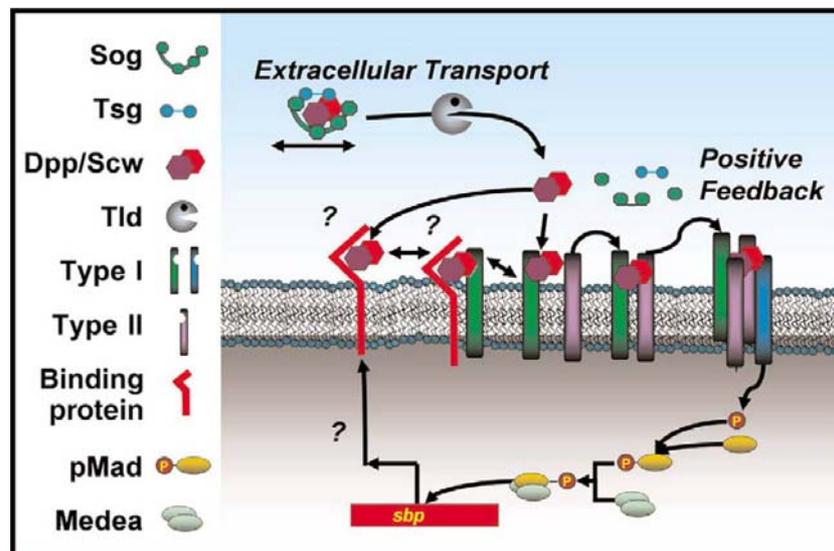


Abb. 3: Hypothetische Beteiligung eines BMP-bindenden Proteins bei der Sensibilisierung dorsaler Zellen für erneute BMP-Aktivierung bei der dorsoventralen Musterbildung des *Drosophila*-Embryos. Die BMP-aktivierte Transkription eines BMP-bindenden Proteins (*sbp*, binding protein) könnte eine positive Rückkopplungsschleife bilden. Das membran-assoziierte Protein präsentiert den Liganden dem Rezeptor und sensibilisiert so die Zelle gegenüber dem BMP-Signal. Das Protein ist nicht notwendigerweise ein integrales Membranprotein wie hier gezeigt. (aus O'Connor et al., 2006)

Der ersten Aktivierungsphase des BMP-Signalweges im Blastoderm folgt eine zweite Phase der *dpp*-Expression während der Streckung des Keimstreifs mit einer Aktivierung im gesamten dorsalen Ektoderm bis zur Grenze des Neuroektoderms. Da diese unabhängig von *sog* und *scw* (Dorfman & Shilo, 2001) ist, spielen wohl auch hier Dpp-Homodimere die maßgebliche Rolle. In dieser zweiten Phase ist *dpp* zusammen mit *brk* maßgeblich an der Musterbildung der Anlagen des peripheren Nervensystems beteiligt (Rusten et al., 2002). Weitere offene Fragen betreffen die Rolle des Typ-I-Rezeptors Saxophone. Während eindeutig Thickveins die Transduktion des BMP-Signals dominiert, kommt Saxophone wohl eher eine synergistische Funktion zu (Neul & Ferguson, 1998). In vitro-Daten, nach denen Sax bei Scw- und Gbb-Signalen vorwiegend die Mad-Phosphorylierung vermittelt (Shimmi & O'Connor, 2003) stehen teilweise in Widerspruch zu den in vivo-Daten. Auch für die Rezeptoren sind Bindungspräferenzen bekannt: so bindet Saxophone eher Scw und Gbb, Tkv hingegen Dpp mit höherer Affinität. Daß der bereits in diesem Stadium der *Drosophila*-Embryogenese flächig auf niedrigem Niveau exprimierte dritte BMP-Ligand Gbb an der BMP-Signalübertragung beteiligt ist, ist eher unwahrscheinlich (Doctor et al., 1992; Neul & Ferguson, 1998). Auf welcher Ebene die Aktivierung von Sax und Tkv konvergiert ist unklar: die Bildung eines tetrameren Rezeptor-Komplexes Sax-Put-Put-Tkv wird ebenso diskutiert, wie unterschiedliche Phosphorylierungsstellen an Mad oder die Beteiligung alternativer SMAD-Proteine. Die synergistische Wirkung von Sax und Tkv, und die höhere Effizienz der Rezeptorbindung durch Dpp-Scw-Heterodimere, könnte durch eine effektivere Signaltransduktion durch Sax-Put-Put-Tkv- gegenüber Tkv-Put- oder Sax-Put-Tetramere bedingt sein. In letzter Zeit gibt es auch Befunde zum inhibitorischen Einfluß der Signaltransduktion über Saxophone. Diese stammen jedoch aus Untersuchungen in Flügelimaginalscheiben und der Aktivierung durch Gbb. Die oben erwähnte positive feedback-Schleife durch die Dpp-Rezeptorbindung beeinflusst direkt den Rezeptor und ist nicht zu verwechseln mit der Autoaktivierung der *dpp*-Transkription (Biehs et al., 1996). In *Xenopus laevis* und *Danio rerio* ist eine positive Rückkopplung auf die eigene Transkription ein essentieller Mechanismus bei der dorsoventralen Musterbildung durch BMP4/Swirl (Fainsod et al., 1994; Hammerschmidt et al., 1996; Nguyen et al., 1998b). Gerade die Autoaktivierung könnte ein phylogenetisch konserviertes Merkmal der *dpp*-Expression und von wesentlicher Bedeutung bei der dorsoventralen Musterbildung in *Tribolium* sein. In *Drosophila* führt dieser feedback-Mechanismus unter experimentellen Bedingungen zu einer Expansion der *dpp*-Expression in laterale neuroektodermale Regionen, wenn er nicht seinerseits durch *sog* kontrolliert wird, eine zusätzliche *short range*-Funktion dieses Gens. In

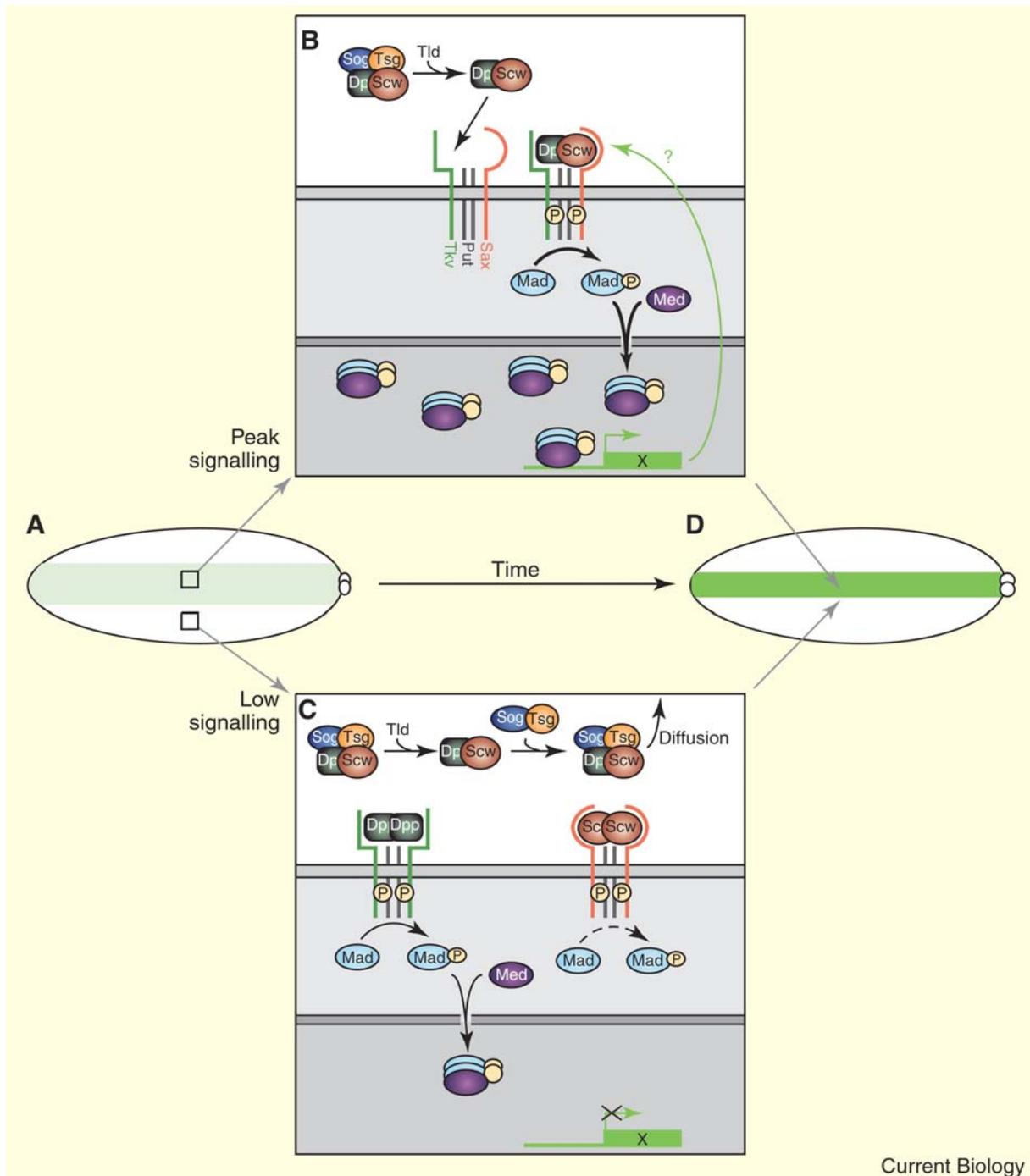
die gleiche Richtung wirkt der dem Dpp-Gradienten gegenläufige Brinker-Gradient (Ashe et al., 2000; Jazwinska et al., 1999b). Analog den Verhältnissen in der Flügelimaginalscheibe werden BMP-Targetgene konzentrationsabhängig von Brinker reprimiert (Rushlow et al., 2001), ebenso wie *dpp* selbst (Jazwinska et al., 1999a). Eine Rückkopplungsschleife trägt dabei zu der außerordentlich feinen Regulation auf transkriptionaler Ebene bei. Brinker selbst ist ein Targetgen des BMP-Signalweges (Jazwinska et al., 1999a; Muller et al., 2003).

Über aktivierende Einflüsse upstream der BMP-Transkription ist wenig bekannt (Huang et al., 1993): der transkriptionelle Ko-Regulator *nejire*/dCBP agiert sowohl upstream wie auch downstream des BMP-Signalweges und die Expression von *tsg*, *tld* und *scw*, allesamt Agonisten der *long range*-Aktivierung, ist direkt von *nejire* /dCBP abhängig (Lilja et al., 2003).

Etliche Orthologe von Schlüsselgenen der dorsoventralen Musterbildung konnten in *Tribolium* bereits charakterisiert werden (Basal, 2003; Chen et al., 2000; Kalscheuer, 2004; Maxton-Küchenmeister et al., 1999; Mikulski, 2004). Ein Vergleich der aus *Drosophila* und *Tribolium* bekannten Daten macht deutlich, daß zwar Komponenten des Toll-rel/NF- κ B-Signalweges konserviert sind, daß ihre Regulation jedoch Unterschiede aufweist. Im Gegensatz zu *Drosophila* ist bei *Tribolium* schon der Toll-Rezeptor ventral exprimiert. Dies ist möglicherweise Folge eines direkten positiven feedback der lokalisierten Dorsal-Aktivität (Maxton-Küchenmeister et al., 1999). Ein solches System wäre auch gegenüber sehr schwachen äußeren bzw. maternalen Signalen empfindlich und die Selbstverstärkung könnte in Verbindung mit lateraler Inhibition einen robusten Dorsal-Gradienten erzeugen. Die hohe Rezeptordichte um einen aktivierten Kernbereich würde die Reichweite des diffusiblen Liganden einschränken (Chen et al., 2000). Geringste Veränderungen in der gleichmäßigen Verteilung eines Liganden könnten diesen Musterbildungsprozess an jeder beliebigen Stelle der Eiumfangs auslösen. Dies könnte auch Ergebnisse früherer Ligationsexperimente erklären, in denen Embryonenfragmente offensichtlich regulativ neue DV-Achsen etablieren können.

Obwohl bekannt ist, daß der Oocytenkern sich in *Tribolium* ebenfalls in eine dorsale Position bringt (Roth, 2003), konnte bisher keinerlei Reaktion des Follikelepithels nachgewiesen werden. Auch *gurken*-Homologe konnten außerhalb der Drosophilidae nicht nach gewiesen werden (Roth, 2003). Neben diesen Abweichungen bei der Etablierung des Dorsalgradienten ist auch die Kontrolle der Targetgene von Dorsal von anderer Qualität. Im Falle von *twist*, das auch in *Tribolium* Mesoderm markiert, scheint Dorsal nur für die Initiation der Expression benötigt zu werden, während schon im späten Blastoderm die *twist*-Expression von Dorsal entkoppelt zu werden scheint. Die *Tribolium*-Homologen der dorsalen

Determinanten in *Drosophila*, *zerknüllt* (*zen*) und *dpp* sind, da sie im frühen Blastoderm als anteriore Kappen exprimiert werden, zumindest transient im ventralen Bereich hoher Konzentrationen nucleären Dorsals exprimiert. Die *zen*-Domäne zieht sich später aus diesem Bereich zurück (Chen et al., 2000; van der Zee et al., 2005). Den bisher publizierten Befunden nach zieht sich die *dpp*-Domäne anterior größtenteils zurück, behält jedoch gerade ihre maximale AP-Ausdehnung in der Domäne nucleären Dorsals. Diese Konstellation bleibt auch nach dem Verschwinden des nucleären Dorsalgradienten im Keimrudiment bestehen, da dieser anterior an der Serosagrenze noch persistiert (Chen et al., 2000). Das in der Serosa dann mit *dpp* koexprimierte Dorsal bleibt größtenteils cytoplasmatisch. Etwa zeitgleich mit dem Auftreten der Serosa-Expression von *dorsal* und dem Zurückziehen der *twist*-Domäne vom anterioren Pol löst sich die ausgedehnte anteroventrale Koexpression von *dpp* und *twist* auf. Diese Befunde deuten auf eine zumindest zeitweise positive Kontrolle von *dpp* durch Dorsal hin – direkt oder indirekt. Es finden sich zwei Dorsal-consensus-Bindungsstellen im *Tc'dpp*-Locus (Sanchez-Salazar et al., 1996). Damit besteht die Möglichkeit, daß die dorsoventrale Musterbildung, soweit sie durch *dpp* vermittelt wird, zwar durch den nucleären Dorsal-Gradienten initiiert wird, aber in der Folge über *twist* und die Mesodermbildung vorangetrieben wird (Chen et al., 2000). Eine zweite, zunächst sehr schwache *dpp*-Expression findet sich am posterioren Pol (Chen et al., 2000). Diese terminale Expression ist aufgrund ihres kleineren Durchmessers eher scheiben- als kappenförmig. Eine ähnliche Expression findet sich auch in *Drosophila*. Für beide polaren *dpp*-Expressionen ist wahrscheinlich, daß sie zumindest transient durch das terminale System kontrolliert werden (Casanova, 1991; Huang et al., 1997; Rusch & Levine, 1994; Schröder et al., 2000). Während die Entwicklung der prominenten anterioren *dpp*-Domäne relativ leicht zu verfolgen ist, bleibt das Schicksal der posterioren Domäne zunächst unklar. In der vorliegenden Arbeit wird ihre weitere Entwicklung und der Zusammenhang zu den randlichen *dpp*-Domänen, die das dorsale Ektoderm des Keimstreifs determinieren, gezeigt.



Current Biology

Abb. 4: Dorsoventrale Musterbildung. Modell der an der Etablierung des BMP-Aktivierungsgradienten des *Drosophila*-Embryos beteiligten Prozesse (aus Ashe, 2005): **A**: frühe Phase der *scw*-abhängigen Etablierung eines BMP-Aktivitäts-Gradienten vor Abschluß der Zellularisierung, grün: Signalweg-Aktivierung **B**: hypothetische molekulare Prozesse im Bereich des Aktivierungsmaximums in der Amnioserosa-Anlage; Scw-Dpp-Heterodimere werden in einem quarternären Komplex mit Sog und Tsg zur dorsalen Mittellinie transportiert und binden tetramere Tkv-Put-Sax-Rezeptorkomplexe, Aktivierung führt zu positiver Rückkopplung. **C**: molekulare Prozesse im dorsalen Ektoderm mit niedriger Aktivierungsstärke der BMP-Signaltransduktion; homodimere Liganden mit geringerer Affinität zum quarternären Transportkomplex verbleiben im dorsalen Ektoderm und aktivieren Sax-Put- und Tkv-Put-Rezeptorkomplexe; die unbekannte Komponente X der feedback-Schleife wird nicht transkribiert. **D**: Embryo vor Gastrulation: Ligandentransport und positive Rückkopplung fokussieren das Aktivierungsmaximum über der dorsalen Mittellinie, grün: Signalweg-Aktivierung. X: unbekannter Faktor, der die positive Rückkopplung auf Rezeptorebene vermittelt, siehe auch Abb. 3.

1.5.2 Aspekte der Extremitätenentwicklung in *Drosophila* und *Tribolium*

Die Anlagen von Bein- und Flügelimaginalscheiben, sowie des larvalen Keilin-Organs entstehen in *Drosophila* zusammen als thorakale Gliedmaßen-Primordien. Dabei umfaßt das Primordium sowohl Zellen des ventrolateralen Ektoderm, wie auch des Neuroektoderm (Bolinger & Boekhoff-Falk, 2005). Als einer der ersten molekularen Marker wird *Distal-less* (Cohen et al., 1989) von Wingless, Buttonhead und Sp1 aktiviert (Estella et al., 2003; Kubota et al., 2003; Wimmer et al., 1996). Die dorsoventrale Positionierung der *Dll*-Domäne erfolgt durch Wg, sowie Repression von dorsal durch den Dpp-Signalweg und Repression von ventral durch den EGF-Signalweg. Dabei ist offen, ob die repressive Wirkung des Dpp ausschließlich über Restriktion der *wg*-Domäne oder auch direkter über Repression von *btd* oder *Dll* vermittelt wird (Estella et al., 2003). Imaginalscheiben entwickeln sich auch in *Dll*-Mutanten, daher ist die genaue Funktion von *Dll* bei der Anlage der Imaginalscheibe noch unklar. Nicht alle Zellen der imaginalen Anlage exprimieren *Dll*, dennoch ist die Entwicklung der ventralen Extremität direkt von der *Dll*-Expression abhängig (Gorfinkiel et al., 1997). Die Aufteilung in anteriores und posteriores Kompartiment ist durch die Lage des Primordiums über der Parasegmentgrenze bedingt (Cohen, 1990). *Engrailed (en)* liefert gleichzeitig die Information für die Festlegung der AP-Achse. Im imaginalen Teil des Primordiums wird zeitgleich mit dem Verschwinden der *Dll*-Expression *escargot* exprimiert. Es reprimiert proneurale Schicksale (Hayashi et al., 1993) und determiniert zusammen mit *snail* die Flügelanlage (Fuse et al., 1996). Mit Beginn der Segregation von Bein- und Flügelscheibe, beginnt letztere *vestigial* zu exprimieren. Schon bei der Determinierung der Imaginalgewebe ist auch der Notchsignalweg an der Aktivierung von Kontrollgenen wie *Dll* und *vestigial* beteiligt (Kurata et al., 2000). Auch die Determination von Flügel- versus Beinschicksalen wird möglicherweise durch den relativen Einfluß des dorsalen Dpp- und ventralen EGF-Signals bestimmt (Goto & Hayashi, 1997; Kubota et al., 2000). Über den genauen Anlagenplan im Primordium gibt es verschiedene Konzepte. Einerseits könnten die Vorläuferzellen gemäß ihrer späteren Position dorsoventral streng sequentiell angeordnet sein, wobei dann intermediär liegende prospektiv proximale Vorläufer die distalen Schicksale durch Migration ventral umfassen würden (Goto & Hayashi, 1997). Andererseits könnte ein distaler Organisator proximale Zellen rekrutieren (Campbell & Tomlinson, 1995). Neuere Untersuchungen liefern Hinweise, daß – im Gegensatz zur Flügelanlage – die gesamte Beinanlage innerhalb des Primordiums vollständig dem Neuroektoderm entstammt. Proximale

Schicksale liegen dabei äußerst ventral, distale Schicksale bilden einen geschlossenen Ring um die Anlage des Keilin-Organs (Bolinger & Boekhoff-Falk, 2005).

Im Laufe der larvalen Entwicklung werden intermediäre Schicksale interkalierend gebildet. Molekularer Marker zu Beginn dieses Prozesses ist *dachshund* (Lecuit & Cohen, 1997; Mardon et al., 1994). Schlüsselereignisse der Musterbildung in der Beinimaginalscheibe geschehen etwa zeitgleich mit Vollzug des Rückenschlusses. Bei der Etablierung der DV-Achse der Beinscheibe sezernieren Zellen des posterioren Kompartiment ein Hedgehog-Signal über die AP-Grenze hinaus, das ventral *wg* und dorsal *dpp* induziert (Basler & Struhl, 1994). Durch diese beiden Morphogene wird anschließend die PD-Achse determiniert, indem ihre überlappenden Gradienten konzentrische Ringe verschiedener instruktiver Konzentrationskombinationen bilden. Innerhalb eines Rings sind zwar die relativen Konzentrationen der Morphogene verschieden, in Kombination bestimmen sie aber identische proximodistale Positionsinformation (Lecuit & Cohen, 1997). Durch Schwellenwerte werden scharf begrenzte, ringförmige Domänen der Targetgene festgelegt, die zunächst durch gegenseitige Repression aufrechterhalten werden. Äußerst distale Schicksale liegen dabei zentral. Durch die beiden Morphogene werden in proximodistaler Sequenz die Transkriptionsfaktoren *homothorax* (*hth*), *dachshund* (*dac*) und *Dll* in Form breiter Domänen aktiviert (Abu-Shaar & Mann, 1998; Diaz-Benjumea et al., 1994; Dong et al., 2001; Wu & Cohen, 1999). Die Determination proximaler Schicksale durch *homothorax* (*hth*) erfordert den ubiquitär in der Beinanlage exprimierten Homoeobox-Faktor Exd. Dabei bewirkt Hth die Stabilisation und Kernlokalisation von Exd (Gonzalez-Crespo et al., 1998; Gonzalez-Crespo & Morata, 1996; Pai et al., 1998; Rieckhof et al., 1997). Damit wird die proximale Positionsinformation durch den Ausschluß der *hth*-Expression aus distalen Anlagen durch *Antennapedia* (*Antp*) und das Wg+Dpp-System erzeugt (Casares & Mann, 1998; Wu & Cohen, 1999). Erst im späteren dritten Larvalstadium kommt es zur Überlappung der Domänen dieser Bein-Gap Gene und zur Ausbildung einer proximalen *Dll*-Domäne de novo in der Anlage des prospektiven Tochanter (Abu-Shaar & Mann, 1998; Wu & Cohen, 1999). Die distale *Dll*-Domäne wird schließlich unabhängig von der Aktivierung durch die Morphogene (Galindo et al., 2002). Wachstum und eine progrediente Untergliederung der Anlagen intermediärer Schicksale erfolgt durch die Bein-Gap-Gene während der spät larvalen bzw. pupalen Entwicklung (Rauskolb, 2001). Die Kombination unterschiedlicher Faktoren auf dieser Ebene führt wiederum zur lokalen Aktivierung des Notch-Signalwegs in engumschriebenen Zonen (de Celis et al., 1998; Galindo et al., 2005; Rauskolb, 2001). Schlüsselrollen spielen hier die Glycosyltransferase Fringe und der Notch-Ligand Serrate

(Bruckner et al., 2000). Die iterative Aktivierung des Notchrezeptors entlang der PD-Achse korreliert unmittelbar mit der Ausbildung von Gelenken bzw. Festlegung von Podomergrenzen (Irvine & Rauskolb, 2001). Die Targetgene des Notchsignalweges, Gene der *enhancer of split/hairy*-Gruppe, und Gene der *odd-skipped* Familie (Hao et al., 2003) fungieren unmittelbar in den histologischen Veränderungen an der Podomergrenze zur Gelenkbildung (Mirth & Akam, 2002; Pilot & Lecuit, 2005).

Die dritte, dorsoventrale Achse wird in der Beinimaginalscheibe ebenfalls durch die dorsoventral asymmetrische Expression von *wg* und *dpp* definiert. Die Gene *omb* und *H15/bifid* werden in *Drosophila* durch *dpp* bzw. *wg* kontrolliert (Brook & Cohen, 1996) und determinieren dorsale bzw. ventrale Schicksale in der Imaginalscheibe (Maves & Schubiger, 1998; Wilder & Perrimon, 1995).

In *Tribolium* sind Orthologe vieler Schlüsselgene der Extremitätenentwicklung charakterisiert und viele scheinen in ihrer Funktion konserviert zu sein. Die Initiation der Extremitätenanlagen erfolgt in *Tribolium* während der Entstehung des letzten thorakalen und ersten abdominalen Segmentes. Die Anlagen der Gliedmaßen treten als Zellcluster auf, die das Gen *Dll* (Beermann et al., 2001) exprimieren. Die beiden Segmentpolaritätsgene *wingless* und *engrailed* sind ähnlich wie bei *Drosophila* am hinteren Rand der Segmente exprimiert (Nagy & Carroll, 1994). Die *wingless*-Streifen – ursprünglich über die gesamte Dorsoventralausdehnung des Embryos exprimiert – sind zu diesem Zeitpunkt wohl durch die inhibitorische Wirkung des Dpp-Proteins bereits bis zum Neuroektoderm zurückgedrängt. Nur am dorsalen Ende der *wg*-Streifen kommt es zur Expression von *Dll*, wahrscheinlich u.a. durch die aktivierende Wirkung von *wg* selbst (Giorgianni, 2004; Jockusch & Ober, 2004). Ebenso wie in *Drosophila* ist dabei die Art und Weise der Beteiligung von *dpp* unklar, sofern sie über die Restriktion der *wg*-Domänen hinaus geht. Als bald wachsen die gnathalen und thorakalen Extremitätenanlagen zu dreidimensional-zylindrischen Knospen aus, in denen die Musterbildung und Etablierung der proximodistalen und dorsoventralen Achse erfolgt. Im Unterschied zu den larvalen zweidimensionalen Extremitätenanlagen von *Drosophila* erfordert diese Topologie, daß eines der beiden proximodistal wirksamen Morphogene ausschließlich distal exprimiert wird (Prpic et al., 2003) ; siehe Abb. 5. Tatsächlich wird *dpp* als nach dorsal verschobene, distale Kappe und nicht als dorsaler Streifen exprimiert (Sanchez-Salazar et al., 1996). Dieses Expressionsmuster erweist sich in Grundzügen in vielen bisher untersuchten Arthropoden mit dreidimensionalen Beinanlagen konserviert (Angelini & Kaufman, 2005; Giorgianni & Patel, 2004; Jockusch et al., 2000; Niwa et al., 2000; Prpic, 2004a).

Dennoch zeigt die Divergenz der untersuchten Arthropoden bezüglich der Proximalausdehnung der *dpp*-Domäne auf der Dorsalseite der Beinknospen eine gewisse Diskrepanz zu der Forderung eines distalen Morphogens. So sind in *Schistocerca*, *Gryllus* und *Glomeris* weder ringförmige Bein-Gap-Gen-Domänen, noch symmetrisch kappenförmige Domänen durch das *dpp*-Expressionsmuster direkt zu erklären (Jockusch et al., 2000; Niwa et al., 2000; Prpic, 2004a).

Die Bein-Gap-Gen-Expressionen als ringförmige bzw. bei *Dll* als kappenförmige Domänen entlang der PD-Achse sind bei *Tribolium* und anderen Arthropoden im Wesentlichen konserviert. Allerdings zeigen sich bezüglich ihrer Genese und den Details ihrer relativen Lagebeziehung signifikante Unterschiede (Prpic et al., 2003). So entsteht die *dac*-Domäne bei *Tribolium* innerhalb der *Dll*-Domäne und teilt diese in einen proximalen und distalen Teil (Prpic et al., 2001). Während die Komponenten der an der Extremitätenentwicklung beteiligten Kaskaden weitgehend konserviert erscheinen, gibt es bezüglich der Regulation der downstream-Gene durch die Morphogengradienten und deren regulativer Verknüpfung untereinander erhebliche Divergenz innerhalb der Arthropoden (Abzhanov & Kaufman, 2000; Prpic et al., 2003; Prpic & Tautz, 2003) und auch innerhalb der Hexapoda (Angelini & Kaufman, 2004; Inoue et al., 2002; Jockusch et al., 2000; Jockusch et al., 2004). Die Rekrutierung des *Wg+Dpp*-Systems zur Etablierung der PD-Achse ist möglicherweise nicht per se in allen Insekten konserviert. Ergebnisse aus RNAi-Experimenten bei *Oncopeltus* stellen eine direkte Beteiligung von *wg* generell in Frage, insbesondere bei der Aktivierung von *Dll* und *dac*. Bemerkenswerterweise findet sich hier eine stärkere, wenn auch indirekte, Beteiligung von *engrailed* bei der Achsenbildung (Angelini & Kaufman, 2005). Auch die Rolle der bei *Drosophila* an der dorsoventralen Determination beteiligten Gene *omb* und *H15/bifid* ist fraglich. Erscheint die Expression von *omb* als dorsaler Marker noch konserviert, so fungiert *H15/bifid* offenbar nicht als Determinante für ventrale Schicksale, zumal hier Paraloge mit unterschiedlichen Expressionsmustern existieren (Prpic et al., 2005; Prpic et al., 2003). Neben den offenen Fragen bezüglich der *dpp*-Funktion in Initiation und DV-Achsenbildung ist die Rolle von *dpp* in der späteren Beinentwicklung völlig unklar. Wegen der in späteren Stadien ringförmigen *dpp*-Expression in *Tribolium* und anderen Arthropoden könnte es an der Beinsegmentierung und Gelenkbildung beteiligt sein. Andere Autoren halten eine späte Rolle von *dpp* in der Beinentwicklung für untergeordnet (Jockusch & Ober, 2004). Anders als in *Drosophila* könnte die regulative Verknüpfung zwischen den Morphogenen und *Dll* in *Tribolium* reziproker Natur sein (J. Scholten, unveröffentl.).

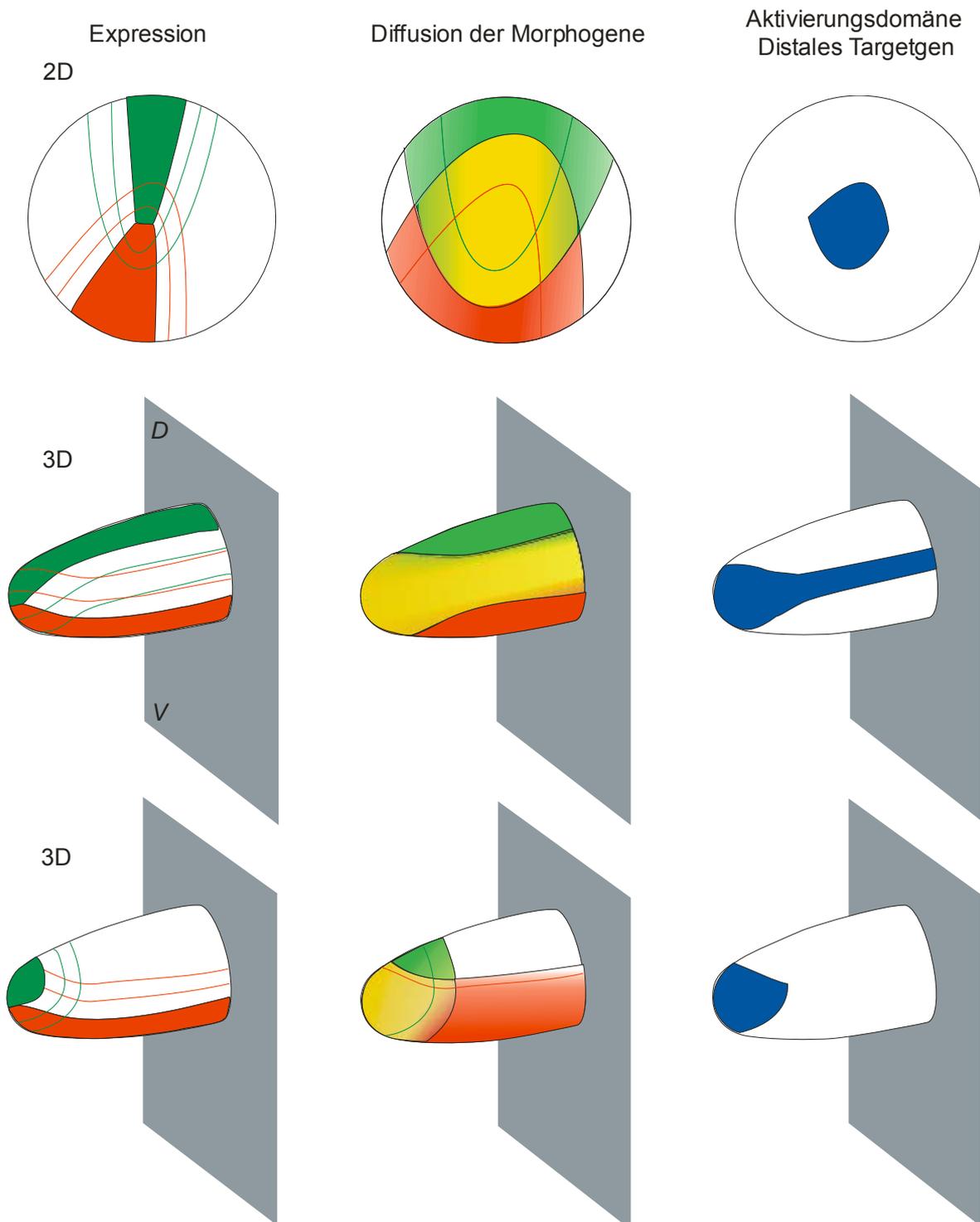


Abb. 5: Proximodistale Musterbildung durch *dpp* und *wg* (nach Prpic et al., 2003): erste Spalte, Expressionsmuster, zweite Spalte, Verteilung der Morphogene, Koexistenzgebiet beider Morphogene (gelb); dritte Spalte, aus den kombinierten Morphogen-Konzentrationen sich ergebende Aktivierung des Targetgens innerhalb bestimmter Schwellenwertlinien; **erste Zeile**, Verhältnisse in der zweidimensionalen Beinimaginalscheibe von *Drosophila*; **zweite Zeile**, direkte Projektion der Verhältnisse aus *Drosophila* auf eine dreidimensionale Beinanlage: die Expressionsdomäne des distalen Targetgens (blau) wurde durch die proximodistal gestreckte Zone instruktiver Konzentrationskombinationen der Morphogene *Dpp* und *Wg* fehlexprimiert; **dritte Zeile**, Expressionsverhältnisse in *Tribolium* und die hypothetische Wirkung des „kombinatorischen Morphogens“ [*Dpp*+*Wg*] auf die Targetgenexpression. grün, *dpp*; rot, *wg*

1.5.3 Die Flügelentwicklung von *Drosophila melanogaster* als Modell für die Interaktion zweier BMP-Liganden

BMP-Signaltransduktion ist an drei verschiedenen Prozessen in der Flügelentwicklung beteiligt: Proliferation der Imaginalscheibe, Musterbildung entlang der AP-Achse und Entwicklung der Flügeläderung (Segal & Gelbart, 1985). Es gibt Hinweise für die Beteiligung von Gbb an der Dpp-Signaltransduktion in allen drei Prozessen. Jeder dieser Prozesse zeigt unterschiedliche Aspekte der *gbb*-Funktion, sie werden daher im Folgenden detailliert besprochen.

Die *dpp*-Domäne entlang der Kompartimentgrenze organisiert Musterbildungsprozesse entlang der AP-Achse

Nach der Segregation von der Beinanlage ist die Flügelanlage so an der Parasegmentgrenze positioniert, daß die *engrailed*-Expression weiterhin das posteriore Kompartiment definiert. Entlang der Kompartimentgrenze aktiviert En über den *hedgehog*-Signaltransduktionsweg eine schmale *dpp*-Domäne im anterioren Kompartiment (Cohen, 1990; Couso et al., 1993). Hierbei sind die 3'-cis-regulatorischen Regionen (*disk*) des *decapentaplegic*-Locus beteiligt (Sanicola et al., 1995; St Johnston et al., 1990). Die beiden Morphogene Dpp und Wg (aus der *wingless*-Domäne der ventralen Flügelimaginalscheibe) definieren, zusammen mit Notch-Signaltransduktion entlang der Dorsoventralgrenze, einen zentralen Bereich erhöhter *vestigial* Expression, des prospektiven Flügels. *Delta* und das nur dorsal exprimierte *serrate* bilden die dorsoventrale Referenz. Notchaktivierung entlang der DV-Kompartimentgrenze führt letztlich zur marginalen *wingless*-Expression. Die *dpp*-Expression bildet bis ins dritte Larvenstadium die AP-Kompartimentgrenze (Posakony et al., 1990).

***Dpp* und *gbb* kontrollieren beide die Proliferation der Flügelimaginalscheibe**

Von der AP-Grenze aus bewirkt Dpp, neben seiner organisierenden Funktion, zusammen mit Wingless die Proliferation der Flügelanlage (Burke & Basler, 1996; Milan et al., 1996; Zecca et al., 1995). Die mit der Musterbildung einhergehende Proliferation ist ein wenig verstandener Prozess, so wird vor allem diskutiert, ob Proliferation mit der Dpp-Konzentration (Nellen et al., 1996) oder dem Gefälle des Dpp-Gradienten korreliert (Day & Lawrence, 2000; De Celis, 2003). Problematisch ist bei beiden Vorstellungen, ein

gleichmäßiges Wachstums zu erklären: einerseits ist die Dpp-Konzentration peripher sehr niedrig, andererseits fällt der Gradient zur Peripherie exponentiell ab (Entchev et al., 2000; Teleman & Cohen, 2000). Darüber hinaus scheint *brinker* diesen Wachstumsprozess negativ zu kontrollieren (Martin et al., 2004). Auch eine Beteiligung des durch die Peripodialmembran ausgeschütteten Dpp an der Proliferationskontrolle in Imaginalscheiben (Gibson & Schubiger, 2000; Pallavi & Shashidhara, 2005), sowie eine direkt anti-apoptotische Funktion des BMP-Signalweges in der Flügelscheibe konnten gezeigt werden (Gibson & Perrimon, 2005). Neuere Befunde weisen auf eine Überlagerung einer konzentrationsabhängigen Kontrolle in der Peripherie und eines Gradienten-abhängigen Mechanismus der Proliferationskontrolle in der medialen Region der Flügelscheibe (Rogulja & Irvine, 2005). Die größte Flächenzunahme der Anlage erfolgt in einem Stadium, in dem sie durch die Primordien der Flügellängsadern schon in „intervein“-Kompartimente unterteilt worden ist. Schon bevor das Differenzierungsprogramm durch Aktivierung des EGFR-Signalweges initiiert wird, können die „provein“-Zonen durch Flügelzellen nicht mehr überschritten werden (De Celis, 2003). Darüber hinaus erfordert die exakte Symmetrie von dorsaler und ventraler Flügelseite eine enge Koordination des Wachstums mit der Entwicklung der Flügeläderung.

Die Rolle von *gbb* bei der Proliferation der Flügelanlage wird durch den Phänotyp bestimmter *gbb*-Hypomorphen mit stark reduzierten Imaginalscheiben deutlich (Wharton et al., 1999). Der Rezeptor Sax spielt hier offensichtlich, im Gegensatz zu seiner Funktion in anderen Prozessen, eine wesentliche Rolle bei der Aktivierung des Signalweges in der Peripherie (Ray & Wharton, 2001a; Singer et al., 1997).

Bei der Musterbildung in der Imaginalscheibe fungiert *gbb* kontextabhängig als Agonist oder Antagonist

Die Befunde zur Rolle von *gbb* in der Imaginalscheibe scheinen teilweise widersprüchlich und lassen sich derzeit noch nicht zu einem schlüssigen Gesamtkonzept zusammenfügen. Genetische Analysen unterschiedlicher Allele von *dpp* und *gbb* weisen auf eine teilweise antagonistische Wechselwirkung hin. Während der ersten Phase der *dpp*-Expression in der Flügelentwicklung, entlang der AP-Grenze, werden mit zunehmender Distanz zur *dpp*-Domäne die Targetgene des *spalt*-Komplexes, sowie *omb* und *brinker* exprimiert. Zu diesem Zeitpunkt wird *gbb* in der Flügelscheibe (ähnlich wie in der Beinscheibe) komplementär zu *dpp* exprimiert, d.h. es gibt kaum Koexpression von *dpp* und *gbb* in der *dpp*-Domäne an der AP Grenze (Khalsa et al., 1998). Allenfalls an den Grenzlinien

beider BMP-Domänen könnte eine schmale Koexpressionszone existieren, wofür neuere Ergebnisse sprechen (Bangli & Wharton, 2006). Nur eine solche hypothetische Koexpressionszone könnte eine Quelle für Dpp-Gbb-Heterodimere in diesem Entwicklungsstadium darstellen.

Der Dpp-Gradient führt hier über nahezu die gesamte AP-Ausdehnung der Imaginalscheibe zur schwellenwertabhängigen Aktivierung der Targetgene *spalt major*, *spalt related* und *optomotorblind (omb)*. Die Reichweite des Dpp-Gradienten wird in diesem Zusammenhang jedoch kontrovers diskutiert. Neben der Verteilung der Rezeptordichte (Tkv) über das Epithel (Tanimoto et al., 2000; Teleman & Cohen, 2000), werden auch dynamin-abhängige Transcytose (Entchev & Gonzalez-Gaitan, 2002; Gonzalez-Gaitan & Jackle, 1999; Kruse et al., 2004) und die Beteiligung extrazellulärer Proteoglycane sog. Glypicane (Fujise et al., 2003; Han et al., 2005) diskutiert.

Im Gegensatz zu früheren Befunden (Francois et al., 1994) könnte theoretisch auch *short gastrulation* in diesem Prozess eine Funktion übernehmen, da es in zwei Streifen parallel zur *dpp*-Domäne exprimiert wird (Yu et al., 1996). Allerdings sind für eine solche Funktion keine Phänotypen bekannt (Drysdale et al., 2005: <http://flybase.org/>).

Gbb ist für die Aktivierung der drei Dpp-Targetgene *spalt major*, *spalt related* und *optomotorblind (omb)* prinzipiell erforderlich (Khalsa et al., 1998). Insbesondere in der Peripherie der Scheibe, wo die Dpp-Konzentration am niedrigsten ist, kommt ihm eine besondere Bedeutung zu. Möglicherweise kommt hier zusätzlich eine synergistische Aktivierung (Haerry et al., 1998), wie im Falle von Dpp-Scw zum Tragen, um einen gegebenen Schwellenwert zu übersteigen. Ob Heterodimere daran beteiligt sind wird von einigen Autoren wegen der komplementären Expressionen (Khalsa et al., 1998) bezweifelt, andere hingegen favorisieren diese Möglichkeit (Bangli & Wharton, 2006; Ray & Wharton, 2001a). Die Entwicklung der L5-Ader im posterioren Kompartiment stellt sich in diesem Zusammenhang als Spezialfall dar (siehe unten).

Hinweise auf antagonistische Wechselwirkungen zwischen *gbb* und *dpp*

Im Widerspruch dazu, gibt es gerade im Kontext der *long range*-Dpp-Signaltransduktion auch überzeugende Belege für eine negative Kontrolle der *dpp*-Expression durch *gbb*. Eine verringerte *gbb*-Expression verstärkt die Expression von *dpp*, sowohl in ektopischen *dpp*-Expressionen in *hedgehog-Moonrat*-Imaginalscheiben (*Mrt*), die sich daraufhin ausdehnen, wie auch in *gbb*-Null-Klonen in der endogenen *dpp*-Domäne. Eine Überexpression von *gbb* inhibiert die *dpp*-Expression. Auf den ersten Blick implizieren diese

Befunde eine differentielle Aktivierung einunddesselben Rezeptors Thickveins durch die beiden Liganden, da Dpp hier seine eigene Expression offensichtlich nicht negativ reguliert, aber bekannt ist, daß beide Liganden vorwiegend über Tkv den Signalweg aktivieren. Die molekulare Grundlagen dieser Regulation sind Gegenstand laufender Forschung (Soares & Wharton, 2005).

Befunde zur Rolle der Typ-I-Rezeptoren bei der Wechselwirkung von *gbb* und *dpp*

Die Affinität von Gbb für den Typ-I-Rezeptor Saxophone ist stärker als für Tkv. Dpp hingegen bindet hochaffin den Typ-I-Rezeptor Thickveins. Gleichzeitig korreliert die Gbb-Signalaktivität negativ mit der Saxophone-Konzentration, aber positiv mit der Konzentration von Thickveins (Bangi & Wharton, 2004). Dieses zu den Bindungspräferenzen gegenteilige Verhalten bestätigt frühere Befunde, daß die pMad-vermittelte Aktivierung des Signalweges durch Gbb, ebenso wie die durch Dpp vorwiegend über Tkv verläuft. Die antagonistische Wirkung von *gbb* auf *dpp* hingegen könnte aber über Sax verlaufen ohne Mad zu involvieren. Saxophone selbst scheint derzeit die einzige bekannte Komponente des Signalweges zu sein, die unter experimentellen Bedingungen direkt zu *gbb* antagonistisch wirken kann (Bangi & Wharton, 2004). In Analogie zur Auswirkung erhöhter Rezeptor-Dichte auf Stärke und Reichweite des Dpp-Signals, könnte der beschriebene Antagonismus über reduzierte Ligandenverfügbarkeit zustande kommen. Dabei wirken Rezeptoren als Ligandenfalle, ohne daß es zu einer weiteren Aktivierung intrazellulärer Komponenten über eine Sättigungsgrenze hinaus kommt. Zunächst scheint diese Annahme mit der gezeigten ubiquitären *gbb*-Expression zu kollidieren, andererseits ist doch eine enge Regulierung des jeweils hochaffinen Rezeptors und der Ligandenexpression nicht unwahrscheinlich. So wird die Dichte von Tkv in der Imaginalscheibe direkt von Dpp reguliert (Lecuit & Cohen, 1998) und parallel zur Expression des Liganden über *master of thickveins* (*mtv*, Funakoshi et al., 2001). In anderem Umfeld wie der Aktivierung des Targetgens *sal* ist Sax eindeutig als Kandidat für die positive Transduktion von Gbb-Signalaktivität (s.u.) zu sehen. Auch diese lokal verschiedenen Zusammenhänge könnten durch unterschiedliche Dichten der beiden Rezeptoren bedingt sein (Bangi & Wharton, 2004).

Die Entwicklung der L5-Ader könnte einen Synergismus zwischen *gbb* und *dpp* erfordern

Insbesondere für Musterbildungsprozesse im posterioren Kompartiment scheint *gbb* eine wichtige Rolle zu spielen, wobei es an der Kontrolle der Targetgene *optomotor-blind* und *spalt* ebenso beteiligt ist wie an der Repression von *brinker*. Bei der Entwicklung der L5-Ader könnte es möglicherweise doch als Gbb-Dpp-Heterodimer wirken. Insgesamt scheint die Gbb-Wirkung hier eine größere Reichweite zu besitzen als Dpp (Bang & Wharton, 2005). Darüber hinaus existieren offensichtlich, sowohl mit Dpp synergistische Wirkungen bei der Ausbildung des BMP-Aktivitätsgradienten und des Brinker-Gradienten, wie auch autonome Funktionen von Gbb. Brinker bildet einen zu Dpp gegenläufigen Gradienten und reprimiert konzentrationsabhängig andere *dpp*-Targetgene (Winter & Campbell, 2004) und sich selbst. Letzteres ist eine Voraussetzung zur Ausbildung des Brinker-Gradienten (Moser & Campbell, 2005). Das durch *dpp* aktivierte *schnurri* (*shn*) reprimiert *brinker* (Marty et al., 2000) und andere Targetgene von *dpp* mittels eines silencer-Elements und Interaktion mit Mad und Medea (Affolter et al., 2001; Muller et al., 2003; Pyrowolakis et al., 2004). Damit kommt dem Transkriptionsfaktor Schnurri eine duale Funktion zu, da er auch direkt downstream-Gene von *dpp* aktiviert (Torres-Vazquez et al., 2001; Torres-Vazquez et al., 2000).

Neben *dpp* aktiviert hedgehog von der AP-Grenze als Organisator ausgehend auch andere Targetgene. Von besonderer Bedeutung ist *knot*, dessen Domäne zentral in der breiteren *spalt*-Domäne liegt. Durch diese Lage werden an den jeweiligen Domänengrenzen die Adern L3, L4 (*knot*) und L2 (*sal*) positioniert. *Knot* und *spalt* kontrollieren direkt oder indirekt die Expression einer Reihe von Transkriptionsfaktoren z.B. aus dem *iroquois*- und *knirps*-Komplex, aber auch Faktoren der EGFR- und Notch-Signalwege, *vein*, *rhomboïd* bzw. *delta*. Auf diese Weise werden „provein“ und „intervein“-Zonen determiniert und das Grundmuster für die weitere Aderentwicklung bestimmt. L5 liegt nur unwesentlich peripherer als L2, jedoch zeigt nur L5 Defekte in *gbb*-Mutanten. Beide liegen innerhalb der Domäne von *omb*, das in beiden Anlagen Targetgene aktiviert. Während L2 unmittelbar an der relativ scharfen *sal*-Domänen-Grenze entsteht, ist L5 direkt an/in der gradientenförmigen *brk*-Domänen-Grenze lokalisiert. Induktive Signale (Sturtevant et al., 1997) aus den *sal*- und *brk*-Domänen aktivieren die Faktoren Knirps (Kni) für L2 (Lunde et al., 1998) bzw. Abrupt (Ab) L5. Brk-exprimierende Zellen sind selbst nicht empfänglich für dieses *short range*-Signal. Im Gegensatz zu *kni* benötigt *ab* offensichtlich zusätzliche direkte Aktivierung durch *omb*. Beide Bedingungen zusammen generieren ein schmales Aderprimordium (Cook et al., 2004). Die zusätzliche Regulation durch *omb* könnte der limitierende Faktor sein, der die Abhängigkeit

von *gbb* begründet. Gbb wirkt hier wahrscheinlich mit Dpp synergistisch und hebt die BMP-Aktivität über den zur Transkription von *omb* nötigen Schwellenwert (Haerry et al., 1998). Die Aktivierung von *omb* ist hier dennoch indirekt und pMad-unabhängig (Affolter et al., 2001; Jazwinska et al., 1999a). Sie verläuft möglicherweise ausschließlich über BMP-vermittelte Repression von *brk*. In diesem Kontext wirken entweder Gbb-Homodimere aus der Fläche oder Heterodimere von den Grenzen zur *dpp*-Domäne (Ray & Wharton, 2001a).

Die Differenzierung der Flügeläderung wird durch Gene des EGFR- und Notch-Signalweges eingeleitet

Nachdem gegen Ende des dritten Larvenstadiums die Identität der Adern über spezifische Kombinationen von Transkriptionsfaktoren festgelegt ist und die Aderprimordien (oder vein-competent zones/proveins) angelegt sind, beginnt mit der Aktivierung des EGFR-Signalweges in den Zellen der „proveins“ ein stereotyper Differenzierungsprozess (Diaz-Benjumea & Garcia-Bellido, 1990; Martin-Blanco et al., 1999). Die daraus resultierende Expression von *delta* und *serrate* inmitten der „provein“ aktiviert den Notch-Rezeptor in den unmittelbar benachbarten Zellen und supprimiert dort Aderschicksal (de Celis et al., 1997). Zentrale Rolle spielen die *Enhancer of split*-Gene. *E(spl)mβ* reprimiert *rho* und beschränkt damit die Aktivierung des EGFR-Weges auf die Aderzellen. Erst nach der Apposition von ventraler und dorsaler Flügelspreite während des Puppenstadiums wird de novo *dpp*-Expression in den Flügeladern induziert. Welche upstream-Gene hierfür verantwortlich sind ist unklar (De Celis, 2003). Einige Autoren favorisieren auch hier den EGFR-Signalweg (Ralston & Blair, 2005; Shimmi et al., 2005b). Dpp selbst gewährleistet die Aufrechterhaltung der EGF- und Notch-Signale (de Celis, 1997; Ray & Wharton, 2001b). Diese Phase der *dpp*-Expression hängt von anderen cis-regulatorischen Regionen ab: Während die *dpp*-Expression an der AP-Grenzen durch die *disk*-Region (3') reguliert wird, wird bei der Adermusterbildung die *shortvein*-Region (5'; *shv*) genutzt (Segal & Gelbart, 1985; Stultz et al., 2005). Die weitere Aderentwicklung wird hauptsächlich durch die Aktivierung des BMP-Signalweges kontrolliert.

In der weiteren Entwicklung der Flügeläderung hat *gbb* eine Schlüsselrolle

Bei Ausbreitung und Regulation des BMP-Signals sind neben *gbb* wieder *sog* und Gene der *tsg*- und *crossvein*-Familien (Vilmos et al., 2005) und *tollkin/tolloid-related* beteiligt. Es lassen sich hier prinzipiell drei unterschiedliche Interaktionsmuster der einzelnen

Komponenten unterscheiden: die Wechselbeziehung der beiden Liganden Dpp und Gbb bei der Entwicklung der Längsadern unterscheidet sich von ihrer Interaktion bei der Querader-Entwicklung. Ebenso sind deren Interaktionen in den beiden Queradern-Anlagen (anterior cross vein, ACV und posterior cross vein, PCV, Übersicht in Marcus, 2001) unterschiedlich.

Das Protein Sog reguliert die Beweglichkeit von BMP-Liganden

Neben der embryonalen Expression von *Short gastrulation (sog)* (Francois et al., 1994) und der Expression in der Flügelimaginalscheibe, wird *sog* vor allem in den pupalen Flügelanlagen exprimiert. Wegen seiner unterschiedlichen genetischen Interaktion in *dpp*- und *gbb*-Mutanten (Yu et al., 2000) sind in diesem System auch molekulare Details der Wechselwirkung von Sog mit BMP-Liganden genauer untersucht worden.

Das Sog-Protein enthält 4 cysteinreiche Domänen (CR), die die Bindung von BMP-Liganden vermitteln. Darin und in weiteren funktionellen Merkmalen ähnelt es dem BMP-Antagonist Chordin aus Wirbeltieren (Francois & Bier, 1995; Sasai et al., 1995). Die Metalloprotease Tolloid/Xolloid-BMP-1 generiert in vivo durch Spaltung von Sog an konservierten Schnittstellen Molekülspezies, in denen unterschiedliche CR-Domänen deletiert bzw. kombiniert sind (Yu et al., 2000). Bemerkenswerterweise ist die Art der generierten Spaltprodukte vom ontogenetischen Zusammenhang abhängig, d.h. embryonal werden andere Sog-Fragmente gebildet als in der pupalen Flügelanlage. Darüber hinaus zeigen die Sog-Fragmente qualitativ sehr unterschiedliche, teilweise sogar gegensätzliche Wirkung auf die BMP-Signaltransduktion, die sich auf die Kombination der verbliebene CR-Domänen und den unmittelbar umgebenden Proteinbereiche zurückführen läßt (Yu et al., 2004). So scheint die CR-1-Domäne die Bindung an Dpp, die CR-4-Domäne die Bindung an Gbb zu vermitteln. Obwohl die biologische Signifikanz dieser Sog-Varianten nicht abschließend gesichert ist, erscheinen die in vitro und in vivo Daten doch überzeugend und die diskriminierende Wechselwirkung mit unterschiedlichen BMP würde die genetischen Interaktionen von *sog* mit *dpp*-, *scw*- und *gbb*-Mutationen erklären. Im Wirbeltiersystem existieren den Sog-Fragmenten funktionell und strukturell ähnliche Spleißvarianten von Chordin (Millet et al., 2001). Gemeinsam deuten diese Befunde auf einen Transportmechanismus hin, der verschiedene BMP-Ligandenspezies unterscheiden kann.

Die Differenzierung der Längsadern repräsentiert einen *gbb*-abhängigen *short range*-Mechanismus

Zum Zeitpunkt der *dpp*-Expression in den Längsadern wird *gbb* ubiquitär in der Flügelanlage exprimiert (Conley et al., 2000). Das bedeutet, daß es in den Adern zu einer Koexpression beider BMP kommt und ein Dpp-Gbb-Heterodimer sezerniert wird, während es in den „intervein“-Zellen nur zur Bildung von Gbb-Homodimeren kommt. Die Initiierung der *dpp*-Expression ist zumindest indirekt von EGFR-Aktivierung abhängig. Die Aktivierung des Dpp-Signalweges ist ein *short range*-Prozess (Ralston & Blair, 2005), wie sich anhand der pMad-Verteilung nachweisen läßt: sie ist kaum breiter als die *dpp*-mRNA-Domäne (Conley et al., 2000). Autoaktivierung ist auch hier wesentlich für die *dpp*-Expression (Yu et al., 1996). In der pupalen Flügelanlage ist die Reichweite ektopisch exprimierten Dpp extrem eingeschränkt: 1-3 Zelldurchmesser (Ralston & Blair, 2005). Auch in diesem Prozess spielt Sog, das in den „intervein“-Zellen exprimiert wird (Yu et al., 1996), eine Rolle. Zusammen mit dem Protein Crossveinless begrenzt Sog die BMP-Aktivierung und gewährleistet so einen geraden Aderverlauf, d.h. Sog wirkt hier lokal am Rand der Ader als BMP-Antagonist. Eine Inhibition der Autoaktivierung von *dpp* durch Sog ist auch hier von Bedeutung. Crossveinless (Cv, auch Tsg2) enthält 5 cysteinreiche Domänen zur BMP-Bindung wie Twisted gastrulation (Yu et al., 2004) zeigt jedoch eine Bindungspräferenz für Gbb/Dpp-Dimere. (Vilmos et al., 2005). Offenbar ist *gbb* auch für die Ausbildung der distalen Spitzen der Längsadern nötig (Khalsa et al., 1998; Ray & Wharton, 2001b), dies kann man als *dpp*-unabhängige Funktion interpretieren (Khalsa et al., 1998). Wahrscheinlicher ist – auch im Lichte neuerer Ergebnisse aus dem Scw-Dpp-System des Embryos – daß es obligat zur Bildung von Heterodimeren (Ray & Wharton, 2001b) kommen muß, um zusammen mit Sog einen scharfen Aktivierungsgipfel entlang des Aderverlaufs und am Endpunkt zu erzeugen. Dpp-Homodimere sind offenbar wegen ihrer geringeren Sog-Affinität und der niedrigeren Aktivierungs-Effektivität hierzu nicht in der Lage. Distale Defekte der Längsadern sind ein klassischer *gbb*-Phänotyp.

Die Initiation der PCV-Differenzierung repräsentiert einen *gbb*-abhängigen *long range*-Mechanismus

Die Queraderdifferenzierung (ACV und PCV) ist zunächst von der Aktivierung des EGF-Signalweges unabhängig und wird durch BMP-Signale initiiert (Conley et al., 2000; Ralston & Blair, 2005). Die ACV liegt in einer intervein-*dpp*-Domäne (Ralston & Blair, 2005) und ist kürzer, auf ihre Entwicklung wird nicht weiter eingegangen. Das im Puppenstadium in der Flügelanlage ubiquitär exprimierte Gbb spielt auch bei der Entstehung

der PCV eine Schlüsselrolle und auch hierbei ist es das von den *dpp*-exprimierenden Zellen der Longitudinaladern sezernierte Dpp-Gbb-Heterodimer, das den wirksamen Liganden darstellt. Daher ist die Initiation der PCV-Differenzierung eine *long range*-Funktion der BMP-Liganden aus den Längsadern. Die lokale *dpp*-Expression in der PCV erfolgt erst später, wohl analog der Abfolge in den Längsadern durch die hier sekundäre Aktivierung des EGFR-Signalweges (Ralston & Blair, 2005). Das Dpp-Signal muß bis zu 7 Zelldurchmesser überwinden um alle PCV-Zellen zu erreichen (Ralston & Blair, 2005). Das Prinzip, wie BMP-Liganden von der Quelle zum Wirkort transportiert werden, scheint dabei den Prozessen bei der Etablierung des embryonalen BMP-Gradienten außerordentlich zu ähneln. Short gastrulation und Crossveinless binden das BMP-Heterodimer, verhindern Rezeptorbindung und ermöglichen so eine größere Beweglichkeit. Im Einklang damit ist die Expression von *sog* in der „crossvein-competent zone“ von Anfang an und unabhängig vom BMP-Signal reduziert. Umgekehrt verhält es sich jedoch mit der Expression eines weiteren BMP-bindenden Proteins: Crossvein-2, das lokal in der PCV exprimiert wird (Conley et al., 2000). Crossvein-2 ist zwar kein integrales Membranprotein, kann aber an die Zellmembran binden und wäre damit in der Lage BMP-Dimere aus einem Sog/Cv-Komplex zu übernehmen und dem Rezeptor zuzuführen. Eine analoge Präsentation des Liganden wird als Komponente der positiven Rückkopplungsschleife im embryonalen Ektoderm postuliert (O'Connor et al., 2006) und auch als *sog*-unabhängige Funktion von Tsg im Dpp-Scw/Sog/Tsg/Tld-System angenommen (Wang & Ferguson, 2005). Hinweise auf solche BMP-präsentierenden Proteine gibt es auch in Vertebraten (Little & Mullins, 2004; Xie & Fisher, 2005). Die Spaltung von Sog durch die Metalloprotease Tollkin/Tolloid-related könnte bei der Freisetzung des Dimers eine Rolle spielen (Serpe et al., 2005). Trotz funktioneller und struktureller Ähnlichkeiten zu *tld* erscheint *tlr* auf die lokalen Bedingungen im pupalen Flügel optimiert. (Shimmi et al., 2005b). Proteolytische Derivate von Sog könnten ihrerseits hier regulatorische Funktionen haben (Yu et al., 2004; Yu et al., 2000). Bei der Begrenzung der „crossvein-competent zone“ spielt offensichtlich wieder das Wegfangen der Liganden durch Thickveins im Randbereich der Zone eine Rolle, wie *tkv*-Hypomorphe und -Überexpression zeigen (de Celis, 1997; Haerry et al., 1998). Ein Modell zu den Verhältnissen an der PCV ist in Abb. 6 zusammengefaßt. Während sich die Vorstellungen über diese Initiationsprozesse auf viele Befunde stützen, bleibt die eigentliche Determinierung der „crossvein-competent zone“ unklar (Baron et al., 2000; Marcus, 2001).

Die Verhältnisse in der Flügelimaginalscheibe und der Flügeläderung zeigen, daß zusätzlich zu den mannigfaltigen Faktoren, die derzeit für die BMP-Regulation auf

extrazellulärer Ebene diskutiert werden, wie Rezeptordichte, Sog, Transzytose, Argosomen und extrazelluläre Matrix, die kontextabhängig differentielle Expression der Liganden eine erhebliches Maß an Komplexität liefert.

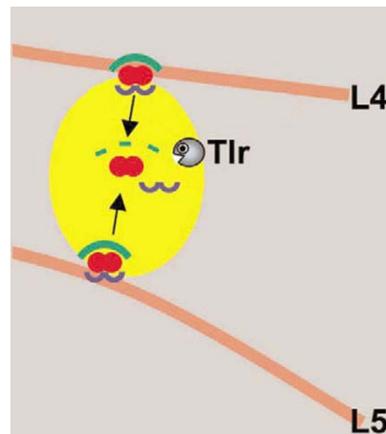


Abb. 6: *long range*-BMP-Signal bei der Entwicklung der PCV. Dpp wird nur in den Längsadern exprimiert (L4, L5). Gbb wird ubiquitär exprimiert. Dpp/Gbb-Heterodimere (rot) werden in den Längsadern sezerniert und von Sog (grün) und Cv (= Tsg2, blau) gebunden. Die Komplexe diffundieren und Tlr führt zur lokalen Freisetzung des BMP-Liganden durch Spaltung von Sog. Das in der „crossvein competent zone“ exprimierte Cv-2 (gelb) präsentiert den Liganden dem Rezeptor (hypothetisch) (verändert nach O'Connor et al., 2006).

1.5.4 Funktionen von *dpp* als „prepattern“-Gen bei der Anlage der proneuralen Cluster

Sowohl in *Drosophila*, wie auch in *Tribolium* treten Duplikationen von Macrochaeten in *gbb*-Hypomorphen (Wharton et al., 1999) bzw. *gbb*-knock down-Phänotypen auf. Die Macrochaeten von *Drosophila* sind mechanosensorische, borstenförmige Sensillen am Rand der Tergite der thorakalen Segmente. Der Thorax trägt bei *Drosophila melanogaster* auf einer Körperhälfte jeweils 11 Macrochaeten. Mechanosensillen werden in *Drosophila* als „proneurale Cluster“ in einem stereotypen Muster angelegt (Übersicht in Simpson et al., 1999). Im späteren Differenzierungsprozess wird durch laterale Inhibition eine Zelle (sensory organ precursor, SOP) aussortiert. Aus der SOP entwickeln sich klonal die 5 Zellen der Mechanosensille. Dabei kommt *dpp* eine duale Funktion zu: es initiiert zusammen mit *wingless* die Bildung der proneuralen Cluster, indem es wahrscheinlich die Transkription proneuraler Gene direkt aktiviert (Tomoyasu et al., 1998). Es handelt sich bei dieser *dpp*-Expression um die *hh*-aktivierte Domäne entlang der Kompartimentsgrenze im Notum-Teil der Imaginalscheibe. Gleichzeitig ist *dpp* in diesem Kontext indirekt an der Kontrolle von *wg* über die Aktivierung von *pannier* (*pnr*) und *u-shaped* (*ush*) beteiligt (Tomoyasu et al., 2000). Zusammen legen diese vier Gene das sogenannte „prepattern“ in der Flügelscheibe fest (de Celis et al., 1999; Tomoyasu et al., 1998). Dabei spannen *dpp*- und *wg*-Domäne einen Winkel auf, in dem die Positionsinformation – ähnlich wie in der Beinscheibe – durch Kombinationen beider Morphogene spezifiziert wird. Dadurch ergibt sich ein Muster lokaler Kombinationen unterschiedlicher Aktivatoren proneuraler Gene v.a. des *achaete-scute*-Komplexes (ASC). Die Rolle von *gbb* an diesen Musterbildungsprozessen im Notum, die sowohl Anzahl wie auch Lage der proneuralen Cluster festlegen, könnte die ektopischen Macrochäten in *gbb*-Hypomorphen erklären (Soares & Wharton, 2003).

1.5.5 Rolle der BMP bei der Entwicklung des Tracheensystems und der Telsonregion

In *Tribolium* kommen im Zusammenhang mit der Entwicklung des Tracheensystems Defekte bei *gbb*-knock down vor. Die Tracheenentwicklung von *Tribolium* ist jedoch wenig untersucht: Expressionsanalysen des *Tribolium-spalt*-Homologs und RNAi-Experimente zeigen eine Beteiligung dieses Gens, zumindest was die Differenzierung der Stigmata betrifft (Berghammer, 2003). Die für *Drosophila-gbb*-Phänotypen berichteten Telson-Defekte

betreffen direkt die Entwicklung der Spirakeln und Stigmatophoren (Wharton et al., 1999). Die BMP-Signaltransduktion spielt eine entscheidende Rolle in der Positionierung und Kompartimentierung der Trachealplakoden im *Drosophila*-Embryo. Darüber hinaus scheint *dpp* eine spezielle Funktion in den äußerst posterioren trachealen Anlagen zu erfüllen, die durch *nejire/dCBP* vermittelt wird (Takaesu et al., 2002). Das Tracheensystem von *Drosophila* entwickelt sich aus zehn Trachealplakoden, die sich während der Keimstreifstreckung (Stadium 10) im lateralen Ektoderm bilden. Die dorsoventrale Positionierung erfolgt durch den EGFR-Signalweg von ventral und den BMP-Signalweg von dorsal (Isaac & Andrew, 1996). Sobald eine Plakode eine segmentspezifische Anzahl (meist etwa 80) Zellen umfaßt, stoppt die Proliferation und die weitere Entwicklung erfolgt ausschließlich durch Migration und Veränderung der Zellmorphologie. Molekular zeichnen sich die Trachealplakoden durch die Expression der Gene *tracheiless* und *tango* aus. Die Prozesse der Invagination und der primären Verzweigung werden wesentlich durch zwei Gene des FGF-Signalweges bewirkt: *Branchless* wird zunächst von Epidermiszellen sezerniert, die die Plakode umgeben, wobei dessen Rezeptor *Breathless* von den Plakodenzellen exprimiert wird (Klamt et al., 1992). Die dynamische Expression von *branchless* induziert und reguliert die Verzweigungen bis zur dritten Ordnung, wobei sowohl ektodermale wie mesodermale Strukturen den Liganden exprimieren (Sutherland et al., 1996). BMP-, EGFR- und Wnt-Signaltransduktion unterteilen die einheitliche Äquivalenzgruppe der Plakode (Samakovlis et al., 1996) in zunächst drei Kompartimente (Stadium 11): der ventrale Teil der Plakode liegt direkt an der ventrolateralen *dpp*-Domäne, ein kleinerer dorsaler Teil liegt in Reichweite des Dpp-Signals aus der dorsolateralen Domäne (Schwyter et al., 1995). Der zentrale Bereich hingegen wird durch die vorübergehende Expression von *rhomboid* in der Plakode und die resultierende Aktivierung des EGFR-Signalweges durch *spitz* determiniert. Der Wnt-Signalweg determiniert den dorsalen Stamm (Wappner et al., 1997) und *spalt* ist als *wg*-Targetgen ebenfalls an der Entwicklung dieses Teils der Trachee beteiligt. (Wappner et al., 1997). Während *dpp* und EGFR-Signal die dorsoventrale Teilung der Plakode bewirken, sind Mechanismen downstream hiervon noch unklar. Neben der frühen Funktion der Zellzahl-Regulierung in der Plakode, ist die Hh-Signaltransduktion an der Morphogenese der primären Äste beteiligt (Glazer & Shilo, 2001). Auch *short gastrulation* ist über die Dpp-Signaltransduktion in die Plakodenentwicklung involviert, da in entsprechenden Phänotypen EGFR-determinierte Schicksale reduziert werden (Wappner et al., 1997). In diesem Stadium (11) ist *sog* als dorsolateraler Streifen exprimiert, während *twisted gastrulation* nicht mehr exprimiert wird. Interessanterweise ist aber *crossveinless* in und um die „tracheal pits“

exprimiert. *Crossveinless*-Mutanten zeigen aber keinerlei Anomalitäten in der Entwicklung des Atmungssystems. Möglicherweise hat diese *cv*-Expression Reliktcharakter bzw. ein anderes BMP-bindendes Protein kooperiert mit Sog (Shimmi et al., 2005b). Obwohl *gbb* in diesem Stadium großflächig, auf niedrigem Niveau im Ektoderm exprimiert wird (Doctor et al., 1992), sind die genauen Expressionsverhältnisse in der Trachealplakode nicht bekannt.

1.5.6 Funktionen von BMP 6/7/8-Orthologen bei Anlage und Differenzierung neuraler Strukturen

Die Wildtypexpression von *gbb* in *Tribolium* deutet auf eine Funktion in neuroektodermalen Anlagen. In Urochordaten scheint eine Beteiligung des *gbb*-Orthologen bei der Musterbildung im Neuroektoderm möglich (Miya et al., 1996). Hingegen beschränken sich die Funktionen von *gbb* im Nervensystems in *Drosophila* auf die Determination bestimmter peptiderger Neuronen und die neuromuskuläre Synaptogenese. Interessant ist in diesem Zusammenhang, daß die Gbb-Signaltransduktion hier die Beteiligung einer alternativen Komponente des BMP-Signalweges nutzt. Der Typ-II-Rezeptor *whishful thinking* (*wit*) bindet dabei Gbb oder aktivin-ähnliche Liganden, je nachdem, ob er mit Sax, Tkv oder Bab assoziiert ist. Auch Dpp ist ein möglicher Ligand (Aberle et al., 2002; Lee-Hoeflich et al., 2005). Das Gbb-Signal an der neuromuskulären Endplatte ist retrograd, d.h. es wird durch die Muskelzelle und nicht etwa durch das Neuron sezerniert (Baines, 2004; McCabe et al., 2003). Die Sekretion von Gbb durch Zellen des Neurohämalorgans führt zur Expression eines neuromodulatorischen Peptids in einer bestimmten Neuronengruppe (Allan et al., 2003; Marques et al., 2003). Dementsprechend zeigen bestimmte *gbb*-Mutanten *wit*-ähnliche neuronale Phänotypen.

1.6 Ziele dieser Arbeit

Ausgehend von der Funktion von Dpp als Morphogen bei der Musterbildung in den dreidimensionalen Gliedmaßenanlagen von *Tribolium* sollte die Funktion des zweiten in *Tribolium* bekannten BMP-Liganden, Glass Bottom Boat, untersucht werden. Neben einer detaillierten Expressionsanalyse sollten funktionelle Daten mittels RNA-Interferenz gewonnen werden.

Da der dramatische, frühe Phänotyp der *dpp*-RNAi eine Untersuchung der *dpp*-Funktionen in der Beinentwicklung unmöglich machte und der unerwartet komplexe Phänotyp des *gbb*-knock down für *gbb* auch Funktionen in der dorsoventralen Musterbildung nahelegte, hat sich der Schwerpunkt der Arbeit von Beinentwicklung zur dorsoventralen Musterbildung verschoben. Insbesondere das Erzeugen dorsoventraler Polarität durch die Wachstumszone war hier ein wesentlicher Aspekt. In diesem Zusammenhang waren auch funktionelle Daten und Expressionsanalysen von *dpp* erforderlich.

2 MATERIAL UND METHODEN

Die benutzten molekularbiologischen Methoden richteten sich nach Sambrook (1989; 2001), sowie den Angaben der Hersteller von Enzymen und Kits. Es wurden die in der molekularbiologischen Praxis üblichen, kommerziell erhältlichen Produkte eingesetzt. Die Haltung von Käfern orientierte sich an Berghammer et al. (1999a). Es wurde ausschließlich der San Bernardino-Wildtypstamm (SB) von *Tribolium castaneum* eingesetzt.

RNA-Synthese

Für die RNA-Synthese wurde template-DNA durch PCR-Amplifikation des entsprechenden Genfragmentes aus Plasmidkonstrukten gewonnen. Diese basieren auf Standardklonierungsvektoren, sodaß universelle Primer Verwendung fanden. Für die template-Synthese für dsRNA und andere Zwecke wurde AmpliTaq (Applied Biosystems) und SAWADY 'Mid Range PCR System (Peqlab) benutzt, zur Herstellung von templates für senseRNA ausschließlich Expand High Fidelity PCR System (Roche). Die Numerierung der Klone „#nnn“ bezieht sich auf die in der Arbeitsgruppe Prof. M. Klingler, Erlangen vorhandenen und katalogisierten DNA-Klone.

Synthese spezifischer Primer für die PCR: Metabion, München

Für alle Ansätze und Verdünnungen im Zusammenhang mit RNA wurde ausschließlich RNase-freies Wasser der Kit-Hersteller und von Fluka/Sigma-Aldrich verwendet. DEPC wurde nicht verwendet.

Synthese von dsRNA für die RNA-Interferenz

Die in vitro-Transkription erfolgte mit den Kits „MEGAscript“ von Ambion, Inc., Austin, USA und „AmpliScribe flash“ von Epicenter, Madison, USA nach den Angaben der Hersteller. Als template-DNA wurde 1µl der entsprechenden PCR-Reaktion direkt in einen Transkriptionsansatz von 20µl Gesamtvolumen eingesetzt. Die Inkubation dauerte 2h bei 37°C. Zur Aufreinigung des Produktes wurde mit LiCl aus dem „MEGAscript“-Kit gefällt, nach Vorgaben des Herstellers. Abweichend hiervon erfolgte die Fällung über Nacht oder mindestens 3h bei -20°C. Es wurde 1h bei 4°C bei 13000 rpm (Standardrotor, Eppendorf) abzentrifugiert und das Präzipitat zweimal in 70% Ethanol bei RT gewaschen. Die Qualität der Präparation wurden im 1%, nichtdenaturierenden Agarosegel kontrolliert. Konzentrationen wurden photometrisch gemessen.

Bei der Herstellung von antisense-Sonden und den Kontroll-senseRNAs wurde analog verfahren, unter Beachtung der geeigneten Promotor/RNA-Polymerase Kombination bei den template-PCR-Primern. Die Transkriptionsreaktion erfolgte mit Digoxigenin- und Fluorescein-gelabelten Nucleotiden, sowie T3-Polymerase und RNase-Inhibitor von Roche, Mannheim und den Produkten von Ambion und Epicenter.

Synthese von senseRNA zur Überexpression von Tc'Pax-6, 3xP3-EGFP und Dm'dpp-EGFP

Für die in vitro-Transkription von methylguanylierter (capped) senseRNA wurde „mMessage mMachine T7“ kit und für das tailing derselben „polyA tailing kit“ von Ambion benutzt. Die Reaktionen wurden nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Als template diente ein PCR-Produkt.

BMP-cDNA-Konstrukte

Die Konstrukte mit Fragmenten von *Tc'dpp* und *Tc'gbb* wurden großzügigerweise von John Doctor, Pittsburgh, zusammen mit unveröffentlichten Daten zu *Tc'gbb* zur Verfügung gestellt (Pincus et al., in Vorb.).

***Tc'dpp*-Konstrukt**

Tc'dpp lag als cDNA-Klon pLOU1 (Sanchez-Salazar et al., 1996, #79) in pCRII (Stratagene) vor. Der Klon umfaßt 1,5kB, wobei 500bp auf die 3'untranslatierte Region entfallen. Damit enthält das Konstrukt von den 1,1kB kodierender Sequenz 1000bp. Das Signalpeptid ist nicht enthalten. Für antisenseRNA-Sonden wurden templates mit T7- und Sp6-Primern amplifiziert, für dsRNA mit T7-Sp6- und T7 und für senseRNA mit T3-Sp6- und T7-Primern.

***Tc'gbb*-Konstrukt**

Tc'gbb stand als cDNA-Klon p303 in pCRII zur Verfügung (Pincus et al., in Vorb , #249). Das enthaltene 1,2kB große *gbb*-Fragment stammt aus 5'RACE und enthält die kodierende Sequenz für das Signalpeptid, die Prodomäne und einen kleinen Teil der maturen, carboxyterminalen Domäne. Für antisenseRNA-Sonden wurden templates mit T3-Sp6- und T7-Primern amplifiziert, für dsRNA mit T7-Sp6- und T7 und für senseRNA mit T7- und Sp6-Primern.

Andere molekulare Marker

Weitere Sonden wurden mit folgenden templates in gleicher Weise synthetisiert:

Tc'wg (Nagy & Carroll, 1994, #107), *Tc'twi* (K. Handel/S. Roth, unveröff., #283), *Tc'otd-1* (R. Schröder, unveröff., #125), *Tc'sna* (K. Schmidt/S. Roth, unveröff., #284), *Tc'eve* (S. Brown, pcJKP1.4, #111).

pSC1334 (Dm'dpp-EGFP)

Das Konstrukt pSC1334 enthält *Dm'dpp*-EGFP in pRmHa-3 und wurde freundlicherweise von Aurelio Teleman, Heidelberg zur Verfügung gestellt. (Bunch et al., 1988; Teleman & Cohen, 2000). Zur Herstellung von senseRNA zur Überexpression in Käfern wurde die kodierende Sequenz mit spezifischen Primern mit T7-Promotor amplifiziert (upper: 5'-GTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG CGA TTC CAA ATC AAA ATC CAA AT-3' & lower: 5'-GAA TTG GTC GCT CTT ACT CCT A-3').

Injektion von senseRNA

Im speziellen Fall war es fraglich, ob die Expressionsstärke den mikroskopischen Nachweis von EGFP zuläßt. Hierzu wurde aus pMi3xP3-EGFP (#239) der 3xP3-Promotor und die EGFP-Sequenz amplifiziert und mit einem T7-Promotor versehen. Von pSC1334 wurden 1000ng/µl polyadenylierte, von pMi3xP3-EGFP 450ng/µl nicht adenylierte und 500ng/µl polyadenylierte senseRNA injiziert.

eRNAi und Mikroinjektion

Für die RNAi wurde im Wesentlichen nach (Berghammer et al., 1999b) injiziert, jedoch bei RT und von lateral ins Ei.

Wenn die Vitellinmembran kaum durch Bleichen vorgeschädigt ist, erfolgt das Austrocknen injizierter Eier vor allem durch das Einstichloch. Daher wurde versucht, die Injektionskapillaren möglichst fein zu brechen. Borsilikat-Glaskapillaren ohne Filament 1B100-4, World Precision Instruments Inc., Sarasota wurden an einem Puller von Sutter Instruments Co., Novato gezogen. Die ersten beiden durch Kaltlichtbeleuchtung erzeugten Newton Ringe zeigen eine geeignete Bruchstelle. Ein Beladen der Kapillare von vorne verhindert das Verstopfen während der eigentlichen Injektionsprozedur. Normalerweise wurden frühe Blastodermstadien injiziert, um jedoch experimentellen Zugang zur Funktion von *dpp* in der Beinentwicklung zu finden, wurde in einer Serie *dpp*-dsRNA in junge Keimstreifen vor Schluß des Serosafensters und vor dem Auftreten sichtbarer

Extremitätenanlagen in Keimstreifen injiziert. Als Kontrolle diente *Dll*-dsRNA (1000ng/μl), da der *Distalless*-Phänotyp hinreichend bekannt und leicht zu identifizieren ist.

Die Mikroinjektionen für embryonale RNAi zur Gewinnung von Kutikulapräparaten erfolgte unter Voltalef PCTFE10S (elf atochem) nach Entfernen des Chorions mit Klorix (ca. 1:3 verdünnt für 1-2 min) und Waschen in Wasser. Die Klebekraft der durch die Hypochlorit-Behandlung abgelösten Membranreste reicht aus, um die Eier fest auf den Objektträger aufzubringen. Sie wurden in die Seite injiziert, um nicht durch Injektion in die Termini von vornherein eine Störung des anteroposterioren Systems herbeizuführen. Die Inkubation erfolgte 3-4 Tage bei 33°C. Das Öl wurde vor dem Einbetten mit reinem Aceton restlos abgewaschen. Aceton hinterläßt im Gegensatz zu Heptan, keine Rückstände, was besonders für die konfokale Mikroskopie von Vorteil ist. Irreversible Trocknungsartefakte traten nicht auf, wenn das Einbetten unmittelbar nach oberflächlichem Abtrocknen erfolgt. Eindringendes Aceton diffundiert restlos in das Einbettungsmedium. Die Injektion in Öl ist eine Möglichkeit, das Austrocknen injizierter Eier zu minimieren, außerdem verhindert es Fraß geschlüpfter Larven an retardierten Eiern, was wegen des zusätzlichen 4. Reifetages bei *dpp*- und *gbb*-RNAi von erheblichem Vorteil war.

Mikroinjektionen zur Gewinnung von Embryonen für die in situ Hybridisierung

Mikroinjektionen für embryonale RNAi mit anschließender in situ-Hybridisierung erfolgte unter Luft und ansonsten wie oben angegeben. Die Eier wurden dann in einer feuchten Kammer je nach gewünschten Stadien bei 24°C oder 33°C unterschiedlich lang inkubiert. Die Entwicklungsstörung durch den Einstich führt zu einer Retardierung von 3-4h (bei 33°C) gegenüber den bei Sokoloff (1972) beschriebenen Entwicklungszeiten, die ansonsten bei den gegebenen Bedingungen zutreffen.

Parentale RNAi (pRNAi)

Die Injektionen in Puppen folgten dem von G. Bucher entwickelten Protokoll (Bucher et al., 2002). Die dsRNA wurde davon abweichend in Wasser injiziert. Wegen der Funktionen von *gbb* und *dpp* in der Entwicklung des Ovars war die Methode zur Untersuchung der BMP-Funktionen nicht geeignet, wurde aber zum *Pax-6*-knock down verwendet.

Injektion von dsRNA in Imagines (aRNAi)

Für die aRNAi der beiden BMP werden *Tribolium*-Weibchen etwa 2-3 Wochen nach der Imaginalhäutung eingesetzt (J. Trauner, pers. Mitt.). CO₂-betäubte Käfer werden analog der für Puppen beschriebenen Methode mit den Elytren auf einen Objektträger geklebt. Die Injektion der RNA-Lösung erfolgt mit dem Mikromanipulator in die Integumentalhäute des 7. Abdominalsegmentes. Das Injektionsvolumen wird so bemessen, daß sich die invaginierten Genitalsegmente ausstülpen. Die Elytren lassen sich leicht vom vollständig getrockneten Kleber ablösen und die Käfer erholen sich über Nacht bei 33°C. Die erste Ablage (erste Nacht) ist häufig fast leer, die weiteren Ablagen jedoch schon verwendbar.

Die injizierten Volumina sind bei Puppen- und Käferinjektionen vergleichbar und bewegen sich zwischen 0,10µl und 0,25µl pro Tier. Wegen der etwas geringeren Dehnungsfähigkeit der Puppe, bzw. erhöhten Ausfallraten bei der Imaginalhäutung, liegen Puppen am unteren Bereichsende.

Knock down der *dpp*-Expression mit Morpholino-Oligonucleotiden

Die Synthese eines *Tc'dpp*-Morpholino erfolgte durch Gene Tools, LLC, Corvallis (Sequenz: 5'-GGTATATCAGCATGTTCAAACGCAT-3'). Die Auswahl der Sequenz folgte den Richtlinien des Herstellers. Injiziert wurden 0,2mM und 0,4mM Lösungen in Wasser.

Präparation der RNAi-Embryonen zur in situ-Hybridisierung

Ein konventionelles Devitellinisieren der Embryonen mittels osmotischen Schocks lieferte vermutlich wegen des Injektionsloches in der Vitellinmembran nur geringe Anteile vollständig von der Membran befreiter Embryonen. Die übliche Methode, die Eier in einer Kanüle zu scheren, lieferte vorwiegend Fragmente, was bei dem durch die Injektion limitierten Ausgangsmaterial die Methode ungeeignet machte. Insbesondere *gbb*-RNAi-Embryonen neigen wegen phänotypischer Veränderungen ohnehin stärker zum Zerschneiden.

Aus diesem Grund wurden die Embryonen manuell aus den Vitellinmembranen präpariert.

Zum Lösen der Eier wurden die Objektträger in PEMS gelegt und nach kurzem Einweichen die Eier mit einem feinen Kanülenstrahl abgelöst. Nach dem Überführen der Eier in ein Scintillationsgefäß wurde das PEMS auf 2ml reduziert, 300µl Formalin und 6ml Heptan zugegeben. Für die Fixierung auf dem Horizontalschüttler in der Emulsion sind 10 –15 min

ausreichend. Nach vollständigem Abnehmen beider Phasen werden die Eier im Szintillationsgefäß schockartig mit -80°C -kaltem, absolutem Ethanol aufgewirbelt und unmittelbar darauf, ein- oder mehrfach, in ein Blockschälchen mit frischem -80°C -kaltem, absolutem Ethanol überführt. Mitgeschleppte Reste von ausgefallenen Puffersalzen und partiell ethanollöslichem Heptan werden so beseitigt. Im klaren Ethanol kann der Blähvorgang beobachtet werden, der im Idealfall zu einem vollständigen Ablösen der Vitellinmembran von Amnion und Dotter führt. Durch den günstigen Brechungsindex des Ethanol ist die Vitellinmembran ziemlich transparent und stärkere Phänotypen können identifiziert werden. So ist eine gewisse Vorselektion möglich. Gelagert werden die Embryonen in Methanol bei -20°C . Glaswaren sind in allen Schritten Plastikwaren vorzuziehen, da die unpolare Vitellinmembran an letzteren sehr gut haftet. Für die Präparation müssen die Embryonen (wieder in absolutem Ethanol, Methanol löst die Kleber) auf Klebefolie (Aslan DK28 - semipermanente Doppelklebefolie, ASLAN, Schwarz GmbH & Co. KG, Overath) aufgetropft werden.

Dabei gibt es zwei Varianten:

Erstens: Die Embryonen werden direkt auf transparente, doppelseitige Klebefolie aufgebracht, die in eine 3cm-Petrischale geklebt ist. Der Vorteil ist, daß präparierte Embryonen losgelöst bleiben und nur die Vitellinmembran Affinität zur Folie besitzt. Nachteil ist, daß sich auch Eier mit Membran nach einiger Zeit lösen und sich die Embryonen optisch kaum gegen den mit der Zeit opak werdenden Kleber abheben.

Zweitens: Die Embryonen werden auf TESA 4124 (braunes Packband, tesa AG, Hamburg) aufgebracht, das seinerseits auf der o.g. Folie klebt. Nachteil ist, daß die Embryonen ständig in Schwebe gehalten werden müssen, weil auch sie zum irreversiblen Ankleben neigen. Vorteil ist das festere Anhaften der Membran, die größere Stabilität des Klebers und der dunkle Hintergrund, der das Präparieren wesentlich erleichtert.

Der über den aufgeklebten Embryonen stehende Alkoholtropfen wird abgesaugt, und die Embryonen sofort mit Wasser (aqua dest.) überschichtet. Nur in Wasser haftet die Vitellinmembran auf den Klebern bzw. ist spröde und zerreißbar. In Ethanol ist sie zäh-ledrig und nicht manipulierbar. Die Präparation erfolgt mit Wolframnadeln. Devitellinisierte Embryonen werden mit Ethanol abgelöst und in eiskaltes Methanol überführt.

Da auch die adulte RNAi mit *dpp*- und *gbb*-dsRNA die Fertilität injizierter Käfer reduziert, sich darüberhinaus aber die oben beschriebene Methode bewährt hat, wurde sie auch hier für die Gewinnung devitellinierter Embryonen eingesetzt. Nach dem Dechorionisieren wurden die Eier in diesem Fall direkt in formaldehyd- und wassergesättigtem Heptan (durch Ausschütteln aus PEMS/Formaldehyd) fixiert. Die Fixierung dauerte 20 min im Siebchen unter 3-4-maligem Aufschütteln. Obwohl die Permeation der Vitellinmembran durch Heptan/Butanol-Gemische bei *Drosophila* im Sekundenzeitraum abläuft, resultierten Fixierzeiten unter 10min teilweise in nicht ausreichend fixierten Embryonen, ohne daß die Vitellinmembran besser zu entfernen gewesen wäre. Während der Fixierung lassen sich aufgrund der günstigen optischen Eigenschaften des Heptans die starken *dpp*-Phänotypen quantitativ auswerten, was nach der Präparation nicht mehr möglich ist. Anschließend wurde wie oben beschrieben verfahren.

In situ Hybridisierung und Färbungen

Die in situ-Hybridisierungen folgten Tautz and Pfeifle (1989) und Prpic et. al. (2001). Zur Kontrolle wurde markierte senseRNA mit der entsprechenden antisense-Sonde auf SB-Wildtypembryonen parallel prozessiert.

Die Konjugate α DIG-POD, α DIG-AP, α Flu-POD, α Flu-AP, sowie Streptavidin- β Gal wurden von Roche, Mannheim bezogen. Für die Doppel-in situ-Hybridisierung wurde eine Biotinyl-Tyramid-Reaktion mit dem „TSA Biotin System“ von NEN Life Sciences/ Perkin Elmer als Amplifikationsschritt eingesetzt. Die hier einzusetzende Substratkonzentration (Czerny pers. Mitt.) und Reaktionszeit wurde empirisch ermittelt: 10 μ l Substrat in 490 μ l Amplifikationspuffer für 25' bei RT.

Die gefärbten Embryonen wurden in PBS unter Zusatz von 1:1000 Bisbenzimid zur Gegenfärbung der DNA bei 4°C gelagert. Speziell im Falle von *gbb*-in situ-Hybridisierungen wurde versucht, die Aufbewahrungszeiten zu minimieren, um sicher zu sein, daß die charakteristische gradientenformige Expression, nicht auf Diffusionsartefakten beruht. In diesem Zusammenhang erwies es sich als schwierig das genaue Muster der „medianen *gbb*-Domäne“ (nicht gradientenartig) nach einer längeren Lagerung noch exakt zu bestimmen. Es zeigte sich auch, daß eigentlich relativ stabile AP-Produkte aus der NBT/BCIP-Reaktion, selbst durch geringste Spuren von Formaldehyd aus der Postfixierung mobilisiert werden. Dies geht auch mit einem Braun-Blau-Farbumschlag der Reaktionsprodukte einher.

Lichtmikroskopische Untersuchung und Fotographie

Expressionsmuster wurden mit einem Zeiss Axiophot und einem Nikon Stereomikroskop untersucht und fotografiert. Als Kamera diente eine ProgResC14, Jenoptik. Beide Mikroskope waren mit Fluoreszenzauflichtbeleuchtung und den geeigneten Filtersätzen ausgestattet, um zu den Hellfeldaufnahmen deckungsgleiche Bisbenzimid-Kernfärbungen aufzunehmen. Bei Mikrografien von Blastoderm-, Keimrudimentstadien und der Wachstumzone erwies es sich als vorteilhaft, auf Kosten der Auflösung die größere Tiefenschärfe des Stereomikroskopes zu nutzen, um bestimmte, dreidimensionale Konstellationen besser darzustellen. Für die Darstellung von *gbb*- und *dpp*-Expressionsmustern wurde für die Mikroskopie eine Einbettung in Wasser bevorzugt, da sich optische Vorteile gegenüber der Einbettung in verdünntem Glycerin zeigten. Für die Bildbearbeitung wurde Adobe Photoshop CS benutzt.

Kutikulaanalyse

Für Kutikulapräparationen wurden 3-Tage-Gelege bei 33°C genommen. Diese Eier — ebenso wie Eier aus eRNAi und Morpholino-Injektionen — wurden weitere 4 Tage nachreifen gelassen. Nicht injizierte Eier wurden zuerst mit Hypochlorit-Behandlung von Mehl und Chorion befreit. Die Einbettung erfolgte in einem 1:1-Gemisch von Hoyers Medium und Milchsäure bei 60°C über Nacht.

Konfokale Mikroskopie

Das zur Verfügung stehende LSM war ein LeicaTCS NT. Die bei 488nm (Ar) angeregte Autofluoreszenz wie oben beschrieben eingebetteter Kutikulae, kann durch Detektion eines spektralen Fensters zwischen 510nm und 680nm aufgenommen werden. Die Durchlaßmaxima müssen individuell auf das Präparat abgestimmt werden. Im tiefroten Bereich reduziert sich das Hintergrundrauschen auf Kosten der Intensität. In Einzelfällen konnte durch Zuschalten des HeNe-Lasers (633nm) ein verbesserte Darstellung erreicht werden.

3 ERGEBNISSE

Die Ergebnisse der Expressionsanalysen und knock down-Experimente werden für die beiden untersuchten BMP nacheinander behandelt. Dabei wird jeweils zunächst die Wildtypexpression des BMP beschrieben, dann morphologische Aspekte des knock down-Phänotyps und schließlich die Auswirkung des BMP-knock downs auf die Expression molekularer Marker während der Embryogenese. Der dramatische Phänotyp des *dpp*-knock downs schränkt den experimentellen Zugang zu *dpp*-Funktionen in späteren ontogenetischen Prozessen ein.

3.1 Decapentaplegic – *dpp*

3.1.1 Die embryonale Expression von *dpp* in *Tribolium castaneum*-Wildtyp

Einige grundlegende Muster der *dpp*-Expression werden von Sanchez-Salazar, Pletcher et al. (1996) beschrieben: Die anteriore, kappenförmige Expression im Blastoderm wird gezeigt, wobei jedoch keine weiteren Daten über die dynamische Entwicklung der *dpp*-Expression bis zur *dpp*-Domäne am Keimstreifrand präsentiert werden. Für die dorsale Keimstreifexpression von *dpp* werden auch segmental-periodische Expressionen („region-specific extensions“) erwähnt, die explizit mit der Entwicklung von Gliedmaßenanlagen in Verbindung gebracht werden. Labrale Expressionen werden dort ebenso gezeigt. Eine Kontinuität zwischen Expressionen im Blastoderm und Expressionen in Keimrudiment und Keimstreif wird nicht berichtet. Der Befund einer mesodermalen Expression in der Wachstumszone des Keimstreifs ist zweifelhaft und kann vielmehr durch die zu diesem Zeitpunkt noch unzureichend bekannten Lageverhältnisse der Keimblattderivate in der Wachstumszone erklärt werden (Übersichten in Berns, 2001; Handel et al., 2005). Das Auftreten einer posterioren, blastodermalen Expression wird in Chen, Handel et al. (2000) erstmals beschrieben.

In der vorliegenden Arbeit wird die dynamische *dpp*-Expression des *Tribolium*-Embryos bis zum Stadium des ausgewachsenen Keimstreifs dargestellt und damit insbesondere eine Verbindung zwischen den blastodermalen *dpp*-Expressionen und denen des Keimstreifs hergestellt. Dabei werden die Expressionen des Amnions und der Wachstumszone besonders berücksichtigt, sowie die für die Wechselwirkung der beiden

untersuchten BMP, relevanten Details. In situ-Hybridisierung mit *Tc'orthodenticle-1* (Li et al., 1996) wurde als Vergleichsmarker für die anteriore *dpp*-Expression benutzt. Zwischen der Expression beider Gene ergibt sich eine starke Korrelation. Wenn im weiteren Verlauf auf einen *otd-1*-Streifen Bezug genommen wird, so ist die gürtelförmige Expression nach Rückzug vom anterioren Pol und vor Einstellung einer DV-Asymmetrie gemeint. Die Wildtypexpression dieses Gens in späteren Stadien wird bei den RNAi-Ergebnissen genauer beschrieben.

Die frühe Embryonalentwicklung bis zum Schluß des Serosafensters

Dpp wird anterior früh als rotationssymmetrische Kappe exprimiert, die posterior bei etwa 70% EL bis 50% EL als Gradient endet, anfangs ohne erkennbare dorsoventrale Asymmetrie (nicht gezeigt & Chen et al., 2000). In der frühen Phase der Blastodermdifferenzierung, noch bevor die Serosazellen sich deutlich durch Zelldurchmesser und DNA-Gehalt auszeichnen, zieht sich die *dpp*-Expression von anterior zur Grenze zwischen Serosa und Keimrudiment zurück. Diese Veränderung geschieht dorsoventral asymmetrisch (Abb. 7a). Es bildet sich zunächst ein noch recht breiter Streifen stärkerer Expression aus (Abb. 7b) Diese Expression bildet vorübergehend einen Gradienten mit umgekehrter Polarität, d.h. mit einem Minimum am anterioren Pol, wobei die Expression ventral stärker wird, sodaß zunächst eine – von lateral gesehen – keilförmige Domäne entsteht. Betrachtet man weniger das kleinräumige Muster als die gesamte Verteilung der Expression bezüglich der AP-Achse, also die äußersten Grenzen jeglicher *dpp*-Expression, so liegt die Expression im transienten *otd-1*-Streifen. Die dynamische Veränderung der Expressionen beider BMP spielen sich zunächst innerhalb dieses Areal ab, wenn auch dorsoventral asymmetrisch. Mit zunehmender Fokussierung auf die Serosa-Embryo-Grenzlinie erscheinen Zellen mit stärkster Expression am Rande der Serosakappe als nach posterior gekippter Gürtel, womit die weitgehende Überlappung mit der *otd-1*-Expression noch deutlicher wird (vgl. Abb. 7c & e). Ventral bleibt die Domäne breiter und erscheint, von ventral gesehen, nahe der Mittellinie rautenförmig (Abb. 7g,h). Diese anteroventrale *dpp*-Domäne umfaßt Serosazellen, aber zwischen den präsumptiven Kopflappen auch Zellen, die aufgrund ihrer Morphologie und ihres DNA-Gehaltes nicht der Serosa zugehören (Abb. 7g, zwischen Pfeilspitzen in h). Diese Zellen liegen vermutlich im Bereich der *twi*-Domäne oder nach deren Rückzug direkt anterior von dieser. Zellen in dieser medianen Einbuchtung unterscheiden sich sowohl von Serosazellen, wie auch benachbarten embryonalen Zellen, durch intermediäre Zell- und Kerngröße. Die Expressionstärke ist in diesem Bereich deutlich

niedriger als in den unmittelbar benachbarten Serosazellen. Zwischen dem posterioren Ende dieser Domäne und dem äußerst dorsalen Punkt der *dpp*-Expression spannt sich eine Domäne schwächerer *dpp*-Expression auf. Diese embryonale *dpp*-Domäne in den präsumptiven Kopflappen deckt sich weitgehend mit der *otd-1*-Expression dieses Stadiums (vgl. Abb. 7c und e, d und j) und ist wahrscheinlich der persistierende Rest des frühen *dpp*-Gradienten. Diese schwache Expression wird im Laufe der Einsenkung der Kopflappenregion stärker, wird aber gleichzeitig immer mehr zum lateralen Rand des Keimrudimentes verdrängt. Ihre endgültige Position ist in der dorsalen Spitze der *otd-1*-Domäne (Abb. 7j).

Bereits bevor sich die Serosa-Embryo-Grenzlinie im dorsalen Bereich weiter ausdehnt, exprimieren Zellen dieser Linie, die posterior der frühen *otd-1*-Expression liegen, schwach oder überhaupt nicht *dpp* und stellen damit die dorsale Grenze dieser *dpp*-Domäne dar. Diese zunächst unsichere Korrelation wird mit fortschreitender Verdichtung des Keimrudimentes deutlicher (Abb. 7a, c, e). Durch die dorsale Expansion der Serosa wird dort auch die gesamte Grenzlinie gestreckt und die *dpp*-Domäne stark verschmälert. Die *dpp*-exprimierende Zelllinie ist dann nur noch 1-2 Zellen breit und weist teilweise Lücken auf, bzw. ist im äußerst posterioren Bereich der Serosa-Embryo-Grenzlinie nicht mehr nachzuweisen (Abb. 8c). Im anterioren Bereich sind diese *dpp*-exprimierenden Zellen aufgrund ihrer polyploiden Kerne deutlich der Serosa zuzuordnen. An der anterioren Serosa-Embryo-Grenze findet sich eine Population von Zellen identischer Kern- und Zellgröße, die unmittelbar in das ventrale Areal übergeht (Abb. 7g, zwischen Pfeilspitzen in h). Für diese schon in Bisbenzimidfärbung recht gut definierte Zellpopulation wird im Folgenden der Begriff „intermediäre Zellen“ gebraucht. Im anterioren Bereich exprimieren sie ebenfalls *dpp*.

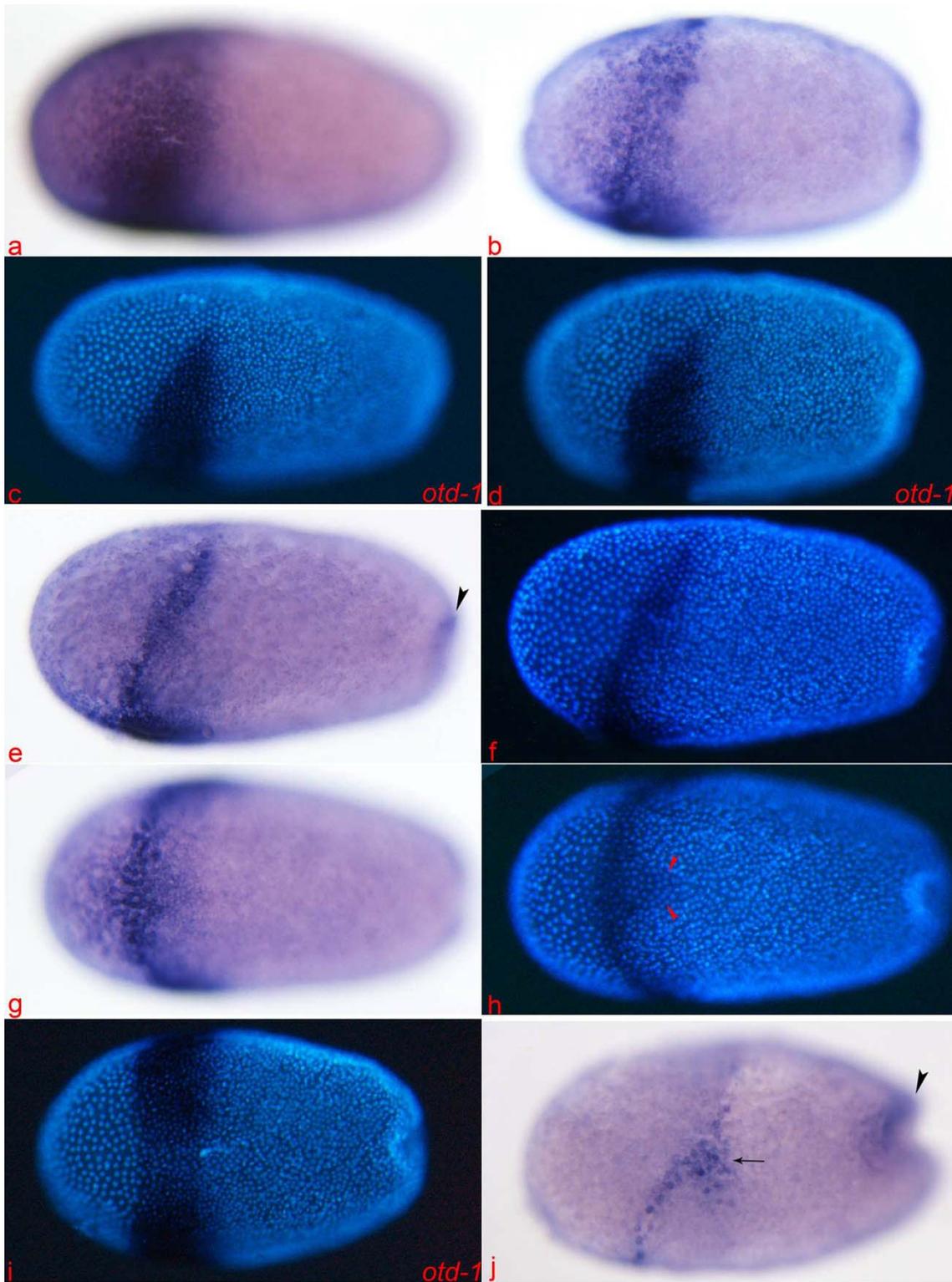
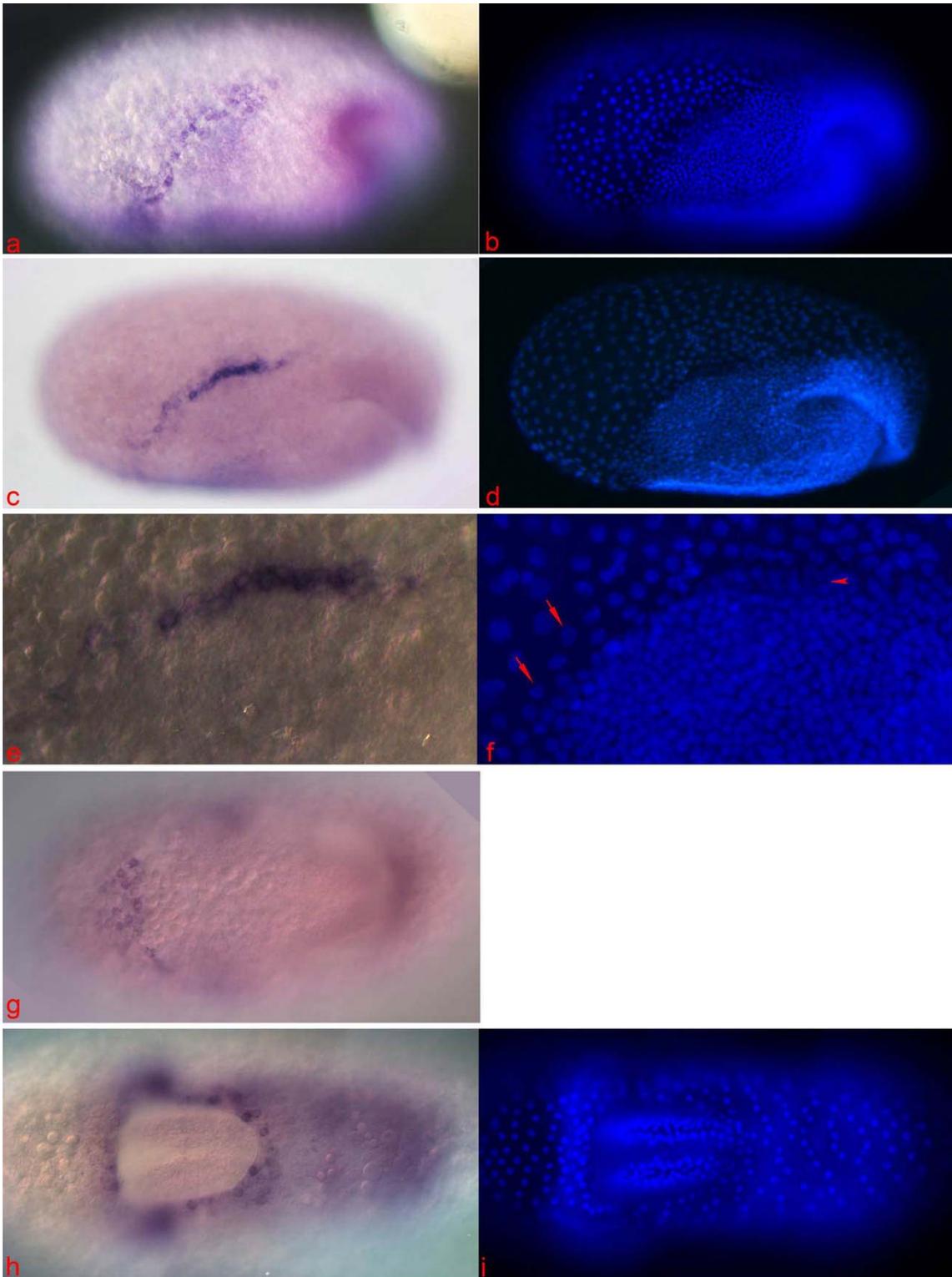


Abb. 7 (Seite 54): Wildtyp-Expression von *Tc'dpp* und *Tc'otd-1*: **a**, von lateral: Blastoderm, *dpp*-Kappe zeigt ein ventrales Maximum. **b**, von lateral, die Serosadifferenzierung ist abgeschlossen, es ist eine zunehmende Fokussierung der *dpp*-Expression auf die Serosa-Embryo-Grenze, durch die Außengrenzen der Expression ist der Einfluß des AP-Systems besonders deutlich; die epitheliale Verdichtung sowie die *dpp*-Expression am posterioren Pol werden deutlicher. **c**, *otd-1*-Expression direkt nach der Serosadifferenzierung. **d**, posterior pit-Stadium, von lateral, *otd-1*-Expression, Beginn der medianen Einbuchtung vor dem prospektiven Mesoderm mit ventralem Auseinanderweichen der *otd-1*-Expression. **e**, posterior pit-Stadium, wie d, starke Expression im Serosarand, deren dorsoposteriores Ende deutlich sichtbar ist; diffuse Kopflappen-Domäne und posteriore Domäne mit einem Maximum im dorsalen posterior pit-Rand (Pfeilspitze). **f**, Embryo aus e: Bisbenzimid-Kernfärbung. **g**, Embryo aus e: von ventral, stärkste *dpp*-Expression im Serosarand, *dpp*-Expression in den „intermediären“ Zellen (Pfeilspitzen in h), schwächere Expressionen in der ventralen Serosafläche und den Kopflappen. **h**, Embryo aus g: Bisbenzimid-Kernfärbung. **i**, Embryo aus d, Ventralansicht vgl. mit g, *Tc'otd-1*-Expression. **j**, von lateral, *dpp*-Domäne der Kopflappen wird stärker, weicht aber zur Serosa-Embryo-Grenze zurück (Pfeil), die posteriore *dpp*-Expression liegt in diesem Stadium transient in der posterioren Amnionfalte (Pfeilspitze).

Abb. 8 (Seite 56): Wildtyp-Expression von *Tc'dpp* und *Tc'otd*: **a**, von ventrolateral: kondensierendes Keimrudiment, die posteriore Amnionfalte überschreitet posterioren Pol, nur noch eine schwache *dpp*-Expression in der Kopflappenfläche. **b**, Embryo aus a, Bisbenzimid-Kernfärbung. **c**, von lateral; die *dpp*-Expression der Kopflappen ist vollständig auf den Rand beschränkt; die posteriore *dpp*-Domäne ist in der Tiefe der Einfaltung verschwunden, vgl. auch g. **d**, Embryo aus c, Bisbenzimid-Kernfärbung. **e**, Detailvergrößerung des Embryo aus c, neben Serosazellen (Pfeile in f) und Embryozellen (Pfeilspitze in f) exprimieren intermediäre Zellen *dpp*. **f**, Embryo aus e: Bisbenzimid-Kernfärbung. **g**, Stadium wie c: von ventral, die *dpp*-Expression in der ventralen Serosafläche persistiert zunächst, auch hier gibt es keine *dpp*-Expression im Scheitel der posterioren Amnionfalte. **h**, Keimrudiment mit weit offenem Serosafenster von ventral, *dpp*-exprimierende Zellen im Fensterrand sind polyploide Serosazellen, die prominenten Domänen am Hinterrand der Kopflappen sind unterhalb der Fokusebene. **i**, Embryo aus h, Bisbenzimid-Kernfärbung.



Die im Folgenden gebrauchten Begriffe „Dach“ und „Boden“ der Wachstumszone sind als rein morphologische Begriffe zu verstehen. Ebenso bezeichnet der Begriff „Endplatte“ den posterioren Teil der Wachstumszone, der als dickes Epithel das Ende des Embryos und damit den Übergang von „Dach“ in „Boden“ bildet. Die Begriffe haben den Vorteil, sich zunächst nicht auf die Herkunft der Gewebe und Expressionsverhältnisse festlegen zu müssen, zumal molekulare Marker – wie *twi* und *gbb* für die „Endplatte“ – zeitlichen Veränderungen unterworfen sind. Ansonsten folgt die Terminologie Handel et al. (2000) und Handel et al. (2005)

Zeitgleich mit der anterioren Domäne, läßt sich eine posteriore nachweisen (Chen et al., 2000), lange bevor sich das Epithel am posterioren Pol verdichtet. Wegen ihres geringen Durchmessers ist es hier richtiger von einer scheibenförmigen terminalen *dpp*-Expression zu sprechen als von einer kappenartigen. Schon bei geringer Einsenkung der Primitivgrube beschränkt sich diese Expression, unter Aussparung des konkaven Epithels auf deren lateralen und dorsalen Rand, der späteren posterioren Amnionfalte (Abb. 7b, e, & j; Abb. 9). Bei weiter fortgeschrittener Invagination dieser prospektiven Wachstumszone, durch die Bewegung der posterioren Amnionfalte, wird die sichtbare Öffnung zum Spalt (vgl. Abb. 1). Es zeigen sich Expressionen ventral und dorsal des Spaltes also in „Boden“ (Keimstreif) und „Dach“ (Amnion) der prospektiven Wachstumszone (Abb. 9c).

Es zeichnet sich das Grundmuster der Wachstumszonenexpression als bogenförmige ventral bzw. anterior (zum Mesoderm) offene *dpp*-Domäne ab. Durch die Bewegung der posterioren Amnionfalte wird die Orientierung dieser Domäne im Ei umgekehrt. Ist sie zunächst als Expressionsmaximum im Scheitel der entstehenden Amnionfalte aus der terminalen *dpp*-Domäne hervorgegangen, so wird sie mit dem Fortschreiten der Amnionfalte gewissermaßen im Bereich der Wachstumszone „zurückgelassen“ und verschwindet von der Oberfläche (keine posteriore oberflächliche Expression in Abb. 8c & g), verdeckt durch die Dotterfalte (Handel et al., 2000) in der Amnionfalte. Anfangs hatte sie annähernd die Form eines ventral offenen „U“. In ihrer endgültigen Position zeigt der Bogen des „U“ nach ventral und liegt in der Endplatte der Wachstumszone, während die Schenkel des „U“ in der Endplatte zunächst nach dorsal (im Ei) zeigen, dann aber nach anterior in den Keimstreif umknicken. In jungen Keimrudimenten mit weit offenem, U-förmigem Serosafenster beschränkt sich die *dpp*-Expression zunächst noch auf das dicke Epithel der Endplatte (Abb. 14b, e, & g), kurze Zeit später (Serosafenster noch weit offen, aber abgerundet) dehnt sie sich in den Boden der Wachstumszone aus. Diese ventralen Anteile enden in der mittleren Wachstumszone. Die Topologie dieses Expressionsmusters verändert sich im Laufe der

Entwicklung bis zur Bildung des Proctodaeums kaum (dannach verschwindet sie, Abb. 32). Lediglich Ausdehnung und Expressionstärke sind lokalen und zeitlichen Veränderungen unterworfen. Gerade die paramediane Expression im Wachstumszonenboden könnte mit dem Entstehungsprozeß neuer Segmente periodischen Änderungen unterworfen sein, da in Individuen unterschiedlichster Stadien diese Domänen ebenso häufig nachzuweisen sind, wie sie fehlen. Qualitätsunterschiede der in situ-Hybridisierungen erklären diese Beobachtung nicht, da auch in schwach gefärbten Embryonen häufig relativ starke Signale hier zu finden sind und umgekehrt. Im jungen Keimstreif erhält die Wachstumszonenexpression durch die Expressionen im Amnion Anschluß an die – inzwischen nahezu lückenlose – *dpp*-Expression im Hinterrand des Serosafensters (in Abb. 10e noch ohne Anschluß, Abb. 10f mit Anschluß). Die posteriore bogenförmige Expression umspannt eine signalfreie zentrale Zone, die sehr genau mit der posterioren *twi*-Domäne der Wachstumszone zusammenfällt (vergleiche für *twi* Abb. 30c; in jungen Keimstreifen (T2 in Entstehung) wird auch *wingless* in dieser Endplatte exprimiert, Daten nicht gezeigt). Die durch *dpp* und *twi* markierten Gewebe bilden zusammen den terminalen Teil des Rudimentes und gehen dorsal in den Boden der Wachstumszone über. In den untersuchten Embryonen liegt gerade im Bereich des Umbiegens in den Boden der Wachstumszone die stärkste *dpp*-Expression in der Wachstumszone (Abb. 14e & g). Diese *dpp*-Domänen verlängern sich im Laufe der Entwicklung nach anterior. Die Expression von *dpp* wird im mittleren Wachstumszonenboden offensichtlich abgeregelt (also posterior des Bereichs neugebildeter Segmente, Abb. 13d), so daß sich anterior der Wachstumszone im Wildtyp zu keinem Zeitpunkt der Entwicklung eine *dpp*-Expression im ventralen Ektoderm findet. In Präparaten mit abrissem Amnion zeigt sich, daß die *dpp*-Expression der Wachstumszone in den Seitenplatten (Ektoderm) liegt. Diese anterioren Anteile haben zunächst einen ziemlich weiten Abstand voneinander. Von der Entwicklung vom Keimrudiment bis zum jungen Keimstreif, im Zuge der Gastrulation ändert sich dies, wenn der Bereich, indem sich die Seitenplatten median genähert haben bis zum ersten Thorakalsegment erstreckt. Später zeichnen die Expressionen dann die Form des Bereiches nach, in dem das Mesoderm der Wachstumszone direkten Kontakt zum Lumen der Amnionhöhle hat („inner layer“, (Handel et al., 2005). Von ventral betrachtet ein etwa dreieckiges Areal. Bei detaillierter Betrachtung und an optischen Anschnitten läßt sich jedoch erkennen, daß die *dpp*-Domänen keineswegs unmittelbar am Rand der Seitenplattenektoderms liegen und etwa an das Mesoderm grenzen. Die *dpp*-Domänen verlaufen zwar parallel zum Rand, lassen jedoch einen Abstand von etwa 5 Zellbreiten (Größenordnung !) zu diesem (Abb. 14i). Der Zellstreifen zwischen *dpp*-Expression und ektodermalem Rand exprimiert *gbb*

(Abb. 29). Auch die terminale *twist*-Domäne biegt aus der Endplatte nach anterior in den Boden der Wachstumszone um und verläuft noch ein kurzes Stück zwischen den *gbb*-Domänen nach anterior (Abb. 30; auch (Handel et al., 2005). Das Dach der Amnionhöhle über der Wachstumszone des jungen Keimrudiments wird von einem dicken, annähernd kuboidalen Epithel gebildet. Vom oben beschriebenen terminalen *dpp*-Bogen gehen im präsumptiven Amnion konvergierend zwei longitudinale *dpp* Domänen nach anterior, bis zu der unten beschriebenen transversalen Expression über der Übergangszone zum Keimstreif (Abb. 10e, f). Zwischen den Längsstreifen spannt sich ein Dreieck schwächerer Expression auf (Abb. 11a, f). Im Bereich anterior der Wachstumszone zeigt die amniotische Expression bereits im frühen Keimstreif Anzeichen einer AP-Periodizität (Abb. 8h, Abb. 10, Abb. 11), die sie bis zum Abschluß des Keimstreifwachstums beibehält (Abb. 12). Die blastodermale posteriore *dpp*-Domäne bildet also letztlich die *dpp*-Expression der Wachstumszone. Nach Abschluß des Keimstreifwachstums wird die Expression im Telson abgeschaltet bis auf paarige Foci im lateral-distalen Rand des Proctodaeums. Diese Expressionen sind sehr umgrenzt und schwach (Abb. 32). Die zu diesem Zeitpunkt nächstliegende Expression ist die des posterioren Randes des Amnions. Regelmäßig bleiben an der Abrißlinie des Amnions Zellen zurück die sehr stark *dpp* exprimieren und sich auch in ihrer flachen Zellmorphologie stark vom Keimstreifepithel unterscheiden. Außer den genannten, gibt es im Wildtyp keine *dpp*-Expressionen im Telson.

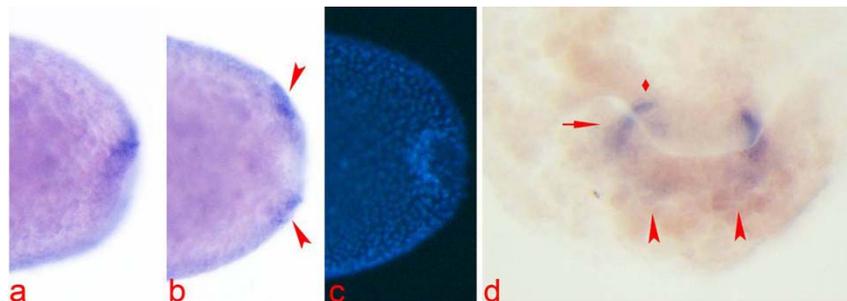


Abb. 9: Entwicklung der posterioren *dpp*-Domäne im Wildtyp: **a**, Detail aus Abb. 7e, von lateral, *dpp*-Expression im dorsalen und lateralen Rand des posterior pit (in Abb. 7e in gleicher Lage mit Pfeilspitze markiert). **b**, Embryo aus a, von ventral, laterale Enden der ventral offenen Domäne (Pfeile), der konkave Epithelbereich ist expressionsfrei. **c**, Übersicht zu b in, Bisbenzimid-Kernfärbung. **d**, von posteroventral, laterale *dpp*-Expressionen in der posterioren Amnionfalte (Pfeil) und jenseits des Spaltes im Ektoderm (Raute), diffuse Expression in der posterioren Amnionfalte (Pfeilspitzen). In a-c ist der posteriore Eipol rechts, in d ist der posteriore Eipol unten.

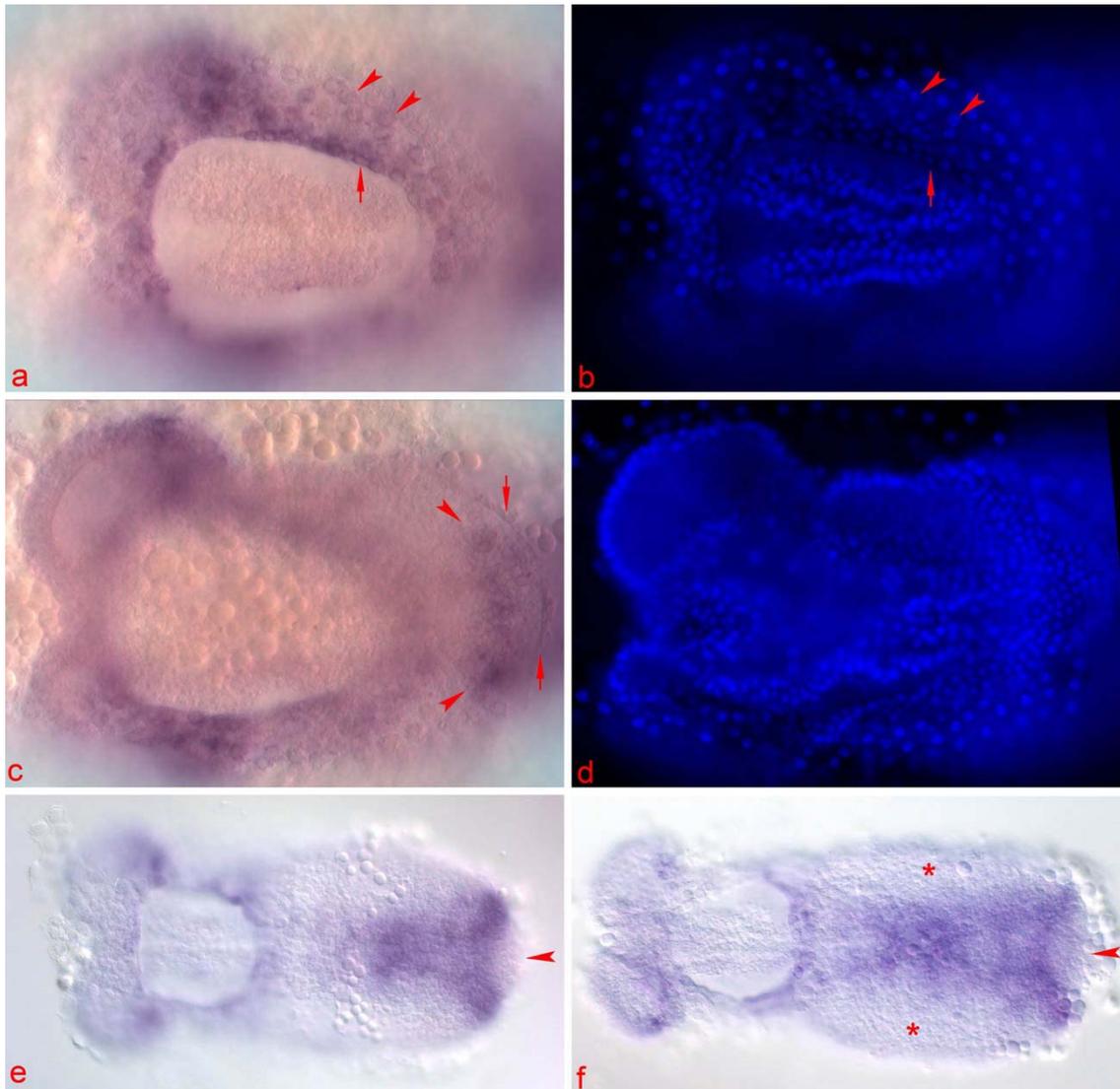


Abb. 10: Wildtyp-Expression von Tc'*dpp* am Serosafensterrand und im Amnion des jungen Keimrudimentes: **a**, von ventral: die *dpp*-exprimierenden Zellen im Serosafensterrand (Pfeil, auch in **b**) unterscheiden sich von polyploiden *dpp*-exprimierenden Serosazellen (Pfeilspitzen) im umliegenden Epithel (quenching durch das *dpp*-Signal ist zu berücksichtigen). **b**, Embryo aus **a**, Bisbenzimid-Kernfärbung. **c**, Embryo aus **a**, tieferer optischer Anschnitt: *dpp*-Expression im Amnionepithel (Pfeilspitzen), Anschnitt der Serosa (Pfeile). **d**, Embryo aus **c**, Bisbenzimid-Kernfärbung. **e**, junges Keimrudiment, die *dpp*-Expression im Amnion endet etwa über/hinter T1, ausgehend von der bogenförmigen posterioren Domäne in der „Endplatte“, terminale expressionsfreie Zone (Pfeilspitze) Damit sind anteriore und posteriore amniotische *dpp*-Domänen noch voneinander getrennt. **f**, junges Keimrudiment, geringfügig älter als in **e**; die posteriore *dpp*-Expression hat nun Anschluß zur Domäne am Serosafenster-Hinterrand erlangt, und bildet eine Zusammenhängende amniotische *dpp*-Expression; die *dpp*-Expression erreicht damit auch hinter dem Serosafenster den Keimstreifrand, neben expressionsfreier terminaler Zone (Pfeilspitze), zeichnen sich expressionsfreie Flanken der Wachstumszone ab: diese expressionsfreien Flanken sind ein konstantes Merkmal der posterioren Amnionexpression (Sterne).

Etwa zeitgleich mit der Ausbildung der posterioren Amnionfalte, noch bevor die anteriore Amnionfalte sich erhebt, ziehen sich die oben beschriebenen schwachen, flächigen *dpp*-Expression, zum Rand zurück und verstärken sich zu prominenten Domänen an der Serosagrenze (Abb. 8a-f). Dabei markieren sie die posterodorsale Ecke der *otd-1*-Expression. Diese *dpp*-Expressionen liegen direkt an der Serosa sind aber deutlich stärker als die Expression dort.

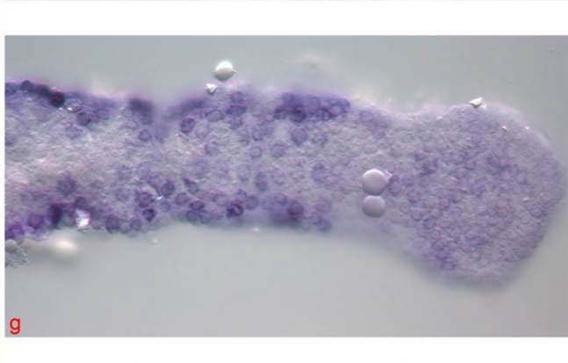
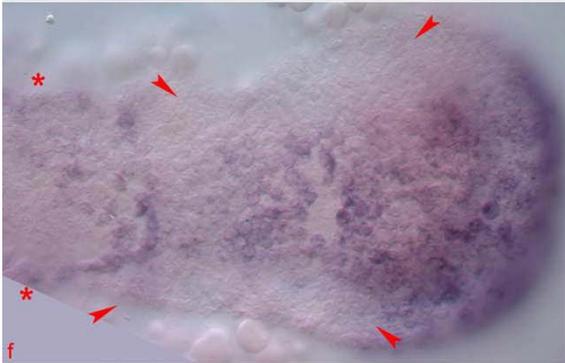
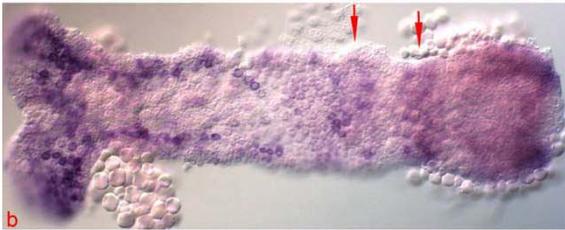
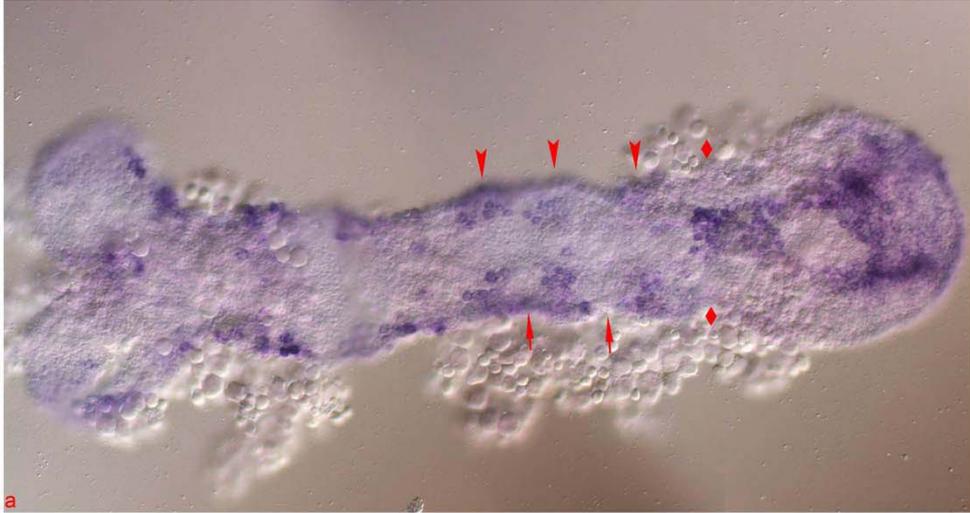
Bei der Invagination der Kopflappen bleibt unklar, ob und wieviele Anteile des Kopflappenepithels in das randliche Dach der Amnionhöhle eingehen, die dann später doch im Embryo sensu stricto aufgehen. Insbesondere die o.g. lateralen Expressionen finden sich in Keimstreif und Dach der Amnionhöhle an dieser Stelle (Abb. 8, Abb. 10a-d).

Nachdem die Invagination bis zur Bildung eines weiten Serosafensters fortgeschritten ist, läßt sich ringsum in dessen Rand *dpp*-Expression nachweisen (Abb. 8h & Abb. 10). Insgesamt scheint die Expression im Bereich der vorderen Amnionfalte und auch in deren lateralem Teil geschlossener, während posterior sich auch Zellen ohne Signal direkt am Übergang beider Blätter finden (Abb. 8h). Auch Serosazellen in der Nähe des Fensters exprimieren *dpp*: Anterior persistiert zunächst noch der anteriore Teil der ventralen Domäne aus dem Stadium des differenzierten Blastoderms (Abb. 8g), aber auch lateral sind mit eng werdendem Serosafenster immer mehr *dpp*-exprimierende Serosazellen zu finden (Abb. 8h). Direkt am Fensterhinterrand verbreitert sich die Expression im Amnion nach lateral (Abb. 10e). Nach Rückzug des Dotterkeils zeigt sich, daß die Expression sich auch von posterior ins Dach der Wachstumszone ausgedehnt hat (Abb. 10c). Sie endet zunächst in einem transversalen Streifen im Bereich posterior von T1. Von hier aus gewinnt die Domäne Anschluß an die *dpp*-Domäne am Hinterrand des Serosafensters (Abb. 10e,f). Die Breite des Streifen verringert sich sehr bald, dennoch bleibt an dieser Stellen ein Expressionsmaximum über etwa ein Drittel der Keimstreifbreite erhalten. Diese Expression und das posterior davon aufgespannte Dreieck bleiben als konstantes Expressionsmuster bis zum Ende des Keimstreifwachstums unverändert. Die relative Lage bleibt konstant: Das Maximum liegt immer über der Zone neu entstehender Segmente (Übergangszone). Die Expression anterior davon ist dynamischer. Unmittelbar anterior des Maximums verbreitert sie sich bis zum Keimstreifrand. Dies ergibt sich schon früh beim Zusammenschluß mit den Expressionen am Fensterhinterrand (Abb. 10f). Nach Schluß des Serosafenster etwa zeitgleich mit der Abgliederung von A1 bildet sich dann zumindest im lateralen Amnion ein segmentales Muster von Querstreifen (Abb. 11). Die expressionfreien Flanken der Wachstumszone sind ein sehr konstantes Merkmal, die unveränderte Form auch in älteren Keimstreifen zeigt, daß

erst anterior von ihnen der Ektodermrand mit *dpp*-exprimierenden Zellen in Kontakt kommt (vgl. Abb. 10f, Abb. 11). Das Serosafenster schließt sich über dem Mandibularsegment. Das Amnion über dem Gnathum besteht von Beginn an vorwiegend aus Plattenepithel. Das Epithel über den Kopflappen enthält zumindest anfangs viel kuboidale Anteile, es zeigt sowohl randlich, wie in der Fläche eine starke *dpp*-Expression (Abb. 11). Plattenepithel über den Keimstreifen ist sehr schwierig zu präparieren und kaum intakt durch die in situ-Hybridisierungsprozedur zu bringen. Daher sind die Expressionsdaten für das mediane Drittel Amnionepithel über Gnathum und Thorax, wo der Keimstreifen breiter ist, unsicher. Die lateralen Drittel der beiden Tagmata sind unproblematischer. Hier sind die Zellen deutlich kompakter, lassen sich aber klar als Amnionzellen ansprechen. Auch im Abdomen lassen sich eher intakte Epithelien präparieren, obwohl hier in älteren Segmenten ebenfalls Plattenepithel vorliegt.

Ein charakteristisches Merkmal ist auch die unregelmäßig-fleckige Expression von *dpp* (z.B. Abb. 11). Die im Gegensatz hierzu sehr gleichmäßige Expression von *gbb* und anderen molekularen Markern im Amnion deutet darauf hin, daß nicht methodische Faktoren, wie etwa die Beschaffenheit der Sonde oder subzelluläre Begebenheiten die Ursache sind. Diese unregelmäßig-fleckenförmige Transkription könnte vielmehr ein inhärentes Merkmal der *dpp*-Expression in *Tribolium* sein.

Abb. 11 (Seite 63): Wildtyp-*dpp*-Expression im Amnion junger Keimstreifen, **a**, von ventral, Stadium etwa zur Entstehung von T3; eine dreieckige *dpp*-Domäne liegt über der Wachstumszone (Ruptur) mit lateralen Maxima, die terminale expressionsfreie Zone ist hier verdeckt, gnathales Amnion unregelmäßig beschädigt, über Labialsegment und Thorax sind die lateralen Drittel des Amnions erhalten und zeigen segmental alternierende *dpp*-Expression (Pfeilspitzen) und expressionfreie Bereiche (Pfeile), das mediane Expressionsmaximum liegt über der anterioren Wachstumszone /Übergangszonen (zwischen Rauten); einzelne stark *dpp*-exprimierende Zellen liegen regelmäßig in der Nähe präsumptiver Extremitätenanlagen. **b**, Keimstreif geringfügig jünger als **a**, starke amniotische Expression liegen über den posterioren Kopflappen, über dem Gnathum liegen randliche amniotische Expressionen, segmental periodische Streifen zeichnen sich im thorakalen Amnion (Pfeile) ab, die *dpp*-Expression über der Wachstumszone ist außerhalb der Schärfenebene, die expressionfreie terminale Domäne ist sichtbar. **c**, Embryo aus **b**, Schärfenebene liegt auf dem Ektoderm, kaum *dpp*-Expression im Ektoderm, (Ausnahme Kopflappen), vereinzelte randliche Zellen zeigen schwache *dpp*-Expression. **d**, Ausschnittsvergrößerung aus **b**, amniotische Plattenepithelzellen im Bereich des Mandibularsegmentes exprimieren *dpp*. **e**, Ausschnittsvergrößerung aus **b**, es zeigt sich noch keine Expression in der optisch angeschnittenen stomodealen Anlage (Pfeilspitze), auch *dpp*-exprimierende Zellen am ektodermalen Rand des Maxillarsegmentes sind aufgrund ihrer Kerngröße dem Amnion zuzuordnen (Pfeile). **f**, amniotische Expression über der Wachstumszone eines jungen Keimstreifs, charakteristische expressionsfreie Flanken der Wachstumszone (zwischen Pfeilspitzen), Übergang der amniotischen Expression zum Ektodermrand der anterioren Wachstumszone (Sterne) sichtbar. **g**, ektodermaler Rand und Amnion abdominaler Segmente eines ausgewachsenen Keimstreifens exprimieren *dpp*. **h**, Keimstreif während der Entstehung von A1 (Stadium des beginnenden Rückzugs der ubiquitären *gbb*-Expression), die stomodeale *dpp*-Domäne ist sichtbar; die *dpp*-Expression im ektodermalen Rand ist immer noch lückenhaft und bleibt häufig auf die Extremitätenanlagen beschränkt; paramediane Expressionen im Wachstumszonenboden sind schwach sichtbar, *dpp*-exprimierendes Amnion liegt über der Übergangszonen. (digitale Ausschnittsvergrößerungen, nicht maßstabsgetreu)



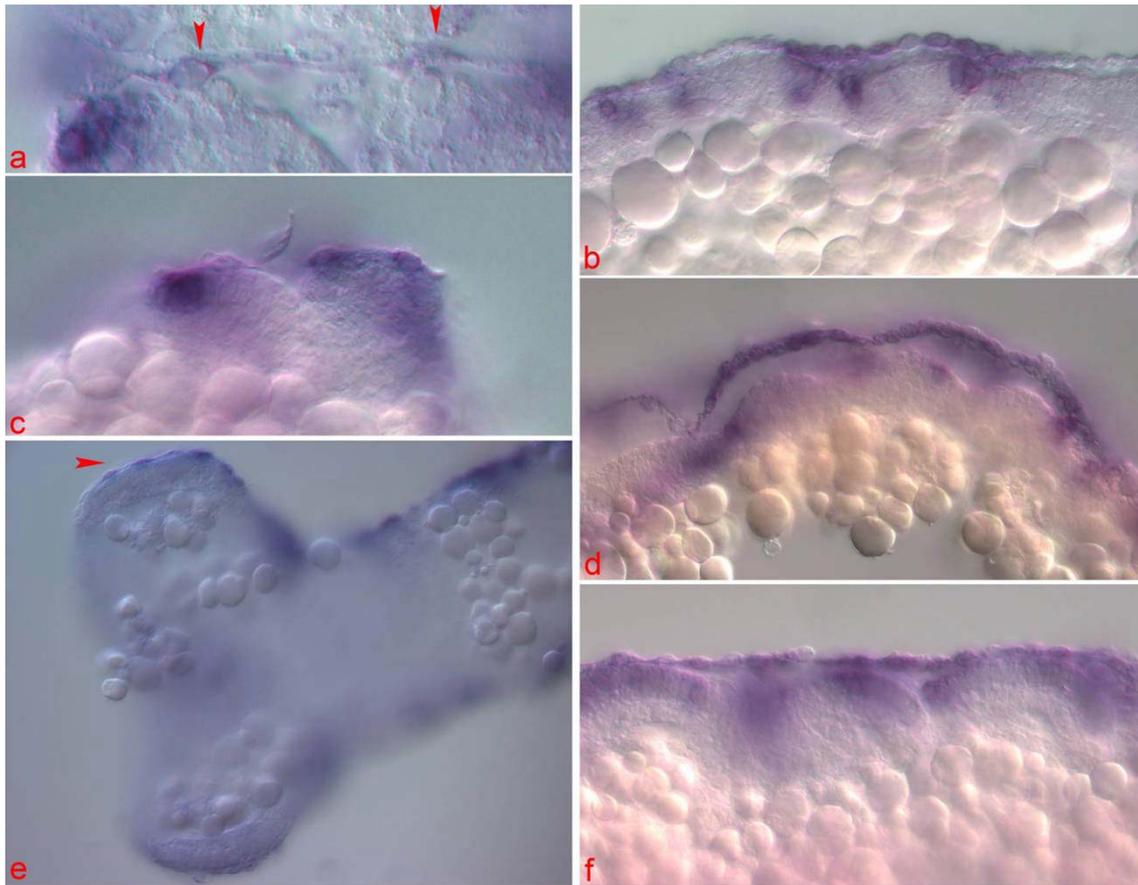
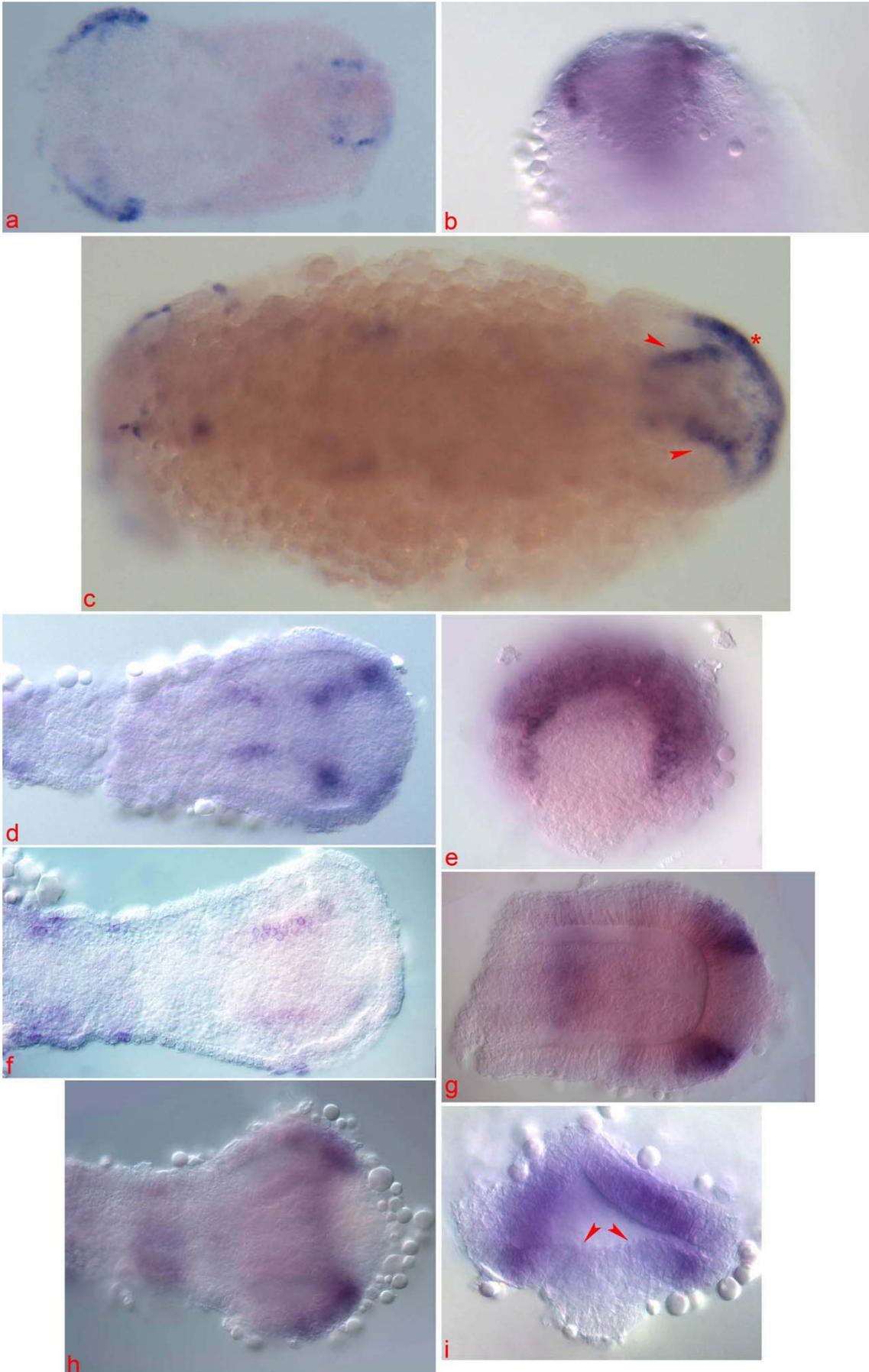


Abb. 12: Wildtyp-*dpp*-Expression im amniotischen Plattenepithel, optische Anschnitte: **a**, transversal, *dpp*-exprimierende amniotische Plattenepithelzellen (Pfeilspitzen) liegen über dem Abdomen eines ausgewachsenen Keimstreifs. **b**, sagittal, Epithelzellen über dem Abdomen eines ausgewachsenen Keimstreifs exprimieren *dpp*, der randliche optische Anschnitt zeigt auch im Amnion segmentale *dpp*-Expression. **c**, transversal, *dpp*-exprimierende Plattenepithelzellen über dem Abdomen eines gestreckten Keimstreifs. **d**, sagittal, *dpp*-Expression in der freien, vom Keimstreifrand entfernten Fläche des abdominalen Amnions: die Zellmorphologie ist eher kuboidal, der Anschnitt ist jedoch so weit medial, daß es sich nicht um randliche Zellen handelt. **e**, *dpp*-exprimierendes Plattenepithel (Pfeilspitze) am Kopflappenrand, der selbst kein *dpp* exprimiert, **f**, sagittal, thorakales amniotisches Plattenepithel exprimiert *dpp*, der Anschnitt ist so weit medial, daß es sich auch hier nicht um randliche Zellen handelt. (digitale Ausschnittsvergrößerungen, nicht maßstabstreu)

Abb. 13 (Seite 66): Wildtyp-*dpp*-Expression in der Wachstumszone: **a**, von dorsoposterior (Aufblick auf die Wachstumszone von posterior! Dotter entfernt), Keimrudiment mit weit offenem Serosafenster, die *dpp*-Expression reicht kaum in den Boden der Wachstumszone, ist aber in der „Endplatte“ prominent. **b**, Keimrudiment mit engerem Serosafenster, von posterior, *dpp*-Expressionen in der „Endplatte“. **c**, stereomikroskopische Aufnahme von schräg ventral (die Schärfenebene schneidet die Wachstumszone transversal), Stadium: Keimstreif während Entstehung von T3/A1; die paramedianen *dpp*-Expressionen konvergieren und enden im Boden der anterioren Wachstumszone mit erheblichem Abstand voneinander (Pfeilspitzen), Expression im Wachstumszonen-Amnion (Stern), nur am Rand des Gnathums gibt es einzelne *dpp*-exprimierende Zellen. **d**, Keimstreif während Entstehung von A2, paramediane *dpp*-Expressionen konvergieren und enden im Boden der anterioren Wachstumszone. **e**, Fragment eines Keimrudimentes mit engem Serosafenster, von posterior gesehen; *dpp*-Expressionen in der „Endplatte“ umranden die terminale, expressionsfreie Zone. **f**, Keimstreif während Entstehung von T3, paramediane *dpp*-Expression, zunächst nicht konvergent. **g**, Fragment eines Keimrudimentes (wie e), optischer Anschnitt von ventral, prominente *dpp*-Expressionen bleiben in der „Endplatte“, im Boden der Wachstumszone finden sich keine Expressionen; außerhalb der Schärfenebene segmentale Expression im Amnion. **h**, Keimstreif während der Entstehung von T3, auch hier keine Expression im Boden der Wachstumszone, außerhalb der Schärfenebene finden sich Streifen amniotischer Expression über der Übergangzone. **i**, optischer Anschnitt der Wachstumszone eines wachsenden Keimstreifs zeigt den Abstand der *dpp*-Expression zum medialen Seitenplattenrand (Pfeilspitzen, vgl. *gbb*-Expression in Abb. 29b & d).

Die Expression im wachsenden Keimstreif und die Etablierung der dorsalen Domäne

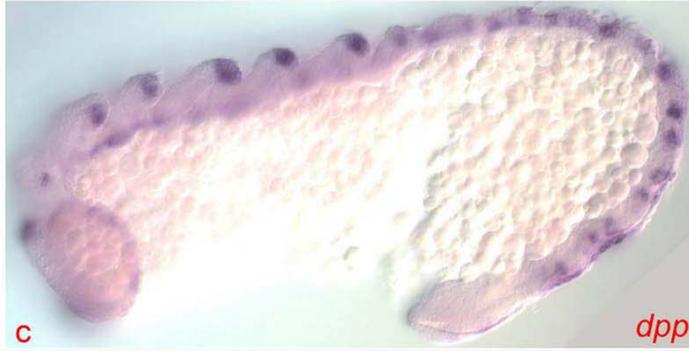
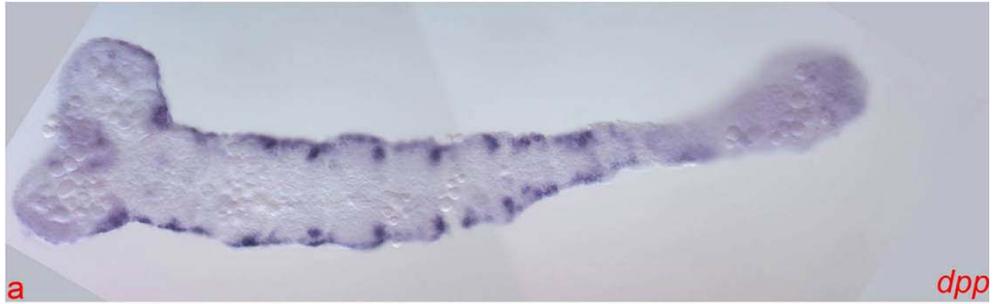
Eine Expression von *dpp* am äußersten lateralen Rand des Embryos also, dem Bereich der späteren „dorsalen Domäne“ ist im frühen Keimstreifstadium (Entstehung von T2, T3) noch nicht nachzuweisen. Vereinzelt *dpp*-exprimierende Zellen in diesem randlichen Bereich sind immer mit Expressionen in der freien Amnionfläche verbunden (Abb. 11, Abb. 13c). Nach Schluß des Serosafensters reicht die amniotische Expression über Gnathum und dem vorderen Thorax bis sehr weit lateral an den Embryorand, bleibt aber dennoch auf das kuboidale Epithel über der Amnionhöhle beschränkt (Abb. 11e). Eine randliche dorsale *dpp*-Domäne im eigentlichen Keimstreif entsteht erst etwa zum Zeitpunkt der Entstehung der ersten abdominalen Segmente (also wenn die zunächst ubiquitäre *gbb*-Expression sich in das endgültige Expressionsmuster umwandelt, Kap. 0.0.0). Dies geschieht zunächst in Form isolierter Zellen im Keimstreifrand, die sehr stark *dpp* exprimieren. Diese ersten *dpp*-exprimierenden Zellen treten regelmäßig am Ort der frühesten Extremitätenanlagen auf. Damit markieren sie sozusagen die hinteren „Ecken“ des Segmentes, indem sie zunächst noch am äußersten Rand des Keimstreifs und am posterioren Rand des jeweiligen Segmentes liegen. Von hier aus nimmt ihre Zahl zu, bis die Lücken über den Segmenträndern geschlossen sind. Den vereinzelt randlichen Zellen im Keimstreif, die beginnen *dpp* zu exprimieren, ist immer eine kleine Gruppe von 2-5 Zellen benachbart, die sich morphologisch eindeutig dem Amnionepithel zuordnen lassen (Befunde Daten nicht gezeigt).



Die Expression im gestreckten Keimstreif

Die im ausgewachsenen Keimstreif entlang der gesamten AP-Ausdehnung vorhandene randliche d.h. „dorsale Domäne“ zeigt stets eine segmentale Periodizität. Ein jedes Segment wird symmetrisch-klammerartig von *dpp*-exprimierenden Zellen umfaßt (Abb. 14, Abb. 12). Die randlichen *dpp*-Domänen ziehen sich sowohl am anterioren, wie auch am posterioren Rand eines Segmentes erheblich, maximal bis zu etwa ein Drittel Keimstreifbreite (Daten nicht gezeigt) zumeist jedoch weniger weit, zur Medianen hin. Anteriore und posteriore Expressionen sind zunächst gleichstark. Das weniger erhabene Ektoderm nahe der segmentalen Falte exprimiert *dpp* gar nicht oder schwächer, sodaß die dorsale Domäne hier häufig unterbrochen ist. In diesem Merkmal gibt es erhebliche Varianz: teilweise wird die segmentale Falte eindeutig von Keimstreifzellen überbrückt, oft sind es nur *dpp*-exprimierende Amnionzellen. An den Segmentgrenzen, wo es durch metamere Expression im Keimstreif zu lokalen Maxima kommt, ist auch die Expression im darüberliegenden Amnionepithel deutlich stärker (Abb. 12b).

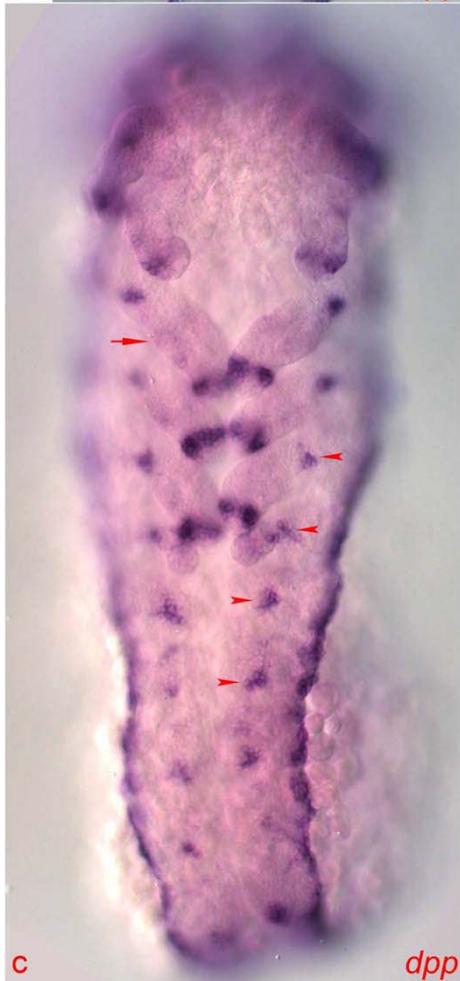
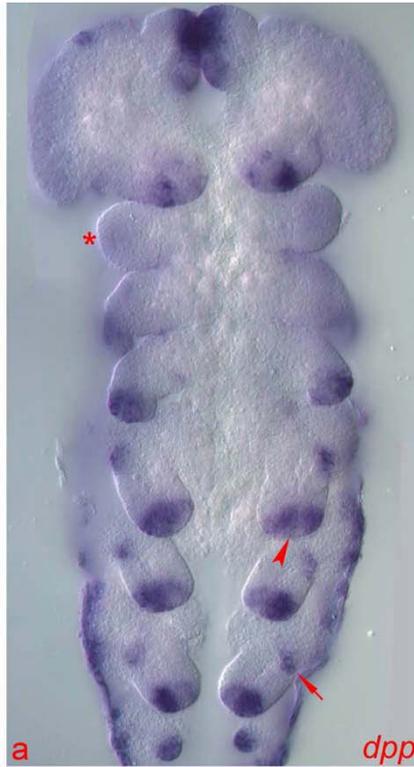
Abb. 14 (Seite 69): Wildtyp-Expression von *dpp* und *gbb* im Keimstreif, Übersicht: **a**, Keimstreif während der Entstehung von A4, die *dpp*-Domänen des dorsalen Ektoderms am Rand des Keimstreifs biegen an den segmentalen Falten (möglicherweise an den anterioren Segmentgrenzen und posterioren Parasegmentgrenzen) leicht zur Medianen hin um, an diesen Stellen liegen im Thorax die Domänen der Extremitätenanlagen. **b**, Keimstreif während Entstehung von A10, die *dpp*-Domäne des dorsalen Ektoderms sind sichtbar, sowie die Domänen auf der Dorsalseite der distalen Extremitätenanlagen (vgl. c); die Mandibelanlage zeigt eine dorsoventral-symmetrische *dpp*-Domäne, amniotische Expression ist über den posterioren Abdominalsegmenten sichtbar. **c**, Keimstreif während Entstehung von A10, von lateral optisch angeschnitten, die *dpp*-Domäne des dorsalen Ektoderms zeigt eindeutig eine segmentale Periodizität, die Schärfenebene liegt auf den kurzen transversalen Abschnitten an den segmentalen Falten des Abdomens und auf den distalen Domänen der Extremitätenanlagen, segmental periodische Expression finden sich auch im randlichen Amnion über den segmentalen Falten (vgl. Abb. 12). **d**, Keimstreif während Entstehung von A4, Rückzug der ubiquitären *gbb*-Expression (Rückzugsprozess nicht abgeschlossen), transversale Domänen an Segment- und Parasegmentgrenzen sind schon lückenhaft, *gbb*-Expression findet sich weiterhin im Boden der Wachstumszone sowie deren Amnion; prominente stomodeale *gbb*-Expression sind sichtbar (Pfeil); Expression in der Antennenanlage (Pfelspitze). **e**, Keimstreif während Entstehung von A10, *gbb*-Expression nur noch in senkrechten (dorsoventral orientiert) Epithelarealen der Hemisegmente, am Keimstreifrand und der Medianen, intersegmental in kompakten, medianen Zellsträngen, im Kopf persistiert die *gbb*-Expression in Labrumanlage, Stomodaeum, Augenanlage und distaler Antennenanlage, *gbb*-Expressionen im Boden der posterioren Wachstumszone median geschlossen; Expression in der Antennenanlage (Pfelspitze).



Die Expression in den thorakalen Gliedmaßenanlagen

Die früheste, mit der thorakalen Extremitätenentwicklung assoziierte, *dpp*-Expression zeigt sich etwa zum Zeitpunkt der Abgliederung der ersten Abdominalsegmente (Abb. 11c). Morphologisch ist zunächst keine Differenzierung erkennbar (Abb. 11b). Wie beschrieben tritt die stärkste *dpp*-Expression auch hier zunächst in den randlichen Amnionzellen auf, die unmittelbar an den Keimstreif grenzen. Die ersten *dpp*-Expressionen manifestieren sich in den äußersten, posterioren „Ecken“ der betreffenden Segmente (Abb. 11h, Abb. 14a). Diese Keimstreifexpressionen stellen, zusammen mit den früher auftretenden analogen Expressionen der gnathalen Gliedmaßen, die ersten Teile der späteren „dorsalen Domäne“ dar, die zu diesem Zeitpunkt nur durch sporadische *dpp*-exprimierende Zellen entlang der Keimstreif-Amnion-Grenze angedeutet wird (Abb. 11a-c). Die Anlage der Extremitäten erfolgt in diesem frühen Stadium sukzessiv von anterior nach posterior (Abb. 11h). Dieser entwicklungsmäßige Unterschied zwischen den Segmenten wird später kompensiert. Mit fortschreitender Entwicklung dehnt sich im Thorax die Domäne an den „Ecken“ zur Mittellinie hin aus, bis ca. 25% der Keimstreifbreite (Abb. 14b). Der Unterschied zu den Segmenten, die keine Extremitäten tragen, wird erst mit zunehmender Expressionsstärke und der Entstehung der Extremitätenknospe sichtbar, da das Grundmuster zunächst gleich ist. In der Folge wird *dpp* in den Zellen zum Keimstreifrand hin abgeregelt, eine Expression auf niedrigem Niveau bleibt zunächst erhalten. Die Zellgruppe starker *dpp*-Expression markiert den Ort der Entstehung der Extremitätenknospe, die dann auch morphologisch zu erkennen ist (Abb. 14). Mit dem Wachstum der Knospe kommt die *dpp*-Domäne immer mehr auf der dorsalen Seite der Gliedmaßenanlage (zum Keimstreifrand hin) zu liegen. Gleichzeitig wird *dpp* weiter proximal in der Anlage abgeschaltet und die Domäne so vom dorsalen Streifen isoliert. Nur in den äußeren, am Keimstreifrand gelegenen Zellen wird noch *dpp* auf niedrigerem Niveau und in einer zur Gliedmaßenanlage hin gelegenen kleinen Zellgruppe verstärkt exprimiert. Letztere liegt später auch isoliert und wird zur sog. „proximalen *dpp*-Domäne“ (Abb. 15). Diese Domäne tritt als Punktreihe auch im Abdomen auf (Abb. 15c) und ist gegen eine schwächere *dpp*-Expression weiter anterior im Segment abzugrenzen (Nicht zu sehen in Abb. 15, vgl. aber Abb. 48 zur Tracheenentwicklung). Mit anhaltendem Längenwachstum der Extremität zieht sich die *dpp*-Domäne von der Spitze zurück und bildet einen allseits geschlossenen Ring. Die Expressionsstärke bleibt ventral allerdings etwas niedriger (Abb. 15). Etwa gleichzeitig bilden sich weitere intermediäre *dpp*-Domänen an proximodistalen Positionen. Die zunächst nur schwachen *dpp*-Expressionen liegen etwa 1/3 und 2/3 entlang der PD-Achse zwischen o.g. „proximaler Domäne“ und distaler Domäne (erste Anzeichen in Abb. 15c).

Abb. 15 (Seite 72): Wildtyp-Expression von *dpp* und *gbb* im Keimstreif und in Extremitäten: **a**, ausgewachsener Keimstreif, starke *dpp*-Expression finden sich auf der Dorsalseite der distalen Extremitätenanlagen, ventral in der distalen Extremität wird *dpp* ebenfalls schwach exprimiert (Zone der Koexpression mit *wg*), in den Extremitäten von T1 ist schon eine Tendenz zur ringförmigen *dpp*-Expression erkennbar, mit apikal schwächerer Expression (Pfeilspitze); es finden sich an den Extremitätenbasen proximale *dpp*-Domänen (Pfeil); die dorsoventral-symmetrische Domäne der Mandibelspitze zeigt nur ein schwaches Signal (Stern) **b**, ausgewachsener Keimstreif; gradientenförmige *gbb*-Expression finden sich in den Extremitätenanlagen, das Maximum des Gradienten in den thorakalen Extremitätenspitzen liegt dorsal (Zone der maximalen *dpp*-Expression, Pfeilspitze), an den Extremitätenbasen proximale *gbb*-Domänen (Pfeil); das Maximum in der distalen Mandibel ist deutlich (Stern). **c**, älterer Keimstreif als a & b, schwache intermediäre *dpp*-Domänen in der Beinanlage (Pfeil), „proximale *dpp*-Domänen“ an den thorakalen Gliedmaßen und die entsprechenden abdominalen Domänen (Pfeilspitzen in T3 und A1-3) sind sichtbar. Auch zwischen diesen punktförmigen *dpp*-Domänen finden sich segmentale, flächige *dpp*-Expressionen nahe der Nachweisgrenze.



Die *dpp*-Expression in prägnathalen und gnathalen Segmenten

Die sehr früh auftretende starke *dpp*-Expression am Hinterrand der Kopflappen persistiert. Sie umfaßt später sowohl amniotische Zellen, wie auch Zellen des Kopflappenrandes. Diese markieren vermutlich die prospektive Antennenanlage (Abb. 14a). Die *dpp*-Expression im überlagernden Amnionepithel verstärkt sich später noch. In der weiteren Entwicklung tritt eine neue Expression im Rand des Stomodaeums hinzu und eine lückenhafte, nur eine Zellreihe breite Expression umrandet den gesamten Kopf. Auch hier handelt es sich letztlich um die Expansion einer vormals rein amniotischen Expression ins Ektoderm (Abb. 12e). Letztere setzt sich in die „dorsale Domäne“ des restlichen Keimstreifs fort. Eine stärkere *dpp*-Expression in den Augenanlagen tritt zunächst nicht hervor. Als Teil des umlaufenden „*dpp*-Saums“ bilden sich anterior des Stomodaeums die labralen *dpp*-Domänen (Abb. 14b). Nachdem die Anlagen gewachsen sind, liegt das Maximum der Expression in ihrem anterioren Teil. Die Expression in den Antennenanlagen sitzt zunächst ziemlich fokussiert apikal, liegt nach Längenwachstum der Extremität jedoch ebenfalls dorsal (Befunde Daten nicht gezeigt). Auch in gestreckten Keimstreifen zeigen die randlichen Amnionzellen im Kopfbereich eine starke *dpp*-Expression.

Die Entwicklung der Anlagen der Mundwerkzeuge verläuft zunächst wie bereits für die thorakalen Gliedmaßen beschrieben. Markantester Unterschied ist die relativ späte Verlagerung der *dpp*-Domäne auf die Dorsalseite der Extremität. Diese tritt bei Maxillen- und Labiumanlagen erst auf, wenn sie sich bereits morphologisch zu differenzieren beginnen. In den einfacher gebauten Mandibeln bleibt die Expression schwach und symmetrisch. In einem weitentwickelten Stadium, noch bevor die distale *dpp*-Domäne die Gestalt eines Ringes annimmt, bilden sich in proximaleren Bereichen von Maxillen- und Labiumanlage neue *dpp*-Domänen. Die basal in der Labiumanlage gelegene *dpp*-Domäne ist den proximalen Domänen der thorakalen Gliedmaßenanlagen ähnlich (Befunde Daten nicht gezeigt) und möglicherweise metamer homolog zu diesen.

Die Expression von *wingless* in Kopf, Gnathum und Thorax des Wildtyps

Wingless wurde als Marker für ventrale Anlagen verwendet. Die *wg*-Wildtypexpression in Gnathum und Thorax des wachsenden Keimstreif zeigt Abb. 43h. Anfänglich erstrecken sich die *wg*-Streifen über die gesamte Breite des Keimstreifs, lassen jedoch Mesoderm (*twi*-Domäne) und nach dessen Invagination Mesektoderm nahe der Mittellinie frei. Später, mit der Ausdehnung der *dpp*-Domänen vom lateralen Keimstreifrand

(„dorsale Domäne“) zur Medianen, ziehen sich die metameren *wg*-Domänen auf das ventrale Ektoderm zurück. Im Kopf bilden sich zunächst die prominenten Domänen der Augenanlagen, die sich später in mehrere punktförmige Expressionen auflösen. Außerdem bilden sich schräg verlaufende streifenförmige Expressionen in der Antennenanlage. Auch der posteriore Stomodaeum-Rand beginnt *wingless* zu exprimieren. Etwas später treten transversale Streifen anterior in den Labrumanlagen auf. Die antennalen *wg*-Streifen verhalten sich analog den anderen metameren *wg*-Streifen: mit der Expansion der dorsalen *dpp*-Domäne am hinteren Rand eines Parasegmentes zur Mittellinie, ziehen sie sich auf das ventrale Ektoderm zurück. An der Grenze zwischen beiden Domänen wächst die Antennenanlage aus, auf deren Ventralseite *wg* exprimiert bleibt. Gnathale und thorakale Segmente zeigen prinzipiell die oben beschriebenen Expressionsmuster, diese sind lediglich durch unterschiedliche Ausformung der betreffenden Gliedmaßen bzw. Segmente abgewandelt. Am augenfälligsten ist der Teil des *wg*-Streifens, der in diesen Segmenten ventral der Extremität zur Ventralfurche verläuft.

Ektopische *dpp*-Expression in sporadischen aberranten San Bernardino-Wildtyp-Embryonen

In seltenen Individuen aus Gelegen von *Tribolium*-Wildtyp-Embryonen des San Bernardino-Stamms kommt es zu spontaner ektopischer *dpp*-Expression in Keimstreif und Wachstumszone. In drei unabhängigen Gelegen wurden insgesamt 6 Embryonen gefunden, die dieses Phänomen zeigen. Allen gemeinsam ist, daß die dorsalen *dpp*-Domänen sich zur Medianen hin ausdehnen und sich dadurch an den anterioren und posterioren Rändern der Hemisegmente sehr starke *dpp*-Expressionen finden, also ähnlich den späten *gbb*-Domänen des normalen Wildtyps (Abb. 16). Außerdem gibt es ektopische Expressionen in der freien Fläche des Hemisegmentes, exakt an der Stelle an der sich normalerweise die *gbb*-Expression zuerst zurückziehen beginnt. Desweiteren findet sich eine starke Expression im Rand der Kopflappen. In der Wachstumszone sind anstelle der normalen Expression nur schwache Signale zu detektieren. Hier wird *dpp* ektopisch in den anterioren Flanken exprimiert. Dieser Teil des Embryos ist normalerweise im Wildtyp grundsätzlich frei von *dpp*-Expression und macht die charakteristische Form der Wildtypexpression der Wachstumszone aus. Die Ventralfurche bleibt frei von Expression. Diese Embryonen zeigen verblüffende Ähnlichkeiten zu einer bestimmten Klasse von *gbb*-RNAi-Phänotypen. Eine Kreuzkontamination der Proben kann aber explizit ausgeschlossen werden.

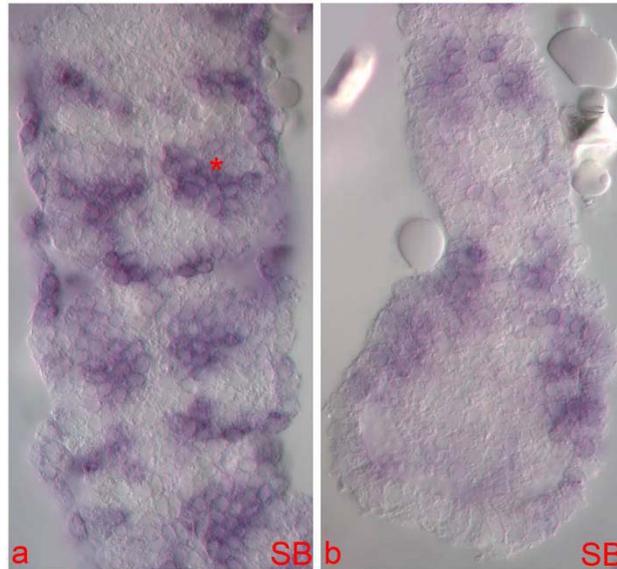


Abb. 16: Ektopische *dpp*-Expression von *dpp* in einem aberranten San Bernardino-Wildtyp-Embryo, etwa im Stadium der Entstehung von A6 oder A7 : **a**, T1 und T2, Extremitätenanlagen sind nicht zu erkennen, die dorsale *dpp*-Domäne ist lückenhaft und nicht dem Stadium des Keimstreifs entsprechend, ektopische Expressionen an den segmentalen Falten im ventralen Bereich und in der freien Fläche des Hemisegmentes (Zone des frühesten Rückzuges der ubiquitären *gbb*-Expression, Stern). **b**, Wachstumszone, die normale *dpp*-Expression ist in der posterioren Wachstumszone kaum erkennbar, es gibt offenbar kaum amniotische Expression, dagegen ektopische Expressionen in den lateralen Bereichen der anterioren Wachstumszone, die sonst stets frei von BMP-Expression sind (vgl. Abb. 11f & g).

3.1.2 Knock down-Experimente mit *dpp*-Morpholino-Oligonucleotiden und RNA-Interferenz

Morphologische Aspekte der *dpp*-knock down-Phänotypen

Frühere Versuche, *dpp* mittels embryonaler oder parentaler RNAi zu inaktivieren hatten nicht zu reproduzierbaren Kutikula-Phänotypen geführt. Den vorliegenden Ergebnissen nach, erklärt sich dies aus der hohen Penetranz des unten beschriebenen Phänotyps, der auf der Störung früher *dpp*-Funktionen beruht. Dieser führt zu Embryonen, die keine Kutikula bilden. Ein reproduzierbarer aber mit geringer Häufigkeit gefundener „schwacher“ Kutikulaphänotyp wird weiter unten beschrieben. Um redundante Funktionen von *dpp* und *gbb* auszuschließen wurden auch Doppel-eRNAi-Experimente durchgeführt (Tab. 1). Auch hier dominierten die frühen *dpp*-Funktionen. Injektionen in junge Keimstreifen (weit offenes Serosafenster, Tab. 4), um *dpp*-Funktionen in der Beinentwicklung zu untersuchen, erbrachten weder in der Einzel-RNAi, noch nach Doppelinjektion spezifische

Phänotypen. Kutikula ausbildende Individuen aus der Doppel-RNAi zeigten jedoch den später beschriebenen *gbb*-RNAi-Phänotyp mit Praetarsusdefekten.

Der häufigste *dpp*-RNAi-Phänotyp besteht aus einer kappenförmigen anterioren Serosa, einem kappenförmigen posterioren Teil, der die Anlagen des Kopfes und manchmal des Mandibularsegmentes umfaßt, und einem in den Dotter invaginierten Schlauch, der zumeist das Mandibularsegment und alle nachfolgenden Teile eines Keimstreifs enthält. Wie die Genese dieser Keimstreifen vermuten läßt und wie die Anwendung unterschiedlicher molekularer Marker belegt, fehlen in allen Teilen des Embryos dorsale Zellschicksale, einschließlich des Amnions.

Das wichtigste Merkmal ist die relative Orientierung der Serosa-Embryo-Grenzlinie zur AP-Achse, bzw. ihr Verlauf. In *dpp*-RNAi-Embryonen ist sie fast geradlinig, man kann daher fast von einer Grenzebene sprechen die häufig senkrecht zur AP-Achse steht (Abb. 19a, Abb. 22a, c). Im Gegensatz zum Wildtyp, bei dem sich die Serosa-Embryo-Grenze dorsal nach posterior ausdehnt, scheint sich der Verlauf der Serosa-Embryo-Grenzlinie in den RNAi-Phänotypen kaum zu verändern. Im Wildtyp bewegt sich die gegen die AP-Achse gekippte Serosa-Embryo-Grenze gegen eine ventroposteriore Position. Dort invaginiert der Embryo schließlich unter Bildung der Amnionfalten. Nach *dpp*-knock down, bewegt sich die zur AP-Achse senkrecht stehende Serosa-Embryo-Grenze nahezu symmetrisch gegen den posterioren Pol. Es kommt dort zu einer Invagination embryonalen Epithels an terminaler Position, häufig jedoch nach ventral verschoben.

Daß es tatsächlich zu Invagination, also Verlagerung blastodermal angelegter Schicksale nach innen kommt, zeigt der Befund, daß zumeist das Mandibularsegment an der Invaginationsöffnung liegt. Dies läßt sich u.a. vergleichend durch segmentale *twi*-markierte Mesodermblöckchen belegen. Invaginierte Teile gehen also nur teilweise auf die Aktivität der Wachstumszone zurück (Abb. 21e, g).

Die auf der Oberfläche verbleibenden Teile entsprechen im Wesentlichen den prägnathalen Kopfsegmenten. Die Serosa nimmt je nach Alter des Embryos unterschiedlich viel Fläche ein, maximal jedoch drei Viertel der Eilänge. Ein charakteristisches Merkmal der embryonalen Kappe ist eine ventral wohl durch Mesoderm unterbrochene, dorsal aber umlaufende Furche, die nur selten fehlt. Sie entspricht teils lateralen Abschnitten der anterioren Amnionfalte des Wildtyps, vor allem aber den bilateralen Einsenkungen der Kopflappen, die in diesem Phänotyp dorsal ineinander übergehen (Abb. 18d, Abb. 19a (von dorsal), Abb. 19b (von ventral), Abb. 23a). *Gbb* ist im Wildtyp und im Phänotyp ein ausgezeichneter Marker für diese Einsenkungen (Abb. 18d zeigt diese von lateral). Der

Bereich zwischen den Seitenplattenrändern bzw. der mediane, mesodermale Streifen erfährt eine Veränderung in der Region der Kopfanlagen. Nach der Bisbenzimid-Kernfärbung zu urteilen wird er über etwa 25% des Eiumfanges gedehnt. Hierbei paßt eine Zellpopulation, zwischen den durch die *twist*-Expression ausgewiesenen Mesodermzellen und den kompakt bleibenden ektodermalen Zellen, die offensichtlich kein oder nur wenig *gbb* exprimiert, ihre Zellmorphologie an und sorgt für den nötigen Flächenzuwachs (Abb. 18a, b). An der Grenze zur Serosa endet das Epithel des medianen Streifens bogenförmig und ist gegen die weitere Grenzlinie durch Inzisionen abgegrenzt (Abb. 19b). Falls die Inzisionen die Ektodermgrenze definieren wäre die o.g. Population gestreckter Zellen wieder eher dem Mesoderm zuzuordnen. Posterior an der Invaginationsöffnung hat der Mesodermstreifen wildtyp-ähnliche Breite.

Der invaginierte Schlauch erscheint durch die Deletion von Amnion und dorsalem Ektoderm morphologisch nahezu drehrund (Abb. 20, Abb. 21). Die verbleibenden Anlagen weisen aber dennoch eine dorsoventrale Polarität auf. In älteren Keimstreifen ist am Rand der Invaginationsöffnung eine enge, spaltförmige Ventralfurche zu erkennen (Abb. 20f, Abb. 21j). Der internalisierte ektodermale Schlauch ist abgesehen von der Wachstumszone von Mesoderm vollständig umhüllt. Ein Migrationsverhalten von Mesodermzellen, wie dies im Wildtyp oder auch in *gbb*-RNAi-Phänotypen vorkommt, findet nicht statt, weil das dorsale Ektoderm fehlt und das Mesoderm ohnehin das gesamte ventrale Ektoderm umfaßt. In älteren Segmenten findet man jedoch Mesodermabschnitte, die epithelartig flach sind und dennoch ventral liegen (Abb. 21i, k). Offensichtlich drängt sich hier das Mesoderm an äußerst dorsaler Position zusammen, kann aber wegen des geringen Schlauchumfangs – im Gegensatz zur Wildtypsituation – den ventralen Bereich nicht freigeben. Der zentrale Kanal ist eng (Abb. 18f, Abb. 20b, g, h) und wird im thorakalen Abschnitt zusätzlich durch Verdickungen obstruiert (Abb. 21k). Das bedeutet, daß sich das verbliebene ventrale Ektoderm wie im Wildtyp verhält, indem es erhabene „Hemisegmentreste“ bildet, die durch eine Ventralfurche und segmentale Falten voneinander getrennt sind.

Der Habitus der Wachstumszone ist bemerkenswerterweise fast identisch mit dem Wildtyp. Die „globular mass“ erscheint zumeist in Wildtyp-Position. Die „inner layer“ (Mesoderm der Wachstumszone, Handel et al., 2005) hingegen, die im Wildtyp die Wachstumszone dorsal unterlagert, wächst an den Seiten nach ventral bis auf das Dach der Wachstumszone (Abb. 21l).

Plattenepithel fehlt diesen *dpp*-RNAi-Phänotypen. Kontakte zur Serosa sind zufällig, dem entspricht das Wachstumsverhalten. Alle Keimstreifen wachsen, wenn die Invagination

nicht sterisch blockiert ist, frei in den Dotter ein. Nur Gelegentlich kommen Verwachsungen vor, die den Wachstumszonendefekten in *gbb*-RNAi-Phänotypen ähnlich sind (vgl. Abb. 211, m, mit Abb. 46j, k, n).

Die morphologischen Befunde deuten also auf die Deletion von Amnion und dorsalem Ektoderm, sodaß der Embryo vollständig aus Derivaten ventralen Ektoderms und Mesoderms besteht. Diese Interpretation wird durch die Analyse molekularer Marker wie *wg*, *gbb* und *otd-1* gestützt (siehe unten).

Bei einer weniger häufigen Klasse von Phänotypen versagt die Invagination und es kommt entweder durch Einfaltungen an unterschiedlichen Stellen oder durch Zurückdrängen der Serosa nach anterior zum Überwachsen des Dotters. Dabei kann die Serosa vollständig verdrängt werden (Abb. 19). Es konnten keine kappenförmigen Phänotypen gefunden werden, bei denen die Serosa den extern gebliebenen „Kopflappen“ überwächst, und über ein terminal liegendes Serosafenster ein kappenartiges Amnion ausbildet. Vielmehr liegt offensichtlich das embryonale nicht invaginierte Epithel direkt unter der Vitellinmembran, und die Serosa anterior davon dem Dotter auf.

Gelegentlich findet man Embryonen mit voll ausgebildeten Kopflappen und Mandibularsegment, beide mit normalem Amnionepithel. Die RNAi-Wirkung tritt hier offensichtlich erst während der Entwicklung der posterioren Amnionfalte ein. Diesen Embryonen fehlt das dorsale Ektoderm in den thorakalen Segmenten und posterior davon. In Maxillarsegment und Labialsegment sind Reste amniotischen Plattenepithels zu finden (Abb. 19c, d, f).

Neben diesem embryonalen Phänotyp gibt es Kutikulaphänotypen, wie sie v. a. durch eRNAi mit Konzentrationen von 150-200ng/µl mit geringer Penetranz erzeugt wurden (Tab. 3). Hier finden sich schwach kutikularisierte Kopf- und Gnathumteile denen Dorsalmarker fehlen, und zusätzlich liegen isoliert in der Eihülle Reste posteriorer Segmente mit Dorsalmarkern. Zwischen diesen anterioren und posterioren Resten wurde keine Kutikula ausgebildet (Abb. 17b, d-1). Dieser Phänotyp und der vorgenannte embryonale, unterscheiden sich also im Vorhandensein dorsaler Schicksale entlang der AP-Achse. Im gleichen Experiment wurden jedoch anteriore Keimstreifen mit Extremitätenanlagen gefunden, die durchaus dem oben beschriebenen embryonalen Phänotyp entsprechen könnten (Abb. 17c). Kutikulae anteriorer Segmente mit klar identifizierbaren dorsalen Anteilen wurden jedoch nicht gefunden.

Die Frage, warum es häufig nicht zur Ausbildung einer Kutikula kommt, kann letztlich nicht gelöst werden. Die Deletion der epidermalen Anlagen könnte ebenso ursächlich sein, wie gestörte *dpp*-Funktionen in Epidermisdifferenzierung oder Sekretion der Kutikula.

Um zu versuchen doch den Anteil Kutikula-bildender Embryonen zu erhöhen und gezielt nur frühere Funktionen zu stören wurden die dsRNA-Konzentrationen erheblich gesenkt. Die Hoffnung war, den bei den „150ng-RNAi“ (siehe oben) vermuteten Effekt zu verstärken bzw. gezielt herbeizuführen, sodaß sich der RNAi-Effekt im Laufe der Entwicklung soweit abschwächt, daß die Kutikulabildung möglichst ungestört ablaufen kann. Die Injektionen erzeugten erwartungsgemäß eine hohen wt-Anteil, einen hohen Anteil leerer Eihüllen, die auf eine auch unter diesen Bedingungen gestörte Kutikula-Bildung deuten oder Injektionsartefakte darstellen. Letztlich gab es einen kleinen Prozentsatz von Kopfphänotypen (Daten nicht gezeigt, Häufigkeit in Tab. 2). Zumeist waren alle Kopfsegmente vor dem Mandibularsegment deletiert, gelegentlich auch nur das Antennalsegment oder die Deletionen reichten weiter nach posterior, maximal bis zu T1. Da die Negativkontrolle mit *Dll*-dsRNA jedoch einen vergleichbar hohen Anteil an Kopfphänotypen erzeugte, handelt es sich hierbei nicht um einen *dpp*-spezifischen Defekt, selbst wenn *dpp*-Expressionen eng mit der frühen Entwicklung der Kopfsegmente assoziiert sind.

Damit ist der eingangs beschriebene „Kappen-Phänotyp mit invaginiertem Schlauch“ ein spezifischer, starker und vor allem leicht zu induzierender Phänotyp, der wesentliche Aspekte der *dpp*-Funktionen in der dorsoventralen Musterbildung erklärt.

Tab. 1: Embryonale RNAi durch Injektion von *dpp*-dsRNA und *gbb*-dsRNAi einzeln und kombiniert in Blastodermstadien. Da in den o. g. RNAi-Experimenten relativ viele Wildtyp-Embryonen auftraten, wurde hier versucht eventuelle zu *dpp* redundante Funktion von *gbb* auszuschalten. *Dll*-dsRNA-Injektion diente als Positivkontrolle. Es sind die relativen (%) und absoluten (n) Häufigkeiten angegeben.

| Injektionslösung Anzahl injizierter Eier | wt | Praetarsus- phänotyp | Invagination /Setae-Band | anomale Kutikula | leere Eihülle | <i>Dll</i> - Phänotyp |
|--|--------|-------------------------|-----------------------------|---------------------|------------------|--------------------------|
| <i>dpp</i> - dsRNA, 700ng/μl n=177 | 8(14) | 0(0) | 5(9) | 16(28) | 71(126) | - |
| <i>gbb</i> -dsRNA, 1200ng/μl n=138 | 17(24) | 15(21) | 30(41) | 20(27) | 18(25) | - |
| <i>dpp</i> -dsRNA, + <i>gbb</i> -dsRNA, 800/1200ng/μl n=205 | 4(9) | 0(0) | 8(16) | 11(23) | 77(157) | - |
| <i>Dll</i> -dsRNA, 500ng/μl n=70 | 34(24) | - | - | - | 4(3) | 61(43) |

Tab. 2: Embryonale RNAi durch Injektion von *dpp*-dsRNA in Blastodermstadien. Um dennoch Kutikulae zu gewinnen und nur frühere Funktionen zu stören wurden die dsRNA-Konzentrationen erheblich gesenkt, in der Erwartung, daß sich der RNAi-Effekt im Laufe der Entwicklung abschwächt. *Dll*-dsRNA-Injektion diente als Positivkontrolle. Es sind die relativen (%) und absoluten (n) Häufigkeiten angegeben

| Injektionslösung Anzahl injizierter Eier | wt | anomale Kutikula | Kopf-Phänotyp | leere Eihülle | <i>Dll</i> - Phänotyp |
|---|---------|---------------------|---------------|------------------|--------------------------|
| <i>dpp</i> -dsRNA, 1ng/μl n=345 | 56(192) | 2(7) | 10(36) | 32(110) | - |
| <i>dpp</i> -dsRNA, 5ng/μl n=451 | 60(272) | 1(5) | 7(30) | 31(141) | - |
| <i>Dll</i> -dsRNA, 400ng/μl n=81 | 20(16) | - | 0(0) | 2(2) | 78(63) |
| <i>Dll</i> -dsRNA, 5ng/μl n=168 | 88(147) | - | 8(14) | 4(7) | 0(0) |

Tab. 3: Embryonale RNAi durch Injektion von *dpp*-dsRNA in Blastodermstadien. Nach Erfahrungen aus vorhergehenden Experimenten, in denen kaum Kutikulae ausgebildet werden, wurde hier gezielt nach dem 2. und 3.Tag nach der Injektion nach Keimstreifen gesucht. Es sind die relativen (%) und absoluten (n) Häufigkeiten angegeben.

| Injektionslösung Anzahl injizierter Eier | wt | Kutikula-Marker | Augenflecken | Weichgewebe | leere Eihülle |
|---|---------|-----------------|--------------|-------------|---------------|
| <i>dpp</i> -dsRNA, 150ng/µl n=478 | 22(103) | 11(55) | 3(14) | 56(270) | 8(36) |
| Puffer n=118 | 86(102) | - | - | - | 5(6) |

Tab. 4: Embryonale RNAi durch Injektion von *dpp*-dsRNA und *gbb*-dsRNAi einzeln und kombiniert in kondensierte Keimrudimente. Da in den o. g. RNAi-Experimenten relativ viele Wildtyp-Embryonen auftraten, wurde hier versucht eventuelle zu *dpp* redundante Funktion von *gbb* auszuschalten. Die Injektion in Keimrudimente sollte die Funktion von *dpp* bei der Extremitätenentwicklung ausschalten, ohne frühere essentielle Funktionen zu stören. *Dll*-dsRNA-Injektion diente als Positivkontrolle. Es sind die relativen (%) und absoluten (n) Häufigkeiten angegeben.

| Injektionslösung Anzahl injizierter Eier | wt | Praetarsus- Phänotyp | Invagination /Setae-Band | anomale Kutikula | leere Eihülle | <i>Dll</i> - Phänotyp |
|--|--------|-------------------------|-----------------------------|---------------------|------------------|--------------------------|
| <i>dpp</i> -dsRNA, 800ng/µl n=197 | 39(76) | (0) | 4(8) | 16(31) | 41(82) | - |
| <i>gbb</i> -dsRNA, 1200ng/µl n=201 | 48(97) | 17(34) | 13(26) | 10(21) | 11(23) | - |
| <i>dpp</i> -dsRNA / <i>gbb</i> -dsRNA, 800/1200ng/µl n=188 | 36(68) | 20(37) | 10(18) | 22(42) | 12(23) | - |
| <i>Dll</i> -dsRNA, 500ng/µl n=114 | 33(38) | - | - | - | 10(11) | 57(65) |

Embryonale Injektion von *dpp*-Morpholino-Oligonucleotiden

Die Injektion von *dpp*-Morpholino-Oligonucleotiden in Blastodermstadien liefert die gleichen Phänotypen, wie die embryonale RNAi und die aRNAi (Tab. 5). Sie wurde als robuste Methode verwendet, um Phänotypen für in situ-Hybridisierungen zu erzeugen. Es zeigte sich weder in der Qualität der Phänotypen, noch in Penetranz oder Lethalität ein Unterschied zwischen den Konzentrationen von 0,2mM und 0,4mM *dpp*-Morpholino-Oligonucleotid.

Tab. 5: Injektion von *dpp*-Morpholino-Oligonucleotiden in Blastodermstadien. Zur Kontrolle wurde Puffer injiziert. Es sind die relativen (%) und absoluten (n) Häufigkeiten angegeben.

| Injektionslösung Anzahl injizierter Eier | wt | Kutikulamarker (nicht kumulativ) | Weichgewebe | leere Eihülle |
|--|--------|-------------------------------------|-------------|---------------|
| <i>dpp</i>-Morpholino, 0,2mM n=278 | 19(53) | 12(33) | 59(164) | 23(61) |
| Puffer n=95 | 97(92) | | - | 3(3) |

Pupal-parentale RNAi und adult-parentale RNAi

In *Tribolium* hat sich für viele knock down-Experimente parentale RNAi als praktikable und effiziente Methode erwiesen, da sie bei geringerem Arbeitsaufwand eine wesentlich höhere Ausbeute an Embryonen liefert als embryonale RNAi. Für in situ-Hybridisierungen ist dies von besonderem Interesse. Darüber hinaus ist die Variabilität der erhaltenen Phänotypen erheblich geringer.

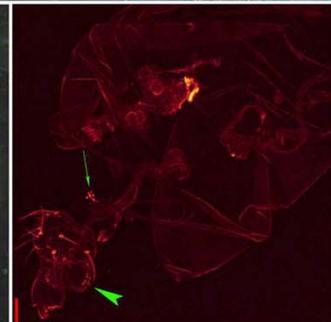
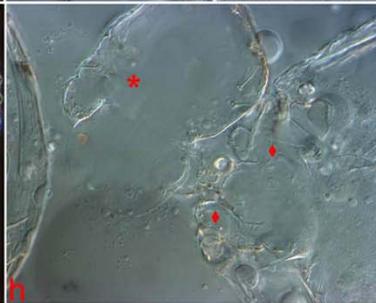
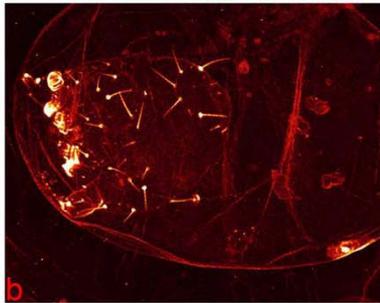
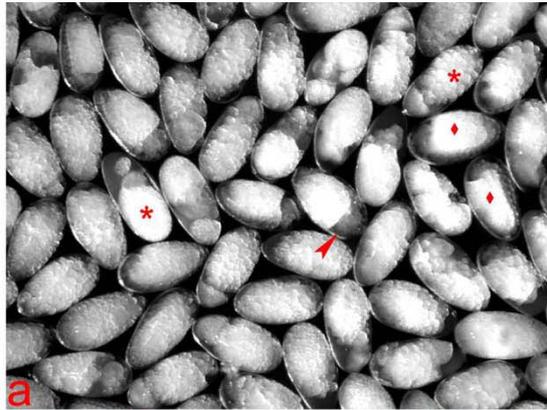
Die Injektion höherer Konzentrationen von *dpp*-dsRNA (1000ng/μl - 3000ng/μl) in Puppen führte zu weitgehend infertilen Imagines. Als Beispiel lieferten 47 Weibchen in einem 3-Tage-Gelege eine Woche nach Reifehäutung und 11 Tage nach Injektion 13 Eier. Von dieser Gruppe wurde nach drei Wochen in zwei „3-Tage-Gelegen“ kein Ei mehr gefunden. Ähnliche Ergebnisse lieferte eine parallel durchgeführte *gbb*-pRNAi, wobei sich die Käferweibchen ebenfalls innerhalb von 2 Wochen nicht erholten. Es gibt klare Hinweise auf Funktionen beider BMP in Keimzellen und Gonaden von *Tribolium* (J. Trauner, unveröffentl.). Funktionen von *gbb* und *dpp* in Keimzellen und Gonaden von *Drosophila* sind ebenfalls bekannt (Song et al., 2004; Xie & Spradling, 1998).

Im Gegensatz zur pupalen Injektion haben sich Injektionen von *dpp*-dsRNA in Imagines, etwa 1 Woche nach Reifehäutung (J. Trauner, pers. Mitt.) trotz herabgesetzter Fertilität als produktivste Methode zur Erzeugung großer Mengen von RNAi-Embryonen für in situ-Hybridisierungen erwiesen. Um die Penetranz der nicht kutikularisierenden *dpp*-aRNAi-Phänotypen abzuschätzen, wurde ein großes 10h-Gelege (n=408, von ca. 350 Käferweibchen) vom 3.Tag nach Injektion 10h nachgereift, dechorionisiert, gewaschen und anschließend in Heptan überführt. Heptan-feuchte Eier sind transparent und Phänotypen lassen sich identifizieren. Kleinere Gelege wurden zusätzlich in Voltaleff-Öl eingebettet und mit DIC-Optik betrachtet (Abb. 17a, Tab. 6). Die erzeugten Phänotypen sind mit denen aus eRNAi und den durch *dpp*-Morpholino-Injektion erzeugten identisch.

Tab. 6: Injektion von dsRNA in Imagines, Gelege am 3. Tag nach Injektion entnommen. Zur Kontrolle wurde Wasser injiziert. Es sind die relativen (%) und absoluten (n) Häufigkeiten angegeben.

| Injektionslösung Anzahl injizierter Eier | wt | Kappen- Phänotyp | nur Dotterschollen | anomaler Keimstreif |
|---|-----------|-----------------------------|---------------------------|----------------------------|
| <i>dpp</i>-dsRNA, 500ng/μl n=408 | 16(64) | 56(230) | 24(98) | 4(16) |
| H₂O n=126 | 97(122) | | 3(4) | |

Abb. 17 (Seite 85): Phänotypen der *dpp*-RNA-Interferenz (zum Vergleich Wildtyp-Kutikula in Abb. 34a): **a**, stereomikroskopische Aufnahme in Heptan, repräsentativer Ausschnitt aus einem Gelege des 3.Tages einer Gruppe von 100 Weibchen nach der Injektion von 500ng/μl dsRNA, der stärkste und häufigste Phänotyp ist der „Kappenphänotyp“ (Sterne); daneben sind Embryonen mit Wildtyp-Habitus (Rauten, als Wildtyp gezählt in Tab. 6) und Individuen mit Extremitätenanlagen aber anomalem Habitus zu erkennen (Pfeilspitzen). **b**, Konfokale Aufnahme einer Kutikula aus einer embryonalen RNAi mit 150ng/μl, es sind nur der Kopf und möglicherweise T1 entwickelt, gnathale Extremitäten und eine thorakale Extremität sind sichtbar, Dorne als Dorsalmarker fehlen. **c**, in Voltaleff-Öl von lateral; Individuum aus dem gleichen Experiment wie b vor Ausbildung einer Kutikula, Kopf und Extremitäten (gnathale ?) erkennbar, alle posterioren Teile reduziert und/oder im Dotter versenkt. **d**, in Hoyers Medium/Milchsäure-Präparat ohne Erhitzen, unabhängige Injektion, aber gleiche Bedingungen wie b und c, anteriore Kopfsegmente (Stern) und Ball posteriorer Kutikulastrukturen (Raute), dazwischen mazeriertes Gewebe (milchig-opak). **e**, Detailvergrößerung des Individuums aus d, anteriores Kopfsegment mit Labrum, Antennen und Augenpigment (Pfeile), keine Dorsalmarker. **f**, Detailvergrößerung des Individuums aus d, isoliert liegender Ball aus invertierten abdominalen Kutikula-Strukturen (wahrscheinlich von 2-3 Segmenten): Seten mit Dorn als Dorsalmarker (Pfeil), Stigmata teils mit anhängenden Tracheen (Sterne) sowie kampaniforme Sensillen (Pfeilspitze). **g**, Individuum aus dem gleichen Experiment wie d, anteriore Kopfsegmente (Stern), gnathale Extremitäten und zusammenhängende Ansammlungen posteriorer Kutikulastrukturen (Raute). **h**, Detailvergrößerung des Individuums aus g, anteriorer Kopfbereich mit Labrum, kaum kutikularisiert (Stern), zwei Maxillen (Rauten) und Labium, keine Dorne als Dorsalmarker. **i**, Detailvergrößerung des Individuums aus g, andere Schärfenebene als h, Gnathum kaum kutikularisiert, eine Maxille, ein maxillares und zwei labiale Sensillenfelder, evtl. Kutikula von T1, keine Dorne als Dorsalmarker. **j**, Detailvergrößerung des Individuums aus g, zusammenhängende posteriore Kutikula-Strukturen: Seten mit Dorn als Dorsalmarker, Urogomphi (Pfeilspitze). **k**, weiteres Individuum aus dem gleichen Experiment wie d, eine Antenne, das Labrum und Augenpigment (Raute) sind sichtbar, und ein isoliertes maxillares Sensillenfeld (Pfeil). **l**, konfokale Aufnahme des Präparates aus k nach vollständigem Klären, alle vorgenannten kutikulären Strukturen bestätigen sich, insbesondere das isolierte Sensillenfeld (Pfeil), das Labrum (Pfeilspitze) und zusätzlich ist die Intima von Vorder- und Enddarm zu sehen, aber keine Dorsalmarker.



3.1.3 Expressionsmuster molekularer Marker in *dpp*-RNAi-Embryonen und *dpp*-Morpholino-Embryonen

Die Expression von *gbb* nach knock down der *dpp*-Funktion mittels Morpholino-Oligonucleotiden

Gbb zeigt in frühen Stadien wegen der ubiquitären Expression im Ektoderm gut die morphologische Veränderung der Embryonen, dient in späteren Stadien jedoch als Marker für mediales Neuroektoderm als ventrale Anlage. Außerdem kann das Expressionsmuster von *gbb* in der *dpp*-knock down-Situation Anhaltspunkte liefern, inwieweit *gbb* durch *dpp* reguliert wird. Das Expressionsmuster von *gbb* in *dpp*M-knock down-Embryonen wird zunächst nur durch die phänotypische Gestaltänderung bestimmt, es entspricht ansonsten den Verhältnissen beim Wildtyp. Durch die nahezu ubiquitäre Expression von *gbb* im embryonalen Gewebe im posterior pit – Stadium läßt sich die Morphologie gut darstellen. Es bestätigt sich, daß die Serosa-Embryo-Grenze nahezu senkrecht bleibt. Es kommt also nicht zu einer Verdichtung embryonalen Epithels auf der Ventralseite, sondern posterior terminal drehsymmetrisch um das posterior pit herum. Zusätzlich zur *gbb*-Expression direkt an der Serosa-Embryo-Grenze findet sich als Expressionsmaximum bei etwa 50% EL ein umlaufender Ring verstärkter *gbb*-Expression etwa 10-15 Zelldurchmesser posterior der Serosa-Embryo-Grenze (Abb. 18c). Der Ring wird nur durch den ventralen Mesodermstreifen durchbrochen (Abb. 18a, b). Dorsal ist er geschlossen und völlig gleichförmig. Der ventrale Mesodermstreifen, der durch eine kaum zu detektierende *gbb*-Expression mit dem Ektoderm kontrastiert, ist in seiner Breite verändert: v.a. anterior (nahe der Serosa-Embryo-Grenze) ist er stark verbreitert. Die Situation ist genau entgegengesetzt zu den Verhältnissen im Wildtyp, wo er sich posterior verbreitert. Die anteriore Verbreiterung geht weitgehend auf Veränderung der Morphologie randlicher Mesodermzellen zurück, wie die Bisbenzimid-Kernfärbung zeigt. Ein medianer Streifen von 10-15 Zellen Breite bleibt jedoch über die gesamte AP-Ausdehnung dicht gepackt. Das starke Signal um die Invaginationsstelle ähnelt der Wildtypsituation. In älteren Keimstreifen (Bildung von A1-A4) findet sich auf den extern verbliebenen Kopflappen die anteriore *gbb*-Expression, die im Wildtyp die Entstehung der anterioren Amnionfalte markiert. Auch ihre medialen, nach posterior umgebogenen Teile sind vorhanden. Die Expression ist dorsal geschlossen (Abb. 18d). Im invaginierten Teil des Keimes finden sich wie im Wildtyp transversale Domänen segmentaler Periodizität. Durch Vergleich mehrerer Individuen läßt sich eine relativ sichere Zuordnung zu Segment- bzw. Parasegmentgrenze finden: Von zwei dicht benachbarten Domänen wird die posteriore von

Mesoderm unterlagert (Daten nicht gezeigt) und liegt daher an der anterioren Segmentgrenze. Die andere der beiden Expressionen ist meist schwächer. Sie entspricht damit der Domäne nahe der posterioren Parasegmentgrenze des Wildtyps. Auch diese Expressionen bilden wohl geschlossene Ringe. In einigen Individuen finden sich longitudinale Expressionen zwischen den Segmenten, die – orientiert man sich an der Morphologie der Wachstumszone – auf der Ventralseite liegen (Abb. 18e, f). Die Schichtdicke des umgebenden Ektoderm und Mesoderm macht diesen Befund etwas unsicher. Eine signifikante Abweichung zeigt sich in der Wachstumszone: von lateral betrachtet, exprimieren Boden und Dach des Lumens relativ stark *gbb*, was im Wildtyp erst nach Abschluß des Wachstums bei der Entwicklung des Proctodaeums zu beobachten ist. Die dorsoventrale Polarität der Wachstumszone ist also nicht an der *gbb*-Expression zu erkennen, sondern nur morphologisch.

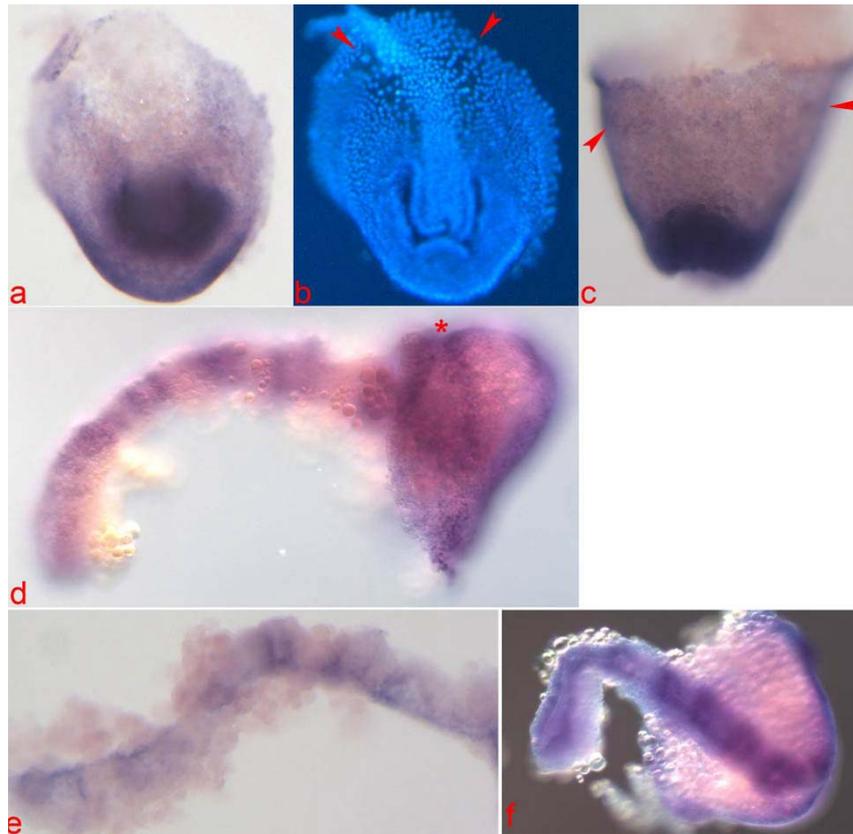


Abb. 18: Expressionsmuster von *gbb* in *dppM*-knock down-Embryonen, („Kappenphänotyp“: dorsale Zellschicksale fehlen): **a**, Stadium der Kondensation und Invagination, Ansicht von posterior, die Wachstumszoneanlage ist noch inaktiv, ubiquitäre *gbb*-Expression mit starker Expression um die Invaginationsstelle, ein ventraler Streifen schwacher oder fehlender *gbb*-Expression ist nahe der Serosa-Embryo-Grenze stark verbreitert (enthält Mesodermanlagen). **b**, Bisbenzimid-Kernfärbung von **a**, der Flächenzuwachs des ventralen Streifens geht auf dessen laterale Zellen zurück (Pfeilspitzen). **c**, Embryo aus **a**, von dorsal, ein umlaufender Ring verstärkter *gbb*-Expression findet sich nahe der Serosa-Embryo-Grenze (Pfeilspitzen, zusätzlich zur *gbb*-Expression direkt auf der teilweise eingerissenen Grenzlinie). **d**, älterer Embryo von lateral, ventral ist unten, anteriorer Pol ist links; Stadium: Keimstreif während Entstehung von A1, das erste invaginierte Segment ist das Mandibularsegment, verbleibende *gbb*-Expression nach Rückzug der ubiquitären *gbb*-Expression (nicht ganz abgeschlossen) sichtbar, transversale Domänen liegen an segmentalen Falten, die *gbb*-Expression der Kopflappen umrandet wildtypähnlich eine dorsal durchgehende Einsenkung (Stern), der anteriore Teil dieser Domäne ist Teil der Amnionfalte, der posteriore Teil ist aus dem *gbb*-Ring in **c** hervorgegangen. **e**, Keimstreiffragment, tordiert, transversale Domänen wie in **d**, zusätzlich longitudinale Domänen, die wahrscheinlich der medianen Expression der Wildtyps entsprechen. **f**, von ventral, anteriorer Pol ist links, der Keimstreif ist verdreht, Stadium: während Entstehung von A1, das Mandibularsegment liegt teilweise extern, *gbb*-Expression nach Rückzug der ubiquitären *gbb*-Expression, es sind transversale und longitudinale Domänen zu erkennen.

Die embryonale Expression von *wingless* nach knock down der *dpp*-Funktion mittels Morpholino-Oligonucleotiden und RNA-Interferenz

Wingless dient hier als ventraler Marker und zeigt damit indirekt die Deletion dorsaler Schicksale an. Die ersten anterioren *wingless*-Domänen im kondensierten Keimrudiment ziehen im Wildtyp vom medialen Rand der Seitenplatten zu den lateralen Rändern der Kopflappen (Daten nicht gezeigt), wo die Augenanlagen entstehen werden. Die nächsten *wg*-Streifen des antennalen Segmentes sind zunächst schwach ausgebildet und nicht immer nachzuweisen. In *dpp*-RNAi-Embryonen begrenzen die ersten *wg*-Streifen die phänotypische anteriore Furche die zumeist vorhanden ist. Die medialen Enden von Augensegmentstreifen zeigen wie weit der mesodermale Streifen anterior verbreitert ist, und bestätigen die Beobachtung aus der *gbb*-in situ-Hybridisierung (Abb. 19a, b). Je nachdem, wie nahe der mandibulare Streifen an der Invaginationsstelle liegt, ist er hiervon auch betroffen. Alle drei vorgenannten *wg*-Streifen sind in *dpp*-RNAi-Phänotypen dorsal geschlossen und gleichförmig. Wenn der mandibulare Streifen unmittelbar an der Invaginationsstelle liegt, läßt sich die Topologie bestätigen: die einzige Stelle, an der der Rand durchbrochen ist, ist die Ventralfurche (Abb. 20). Sie erscheint hier sehr eng zusammengepreßt, was sicherlich mechanische Gründe hat. Umgekehrt zeigt ein optischer Anschnitt aus der Abdominalregion (A6), daß die Ventralfurche des invaginierten Keimstreifs weiter ist als man erwarten würde (Abb. 20b). Sie ist etwa so breit wie das verbleibende Lumen des ektodermalen Schlauches. Das *wg*-exprimierende Ektoderm ist gegen das teilweise in den Spalt drängende Mesoderm klar abzugrenzen. Alle Zellschicksale dorsal der *wingless*-Domänen sind offenbar eliminiert. Die Ergebnisse bei der kleineren Klasse von Phänotypen, bei denen die Invagination versagt, und das gesamte Ektoderm auf der Oberfläche des Dotters verbleibt, bestätigen dies durch dorsal völlig gleichförmig geschlossene *wg*-Ringe (Abb. 19e). Die umgekehrte Interpretation der *wg*-in situ-Hybridisierung bezüglich der Dorsoventralpolarität, müßte die *wg*-Streifen der *dpp*-RNAi-Embryonen als ventral völlig lückenlos und gleichförmig über die Mediane hinweg geschlossenen *wg*-Streifen erklären und dies auch in den Kopfsegmenten deren Epithelien über den Dottergespannt sind (Abb. 19a, Abb. 20f). Diese Interpretation kann daher ausgeschlossen werden.

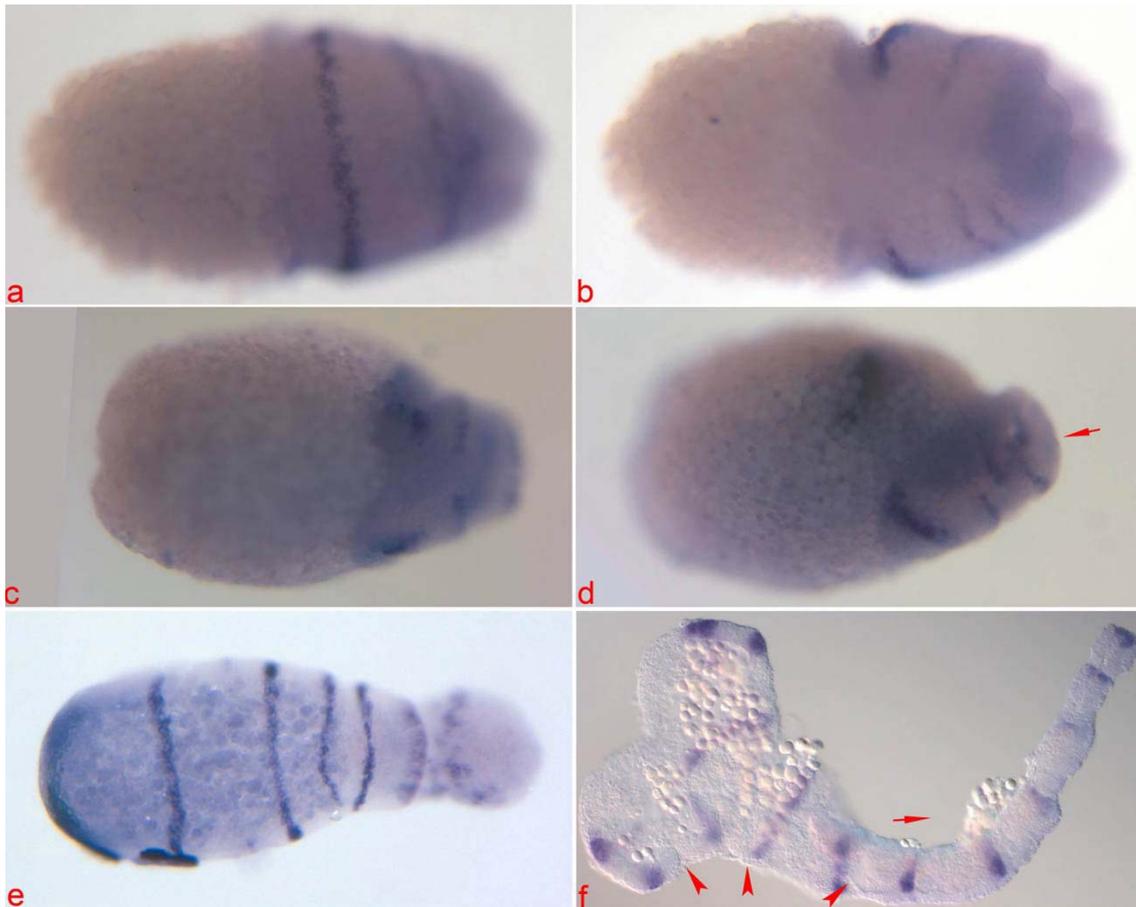


Abb. 19: Expressionsmuster von *wg* in *dpp*-RNAi-knock down-Phänotypen, (a, b, e sind eRNAi; sonst aRNAi): **a**, Stadium der Kondensation und Invagination, von dorsal, erster *wg*-Streifen (ocular) dorsal geschlossen. **b**, Embryo aus a, von ventral, ventraler „Mesoderm“-Streifen anterior stark verbreitert, Invaginationsöffnung ist deformiert. **c**, seltenerer, moderater Phänotyp mit intakten Kopflappen, von ventral, anteriorer Pol ist auch hier links. **d**, Embryo aus c, von lateral, ventral ist unten, weil die Entwicklung einer posterioren Amnionfalte ausbleibt, bleibt die Wachstumszone in der ursprünglichen Orientierung des posterior pit (Wachstumsrichtung = Pfeil). **e**, von dorsal, anteriorer Pol ist links, es erfolgte eine vollständige Verdrängung der Serosa von der Dotteroberfläche, erster *wg*-Streifen (ocular) am anterioren Pol, **f**, seltenerer, moderater Phänotyp mit intakten Kopflappen, von ventral, anteriorer Pol ist links, offensichtlich nach Ausbildung einer posterioren Amnionfalte, daher Aktivität der Wachstumszone in wildtypischer Richtung (Pfeil, Wachstumszone abgerissen), amniotisches Plattenepithel an den Kopflappen sichtbar, Antennal-, Mandibular-, und Maxillarsegment (Pfeilspitzen), dorsale Zellschicksale verlieren sich aber schon über Maxillar- und Labialsegment, alle posterioren Segmente sind nur als Schlauch aus ventralem Ektoderm gebildet.

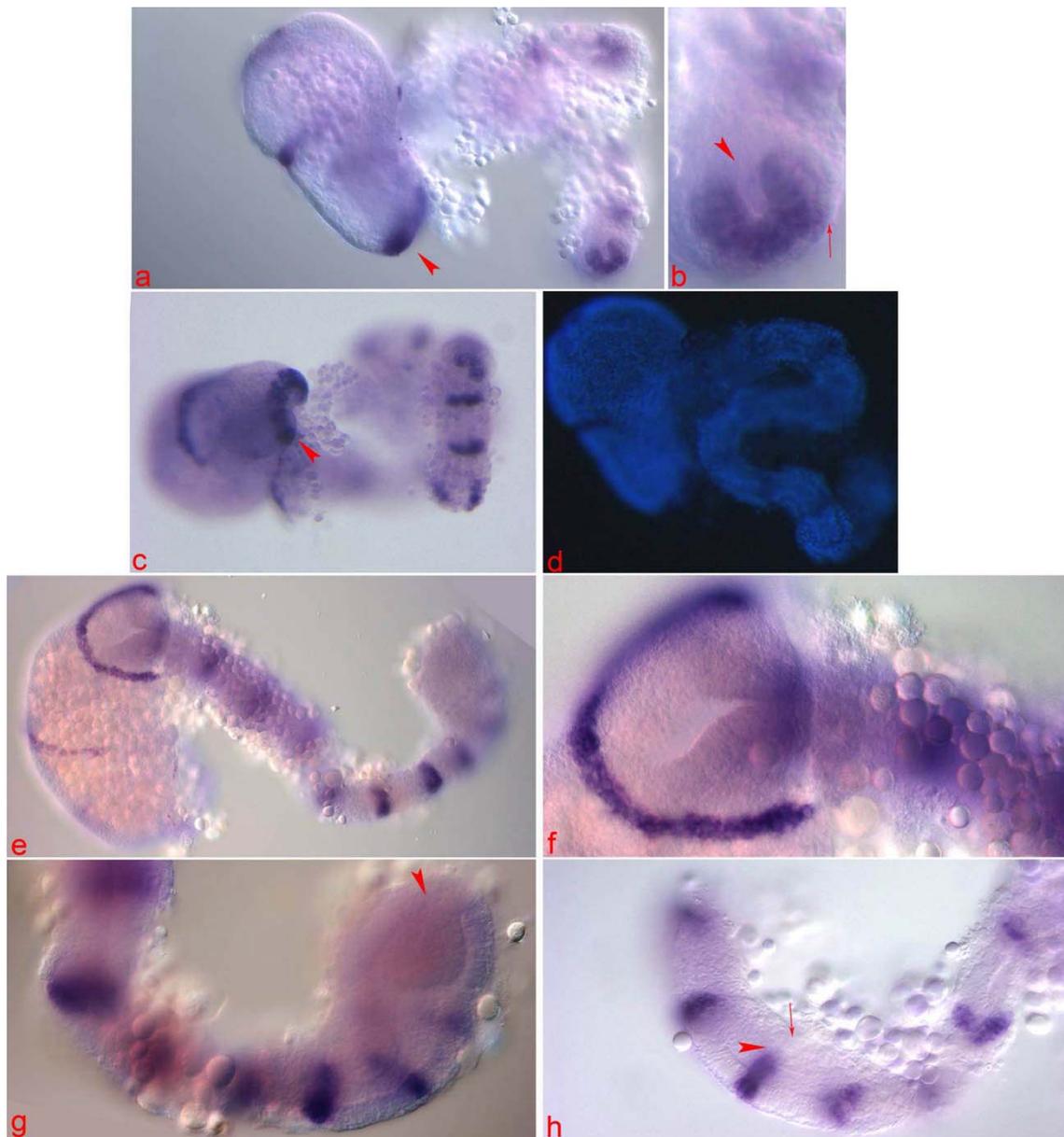


Abb. 20: Expressionsmuster von *wg* in aRNAi-knock down-Phänotypen, wie Abb. 18 „Kappenphänotyp“: dorsale Zellschicksale fehlen: **a**, ausgewachsener Keimstreif, von lateral, Kopflappen als kopfartiger Hohlkörper; *wg*-Streifen des Mandibularsegmentes ist an der Invaginationsöffnung (Pfeilspitze), die Abrißöffnung der Serosa, aus der der Keimstreif (rechts) austritt, ist verdeckt. **b**, Detailvergrößerung aus **a**, optischer Anschnitt der *wg*-Domäne von A6, *wg*-Domäne dorsal geschlossen, weite Ventralfurche mit Neuroektoderm, Mesektoderm und evtl. tlw. Mesoderm gefüllt (Pfeilspitze), das Mesoderm umhüllt den ektodermalen Schlauch (Pfeil), es bleibt ein enges kanalartiges Lumen. **c**, Embryo aus **a**; die *wg*-Streifen von Antennal- und Mandibularsegment sind dorsal geschlossen, letzterer markiert den Rand der Invaginationsöffnung (Pfeilspitze) **d**, Embryo aus **a**, Bisbenzimid-Kernfärbung, andere Orientierung des Keimstreifs als **a**, Mesoderm umhüllt den ektodermalen Schlauch vollständig. **e**, jüngerer Embryo als **a-c**, Stadium: Entstehung von A4, von posterolateral gesehen, der mandibulare *wg*-Streifen ist an der Invaginationsöffnung dorsal geschlossen, die Ventralfurche ist sichtbar, **f**, Ausschnittsvergrößerung aus **e**, ventral mit großer Lücke wegen sterischer Komplikationen, das Mesoderm der Kopflappen sollte über den Dotter gespannt sein und ist wahrscheinlich mit Serosaresten verlorengegangen (Präparationartefakt). **g**, Ausschnittsvergrößerung aus **e**, zu sehen sind abdominale Segmente und die Wachstumszone, die „inner layer“ (= Wachstumszonenmesoderm) und wahrscheinlich auch die „globular mass“ (= Keimzellen oder posteriore Entodermvorläufer) sind ins Lumen der Wachstumszone verschoben (Pfeilspitze), die Struktur der Wachstumszone und die Lage dieser medianen Gewebe im direkten Vergleich mit anterior davon gelegenen *wg*-Domänen bestätigen die Interpretation der Dorsoventralpolarität des Schlauches. **h**, lateraler optischer Anschnitt von abdominalen Segmenten, *wg*-freies medianes Epithel (Pfeilspitze, Neuroektoderm) unterlagert von Mesoderm (Pfeil).

Die embryonale Expression von *twist* nach knock down der *dpp*-Funktion mittels RNA-Interferenz

Twist kann, wenn man die stadienabhängige Migration der mesodermalen Zellen beachtet, als ventraler Marker dienen. Die *twist*-Expression zeigt jedoch auch, daß der eigentliche Vorgang der Mesodermabfaltung und die Expression selbst weitgehend ungestört verlaufen und lediglich durch die morphologischen Abweichungen beeinflusst werden. Die oben erwähnte anteriore Verbreiterung des „Mesodermstreifen“ wird, wie die Bisbenzimidfärbung zeigt (Abb. 21b), nur durch randliche Zellen verursacht, während der mediane Streifen kompakt bleibt. Nur dieser mediane Teil exprimiert *twist*, die randlichen, flächigen Zellen nicht. Ihre Zugehörigkeit zum Mesoderm ist daher fraglich (Abb. 21a, b). Andererseits ist dieser Epithelbereich distinkt vom Ektoderm durch seine geringe Kerndichte und die niedrigere *gbb*-Expression (Daten nicht gezeigt). Nach der Auflösung des *twist*-Streifen in segmentale Domänen läßt sich die anteriore – später mit den Labralanlagen assoziierte – Domäne nur sporadisch nachweisen. Ist sie vorhanden, dann ist sie über gut den halben Eiumfang gestreckt, und Zellen mit *twist*-Signal wirken vereinzelt (Abb. 21g), wohl wegen der geringen Größe dieser Zellpopulation. Im Wildtyp bleibt sie im Gegensatz zu den metameren *twist* Domänen zunächst in medianer Lage vor dem Stomodaeum (Abb. 30b), bis auch diese Zellen in die Labrumknospen einwandern. Die mandibulare Domäne liegt zumeist an der extern-intern-Grenze: meistens ist sie schon invaginiert. Damit besteht die externe Kappe zumeist nur aus den prägnathalen Segmenten. Liegt das Mandibularsegment noch vor der Invaginationsstelle, wird auch hier die *twist*-Domäne erheblich gestreckt (Abb. 21e). Maxillarsegment, Thorax und Abdomen sind stets invaginiert. Die Lage der noch nicht separierten Mesodermblöckchen weist die aufeinanderstoßenden Ränder des ektodermalen Schlauches als Ventralfurche aus (Abb. 21c-f). Dies deckt sich mit der dorsoventralen Polarität der Wachstumszone. In älteren Segmenten migrieren die Mesodermzellen aus ventraler Position weg in Richtung gegenüberliegende Schlauchseite. Mangels Raum wird in ventralen Positionen aber offensichtlich kein Ektoderm freigelegt (Abb. 21i-k). Die Morphologie der Wachstumszone wirkt meist wildtypähnlich und besitzt eine terminale *twist*-Domäne mit Wildtyp-ähnlichen Details. Man findet aber auch Individuen, in denen die terminale *twist*-Domäne vorzeitig (Entstehung von A3) reduziert scheint (Abb. 21e). Es ist nicht zu sagen, ob dies Färbefaktoren oder phänotypische Veränderungen sind.

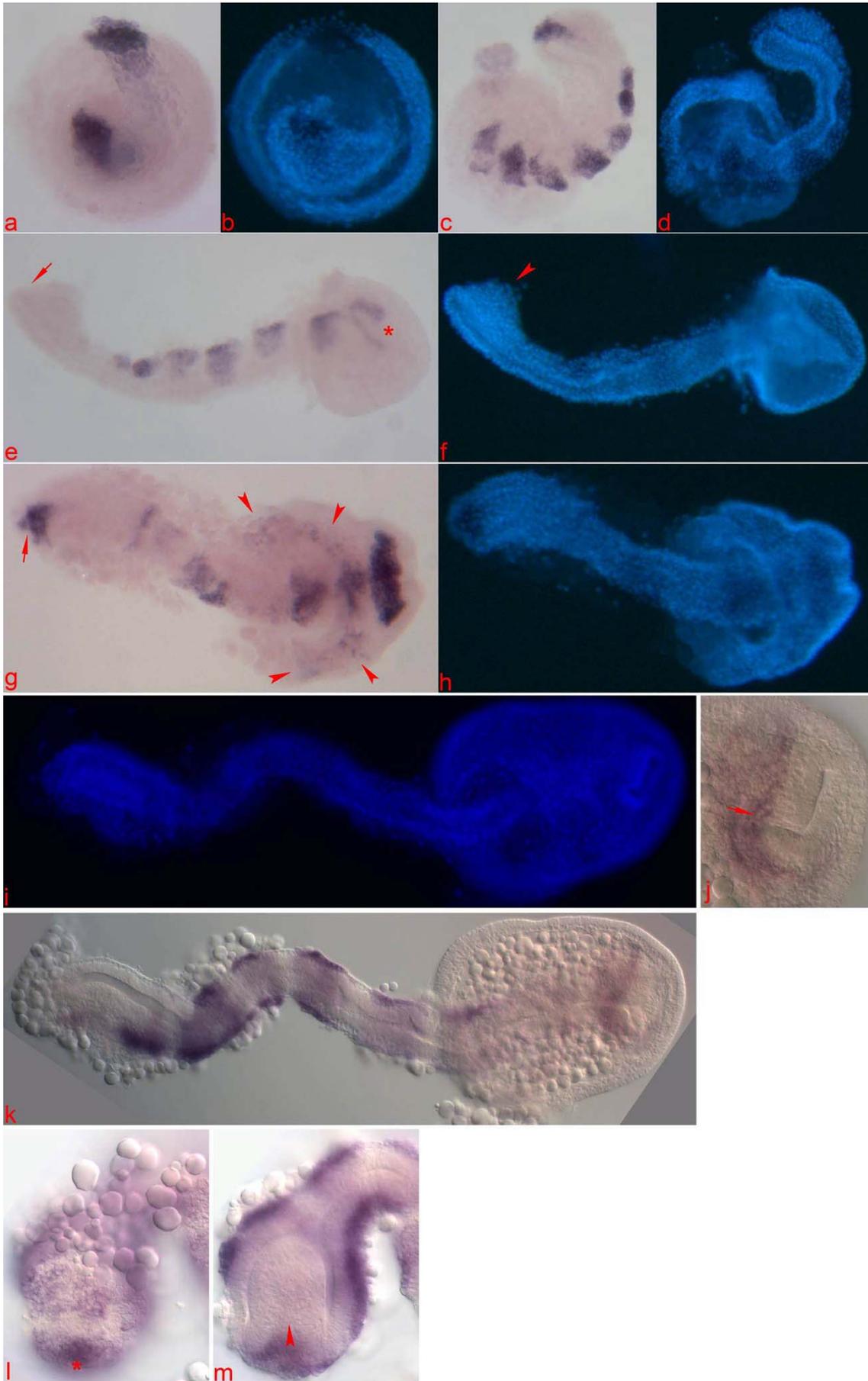
Das Dach der Wachstumszone wird aus dickem kuboidalem oder Säulenepithel gebildet. Im gesamten Embryo läßt sich kein Plattenepithel nachweisen. Gelegentlich jedoch kommen auch Komplikationen an der Wachstumszone vor (Abb. 21l, m). Diese

Komplikationen weisen auf unterschiedliche Wege hin, wie das Problem des Flächenverlustes durch Deletion dorsaler Schicksale gelöst wird: Der häufige Weg ist das „Hochklappen“ der Wachstumszonenflanken zur Bildung des Daches. Seltener ist die Variante, daß der posteriore Teil der Wachstumszone sich als Dach auf dieselbe faltet (Abb. 21l,m). Anhängende Gewebe wie „inner layer“ und „globular mass“ werden mit verlagert (Pfeil in Abb. 21m).

Alle *dpp*-RNAi-Keimstreifen wachsen, sofern die Invagination nicht sterisch blockiert ist, frei in den Dotter ein, ändern dabei die Richtung ihres AP-Wachstums mehrfach und unter Umständen auch die Orientierung ihrer DV-Achse relativ zum Ei, wie sich mit der *twist*-in situ-Hybridisierung belegen läßt. Nur in jungen Stadien (bis zur Bildung der ersten Abdominalsegmente) findet man Keimstreifen mit konstanter, d.h. nicht verdrehter DV-Polarität.

Damit sind offenbar auch in später durch die Wachstumszone gebildeten Segmenten dorsale Schicksale deletiert. Die Musterbildung in ventralen Anlagen scheint aber unabhängig von *dpp* zu erfolgen.

Abb. 21 (Seite 94): Expressionsmuster von *twist* in aRNAi-knock down-Phänotypen (*twi*-Wildtypexpression in Abb. 30): **a**, Ansicht von anterior auf das posteriore Ende der invertierten Wachstumszone, zwischen der *twist*-Domäne der Wachstumszone und dem *twist*-Streifen zwischen den kappenförmigen Kopflappen ist eine Stadium-typische Lücke (vgl. Abb. 30a), **b**, Bisbenzimid-Kernfärbung von **a**. **c**, Embryo bei der Entstehung von A1, *twist*-exprimierende Mesodermblöckchen sind rautenförmig und unterlagern den schlauchförmigen Keimstreif, dessen dorsale Seite noch mesodermfrei ist. **d**, Bisbenzimid-Kernfärbung von **c**. **e**, Embryo bei der Entstehung von A1, *twist*-exprimierende Mesodermblöckchen sind rautenförmig, Ausnahme: das mandibulare Mesodermblöckchen an der Invaginationsöffnung (Stern) ist bogenförmig gedehnt, die terminale *twist*-Domäne der Wachstumszone fehlt in diesem Embryo (Pfeil) **f**, Bisbenzimid-Kernfärbung von **e**, die „globular mass“ markiert die Ventralseite wie im Wildtyp (Pfeilspitze). **g**, jüngerer Embryo (Keimrudimentstadium), der *twist*-Streifen ist erst in segmentaler Unterteilung begriffen, daher ist die bogenförmige anteriore *twist*-Domäne (Pfeilspitzen) der Kopflappen noch sichtbar, diese auch im Wildtyp kleine Zellpopulation unterwandert die gesamte phänotypisch ringförmige Einfaltung der Kopflappen an der Serosagrenze und erscheint daher lückenhaft verteilt, die prominente mandibulare *twist*-Domäne liegt gerade noch extern an der Invaginationsstelle, die terminale *twist*-Domäne der Wachstumszone ist hier vorhanden (Pfeil). **h**, Bisbenzimid-Kernfärbung von **g**. **i**, Bisbenzimid-Kernfärbung von **k**. **j**, Ausschnittsvergrößerung aus **i**, *twist*-exprimierendes mandibulares Mesodermblöckchen unterlagert die Ventralfurche (Pfeil) der Invaginationsöffnung. **k**, optischer Anschnitt, in invaginierten Segmenten umhüllt das Mesoderm den Keimstreif, in jüngsten Segmenten liegt es noch ventral, die Kopflappen umschließen einen Teil des Dotters vollständig, da dorsale Schicksale fehlen, wird das Dach der Wachstumszone von ihren ventral-ektodermalen Flanken gebildet, sie erscheint daher kompakt und symmetrisch (vgl. **g**, **h**). **l**, stark deformierte Wachstumszone, Stadium etwa bei der Entstehung von A3, der posteriore Teil ist zur Flächenkompensation für das reduzierte Amnion auf die anteriore Wachstumszone geklappt. **m**, tiefer optischer Anschnitt von **l**, Teile der „inner layer“/„globular mass“ könnten in die Ektodermfalte verlagert sein (Pfeilspitze), dementsprechend ist die *twi*-Expression am unteren Bildrand (Stern) das Mesodermblöckchen des neuentstehenden Segments und nicht etwa die terminale *twist*-Domäne.



Die embryonale Expression von *orthodenticle-1* nach knock down der *dpp*-Funktion mittels RNA-Interferenz

Die blastodermale Expression von *otd-1* ist in Li, Brown et al. (1996) und Schröder (2003) beschrieben. In frühen Blastodermstadien ist maternale *otd-1* mRNA zunächst noch gleichförmig im Blastoderm verteilt, zieht sich aber bald vom posterioren und anterioren Pol zurück, um im zweiten Viertel der Eilänge einen umlaufenden Gürtel zu bilden. Während der Serosadifferenzierung wird das gürtelförmige Signal ersetzt durch eine ventrale, halbmondförmige Domäne, deren Spitzen sich zunächst noch dorsal berühren. Sie ziehen sich aber, mit Ausdehnung der Serosa weiter nach ventral zurück (Abb. 7c). Im ventralen, medianen Bereich wird das Gen schließlich ebenfalls abgeregelt, sodaß bilateral zunächst keilförmige Expressionen entstehen, die die Kopflappen identifizieren. Im Zuge der Gestaltbildung der Kopfanlagen im medianen Teil geht durch die Einbuchtung die Keilform verloren (Abb. 22d, f, h). Durch diese dorsoventrale Asymmetrie ist dieses Expressionsmuster gut geeignet, um frühe phänotypische Veränderungen der dorsoventralen Verhältnisse anzuzeigen. In *dpp*-knock down Embryonen ist schon im späten Blastoderm eine veränderte *otd-1*-Expression zu erkennen (Abb. 22c): während sich ventral die *otd-1* Domäne durch die *twi*-Domäne wie im Wildtyp „aufspaltet“ (Abb. 22e, g), bleibt sie auf der dorsalen Seite zusammenhängend gürtelförmig (Abb. 22i). Das Auseinanderweichen nach lateral bzw. ventral, wie es durch die nach dorsoposterior expandierende Serosa verursacht wird, unterbleibt also. Dementsprechend zeigt auch die Bisbenzimidfärbung eine nahezu drehrunde, kappenförmige Serosa, die auch im posterior pit Stadium nur etwa das anteriore Fünftel des Eies einnimmt (Abb. 22e). Auch die *otd-1*-Expression in der Kopf-Kappe junger *dpp*-RNAi-Keimstreifen zeigt durch die dorsal umlaufende Expression das Fehlen dorsaler Schicksale an (Abb. 23). Neben diesem häufigsten Phänotyp bestätigt das *otd-1*-Muster die Struktur der selteneren, moderaten Phänotypen mit Wildtyp-ähnlichen Kopflappen: die bilateralen *otd-1*-Domänen sind auch hier ventral unterbrochen und enden am Keimstreifrand (Abb. 23c, e, f). Damit hat sich die Serosa-Embryo-Grenze in diesen Embryonen zumindest im Bereich der Kopflappen soweit nach dorsoposterior ausgedehnt, daß sie die *otd-1*-Domänen dorsal unterbrochen hat. Im Keimstreif des Wildtyps wird *otd-1* indes (wie *gbb*) in der medialen Säule des Neuroektoderms exprimiert (Li et al., 1996). Die *otd-1*-Expression in *dpp*-RNAi-Keimstreifen (vgl. Abb. 23b mit Wildtyp in Teilabb. d) zeigt die Existenz von medialem Neuroektoderm, das im Wildtyp im Wesentlichen die Ventralfurche bildet. Sie bestätigt damit die oben ausgeführte Interpretation der Dorsoventralpolarität mit *wg*-Domänen, die aufgrund der Deletion dorsaler Schicksale dorsal geschlossen sind.

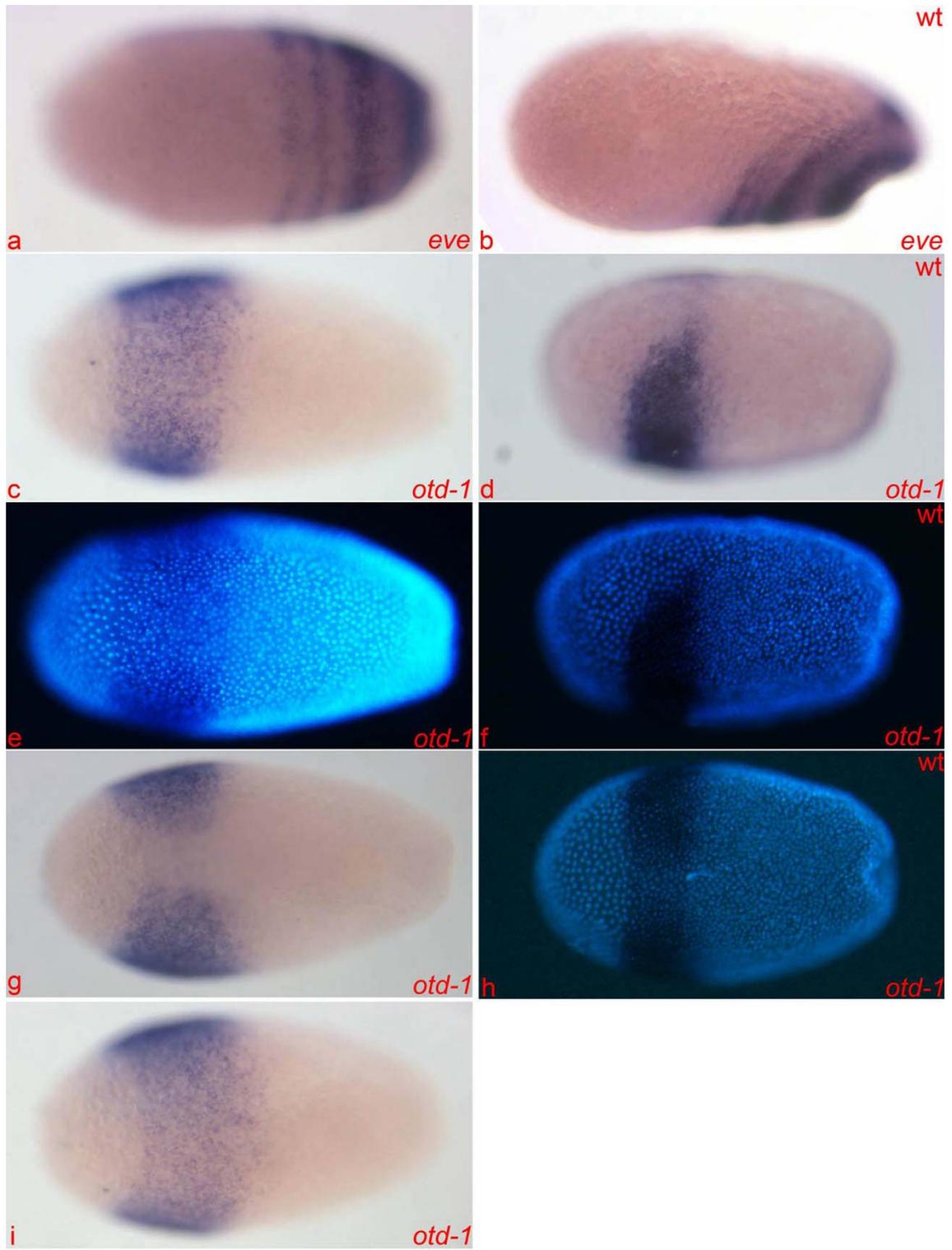


Abb. 22 (Seite 96): Expressionsmuster von *even-skipped* und *otd-1* in *dppM*-knock down-Phänotypen, alle im posterior pit-Stadium: (b, d, f, h, Wildtyp-Embryonen), a, knock down-Embryo, der erste *eve*-Streifen ist bereits in segmentale Streifen aufgespalten, der zweite und dritte noch nicht, alle Streifen sind dorsal geschlossen. b, Wildtypembryo, die Serosa scheint die *eve*-Streifen dorsal zu spalten, wahrscheinlich werden sie jedoch durch den Abrollungsprozeß über die posteriore Amnionfalte in das Amnion über ihre ektodermalen Teile verbracht. c, knock down-Embryo von lateral, *otd-1* bildet eine gürtelförmige Domäne orthogonal zur AP-Achse. d, Wildtypembryo, die *otd-1*-Domäne ist dorsal keilförmig und ventral durch Gestaltbildung der Kopflappen abgeschnitten (vgl. Abb. 7). e, knock down-Embryo, Bisbenzimid-Kernfärbung von c, Zellen der differenzierten Serosa sind eindeutig an ihrem breiten Plasmasaum zu erkennen, Serosaschicksale sind nach anterior gedrängt. f, Wildtypembryo, Bisbenzimid-Kernfärbung von d, die Serosa begrenzt die *otd-1*-Domäne dorsal und anterior. g, Ventralansicht von knock down-Embryo aus c, e, die Verschiebung des Anlagenplans nach anterior ist ventral weniger ausgeprägt als lateral und dorsal (vgl. e-i). h, Bisbenzimid-Kernfärbung des Wildtyp-Embryos aus f von ventral. i, knock down-Embryo aus g von dorsal.

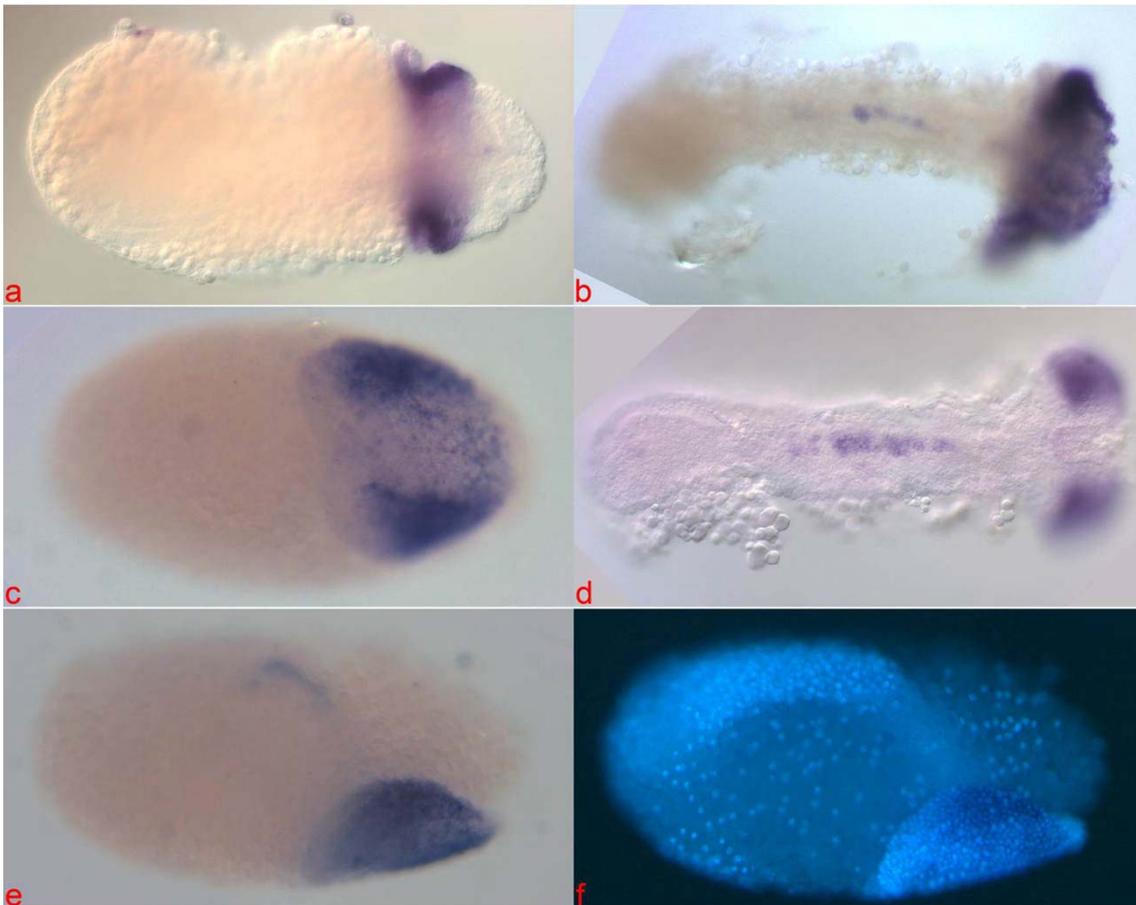


Abb. 23: Expressionsmuster von *otd-1* in *dppM*-knock down-Embryonen und wt-Embryo (d): a, knock down-Embryo von ventral, die prominente *otd-1*-Kopflappendomäne markiert die dorsal geschlossene Einsenkung, tiefe Einsenkung des Epithels mit Verdichtung, die Bildung einer überwachsenden Amnionfalte bleibt aus, von der terminalen Invaginationsöffnung bis jenseits der Kopflappen ist eine mediane, neuroektodermale *otd-1*-Linie sichtbar (vgl. d). b, junger Keimstreif (etwa Entstehung von T3/A1), von Dotter freipräpariert, Kopf-Domäne und neuroektodermale Domäne wie in a. c, seltenerer, moderater Phänotyp mit weitgehend intakten Kopflappen, von ventral, anteriorer Pol ist links, die *otd-1*-Expression ist wildtypähnlich, die mediane Einbuchtung ist reduziert (Areal starker wildtypischer *dpp*-Expression im Blastoderm). d, Wildtypembryo mit *otd-1*-Domänen der Kopflappen und des medianen Neuroektoderms. e, Lateralansicht von c, ventral ist unten, neuroektodermale Domäne sichtbar. f, Bisbenzimid-Kernfärbung von e.

Die embryonale Expression von *even-skipped* nach knock down der *dpp*-Funktion mittels RNA-Interferenz

Die Untersuchung zahlreicher *eve*-in situ-hybridisierter Embryonen zeigte keine Anomalien in der anteroposterioren Musterbildung. Auch deshalb ist die Signifikanz der in Kutikula-Präparaten zuweilen gefundenen *dpp*-RNAi-Kopf-Segmentierungsdefekte sehr fraglich. Statt dessen bestätigte dieser Marker einmal mehr das Fehlen dorsaler Schicksale in anterioren (gnathalen) Segmenten (vgl. Abb. 22a & b).

In situ-Hybridisierung zum Nachweis von *dpp*-mRNA in knock down der *dpp*-Funktion mittels Morpholino-Oligonucleotiden

dpp-Morpholino-Oligonucleotide verhindern die Translation der mRNA und verursachen ihre Akkumulation in der Zelle. In *dpp*-Morpholino-Embryonen lassen sich durch *dpp*-in situ-Hybridisierung sehr distinkte Signale um die Zellkerne der Serosa erzeugen. Diese spezifische Anfärbung bestätigt auch eindrucksvoll die kappenförmige Positionierung der Serosa ohne offensichtliche dorsoventrale Polarität. Eine *dpp*-exprimierende intermediäre Zellpopulation ist weder in der in situ-Hybridisierung, noch morphologisch in der Bisbenzimidfärbung auszumachen. Allgemein zeigt sich im embryonalen Gewebe ein schleierartiges Signal, das nur um die posteriore Invaginationsöffnung etwas stärker ist. Möglicherweise sind alle *dpp*-exprimierenden Schicksale deletiert. Über eine eventuelle Autoregulation von *dpp* lassen diese Experimente keine zuverlässigen Aussagen zu. Allerdings muß die Bewertung der Befunde vorsichtig erfolgen. In *Tc'gt*-Morpholino-knock down-Embryonen kommt es in keinem Gewebe zu Akkumulation von *gt*-mRNA (A. Cerny pers. Mitt.).

Serosa-Zellkerne neigen offenbar dazu sich an der ventralen Grenze zum Keimrudiment zu sammeln und in einigen *dpp*-Morpholino-Embryonen lassen sich auch punktförmige Kernaggregationen ausmachen, die keine dorsoventrale Präferenz zeigen (Abb. 24). Da solche Aggregationen in Bisbenzimidfärbungen von *dpp*-RNAi-Embryonen nicht auftreten, handelt es sich möglicherweise um Artefakte durch Mikroinjektion.

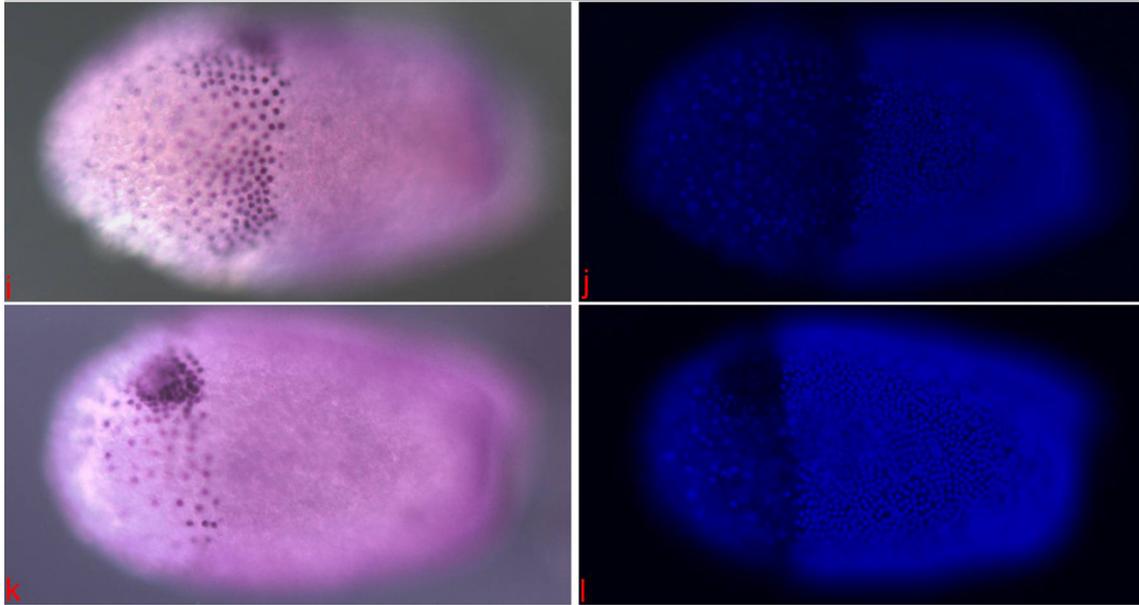


Abb. 24: In situ-Hybridisierung zum Nachweis von *dpp*-mRNA in *dppM*-knock down-Phänotypen, posterior pit-Stadium; starke Signale in Serosakernen durch Akkumulation von *dpp*-mRNA bei blockierter Translation, kaum Akkumulation im Embryo **a**, Häufung von Serosakernen an der Serosagrenze; **b**, Bisbenzimid-Kernfärbung von **a**; **c**, punktuelle Häufung von Serosakernen (möglicherweise ein Artefakt durch Mikroinjektion); **d**, Bisbenzimid-Kernfärbung von **c**.

Mit den Expressionsmustern von *gbb*, *wg*, *twist* und *otd-1* konnte die dorsoventrale Orientierung sowohl der auf der Dotteroberfläche verbliebenen, wie auch der invaginierten Keimstreifteile bestimmt werden. Vor allem die *wg*-Expression zeigt die Deletion dorsaler Schicksale an. *Gbb*-, *twist*- und *otd-1*-Expression deuten darauf hin, daß ventrale Anlagen durch den knock down der *dpp*-Funktion nicht kompromittiert werden.

3.2 Glass bottom boat – *gbb*

3.2.1 Embryonale Expression von *gbb* in *Tribolium*-Wildtyp

Expressionsmerkmale für Keimrudiment und Keimstreif werden in Pincus, Pletcher et al. (in Vorbereitung) beschrieben, wobei auch für dieses Gen eine segmentale Periodizität erwähnt wird. Blastodermale Expressionen werden nicht beschrieben. In der vorliegenden Arbeit werden erstmals frühe blastodermale *gbb*-Expressionen gezeigt und der weitere Verlauf der Expression bis zum Stadium des ausgewachsenen Keimstreifs beschrieben.

Die im Wildtyp gefundenen Expressionsmuster von *glass bottom boat* (*gbb*) weisen zwei Merkmale auf: Wirkliche Muster der *gbb*-Expression treten zunächst als Maxima in einer ubiquitären Expression auf. Nach dem Rückzug der ubiquitären Expression liegen die meisten Domänen bis zu ihrem Verschwinden noch als Gradienten vor. Im Falle von *gbb* bildet also nicht nur das Genprodukt einen Konzentrationsgradienten über das Epithel, wie im Falle von *dpp*, sondern die Transkriptionsaktivität des *gbb*-Gens selbst, ist von einem Aktivitätsmaximum abfallend differentiell reguliert. Dieser Punkt erschwert teilweise die Analyse der Expressionsmuster.

Die meisten *gbb*-Expressionen liegen nach Rückzug der anfänglich ubiquitären Expression mit *dpp*-Domänen geschachtelt („nested“) vor. Hierbei liegt in der *gbb*-Domäne, häufig an einer Stelle erhöhter *gbb*-Transkriptionsaktivität, eine *dpp*-Domäne mit zumeist klarer Kontur und von geringerer Ausdehnung als die gesamte nachweisbare *gbb*-Expression. Die „mediane *gbb*-Domäne“ stellt eine auffällige Ausnahme dar: sie ist sozusagen eine „autonome“ Expression, ohne assoziierte *dpp*-Domäne im Wildtyp (Abb. 14).

Expressionsmuster in der frühen Embryonalentwicklung

Eine Expression von *gbb* ist schon im frühen Blastodermstadium nachweisbar, deutlich bevor sich Serosa und embryonale Epithelien differenzieren. *Gbb* wird früh als drehsymmetrischer, anteriorer Gradient exprimiert, dessen Expressionsmaximum am anterioren Pol liegt und entlang der AP-Achse mindestens 50% EL durchspannt (Abb. 25a).

Wahrscheinlich gleichzeitig, in jedem Falle aber, bevor sich die Morphologie der posterioren Zellen im Bereich des präsumptiven posterior pit verändert, tritt auch am posterioren Pol ein Signal auf. Ihr Auftreten ist also in etwa auch zeitgleich zum Entstehen der posterioren *dpp*-Domäne dieses Stadiums (Abb. 25b). Im frühen posterior pit-Stadium, also

bei der Abflachung des posterioren Pols vor Invagination, zieht sich die *gbb*-Expression vom anterioren Pol zurück – ähnlich der *dpp*-Expression.

In der nun folgenden Dynamik der *gbb*-Expression gibt es einige signifikante Unterschiede zwischen den beiden BMP. Das Zurückziehen der *gbb*-Expression vom anterioren Pol geschieht im Gegensatz zu der Entwicklung bei *dpp* dorsoventral symmetrisch, d.h. die anteriore Grenze der Expression berührt zunächst im ventralen Teil die Serosa-Amnion-Grenze. In der weiteren Entwicklung weicht sie weiter nach posterior zurück, aber mit einer zur AP-Achse senkrecht stehenden anterioren Grenze (Abb. 25c-e). Nach der Differenzierung der Serosa als gekippte, anterodorsale Kappe wird die embryonale *gbb*-Expression (ventroposteriorer Teil des anterioren Gradienten) abgeregelt. Dadurch entsteht eine – von lateral gesehen – keilförmige, dorsale *gbb*-Domäne in der Serosa.

Die Expressionen von *gbb* und *dpp* sind in einer vorübergehenden Phase komplementär. Die *gbb*-Expression in Abb. 25e ergänzt sich mit der *dpp*-Expression in Abb. 25h zu einem breiten Streifen (ähnlich einer Gapgen-Domäne), der diagonal von der Serosa-Embryo-Grenze durchspannt wird. Die anteriore und die posteriore Grenze sind unscharf und es existiert ein schmaler Überlappungsbereich der Expressionen in in randlichen Serosazellen (2-3 Zellen breit). Die Lagebeziehung von *gbb* zu *otd-1* ist ähnelt der zu *dpp* (vgl. Abb. 25). Außerdem liegt der (*gbb+dpp*)-Streifen zunächst an der Position des transienten *otd-1*-Streifens des vorherigen Stadiums.

Im weiteren Verlauf zieht sich die *gbb*-Expression auf die randliche Serosazellen zurück, gibt aber nie den dorsoposterioren Teil der Serosa-Embryo-Grenze frei, wie dies bei *dpp* der Fall ist (vgl. Abb. 25e, g mit h). Diese Expression an der Grenze zum Keimrudiment persistiert bis zum Schluß des Serosafensters (Abb. 26, Abb. 27c).

Bevor die posteriore Amnionfalte den posterioren Pol überschreitet, wird *gbb*-Expression in den Kopfanlagen im Bereich der *otd-1*-Expression verstärkt exprimiert (Abb. 25g). Anschließend beginnt die Expression im restlichen embryonalen Epithel, bis das gesamte ektodermale Gewebe möglicherweise einschließlich des Mesoderm *gbb* exprimiert. Die Expression in den Kopflappen bleibt stärker als die ubiquitäre Expression bis in ihrem Bereich Einsenkungen morphologisch erkennbar sind. Der erste Eindruck, daß der Mesodermstreifen kein *gbb* exprimiert wird durch die kontrastierenden Maxima der ektodermalen *gbb*-Expression verursacht, die sich schon im jungen Keimrudiment entlang des Mesoderms einstellen. Möglicherweise exprimiert jedoch auch das mesodermale Epithel vor der Mesoderminvagination *gbb* auf sehr niedrigem Niveau (Daten nicht gezeigt). In diesem

Falle wäre die *gbb*-Expression im Embryo und Amnion wirklich ubiquitär. Dieses schwache, in der Mesodermanlage gefundene Signal kann jedoch auch Hintergrund sein.

Noch bevor die erste dorsoventrale Asymmetrie des posterior pit die Bildung der posterioren Amnionfalte andeutet, wird die *gbb*-Expression im dorsalen Teil des posterior pit-Randes stärker (analog zu *dpp*, Abb. 28). Insbesondere der Scheitel der sich entwickelnden posterioren Amnionfalte exprimiert *gbb* stärker als das umliegende Epithel.

In freipräparierten, jungen Keimrudimenten mit noch weitem Serosafenster lassen sich schon distinkte Muster als Maxima innerhalb der generalisierten Expression erkennen. Neben den erwähnten ektodermalen Domänen entlang des Mesoderms sind auch mediane oder paramediane Expressionsmaxima innerhalb der starken, flächigen Expression des Amnionepithels zu erkennen (Abb. 27h & i, Abb. 31a & b). Diese ektodermalen und amniotischen Expressionen gehen am posterioren Ende der Wachstumszone ineinander über und scheinen dort an dieser Stelle am stärksten zu sein (s.u.). Sie bleiben in der weiteren Embryonalentwicklung sehr stabil. Anterior wird die Kontur der Bereiche der Kopflappen, die zuerst eingesenkt werden, durch eine vergleichsweise starke *gbb*-Expression nachgezeichnet (Abb. 26e & g, Abb. 27a), also sozusagen eingerahmt.

Das Muster im eingefalteten Keimrudiment wird durch lokale Maxima und Gradienten innerhalb der ubiquitären Expression bestimmt. Expressionsfreie Epithelflächen treten erst im Ektoderm des jungen Keimstreifs etwa zur Zeit der Abgliederung der ersten Abdominalsegmente auf (s.u.).

Mit zunehmender Ausdehnung der Serosa-Embryo-Grenze nach posterior verschmälert sich auch die ventrale *gbb*-Domäne der Serosa (vgl. Abb. 25e,g mit Abb. 26e und Abb. 27a) zu einer 1-2 Zellen breiten Linie (Abb. 26i & Abb. 27e). Es fällt auf, daß die unmittelbar posterior der ventralen Serosa-Embryo-Grenze liegenden „intermediären Zellen“ kein *gbb* exprimieren (Abb. 26i). Im lateralen und posterioren Bereich umfaßt die Expression, sowohl die randlichen Serosazellen, wie auch das Rudiment, ohne daß eine *gbb*-expressionsfreie Zellpopulation dazwischen nachzuweisen wäre. Auch beide Blätter der hinteren Amnionfalte exprimieren *gbb*. (Abb. 27, Abb. 28) Im lateralen Bereich, zwischen anteriorer und posteriorer Amnionfalte ist die *gbb*-Domäne der Serosa 3-4 Zellen breit (Abb. 27c). In jungen Keimstreifen mit noch offenem Serosafenster zeigt sich in Analogie zur *dpp*-Expression, an dessen Rand eine deutliche *gbb*-Expression. Neben den ohnehin *gbb*-exprimierenden Amnionzellen, kann man die Expression im äußeren Blatt einem 4-5 Zellen breiten Ring von Serosazellen zuordnen. Zusammen mit der *dpp*-Expression ein Hinweis auf ihre Abkunft von Zellen der frühen Serosa-Embryo-Grenze (Abb. 27g, h).

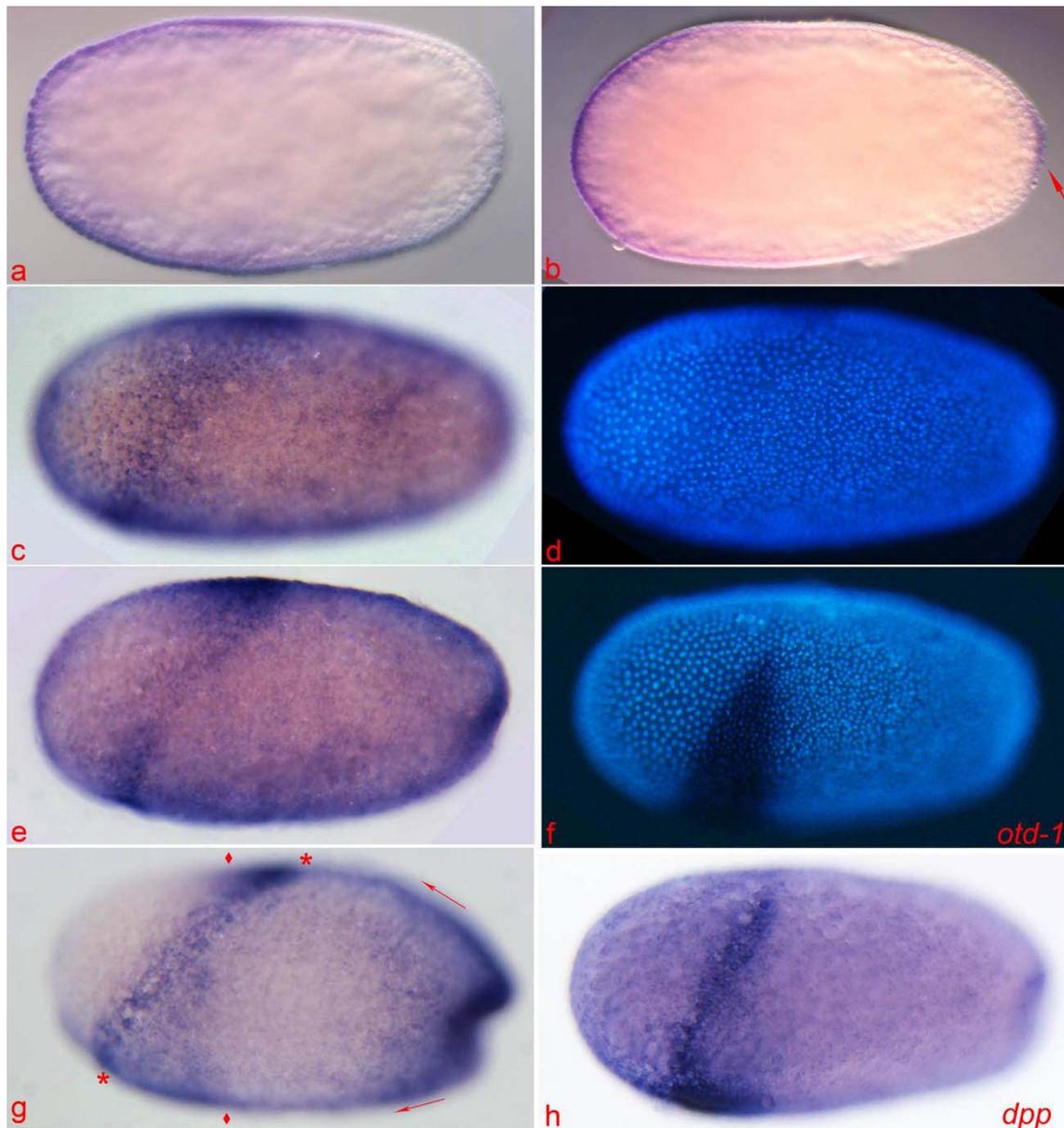


Abb. 25: Expression von *Tc'gbb* und *Tc'otd-1* im Wildtyp: **a**, Blastoderm; gradientenförmige *gbb*-Kappe über anteriore 50% EL. **b**, etwas älteres Blastoderm; anteriore *gbb*-Kappe und posteriore *gbb*-Domäne (Pfeil) von lateral. **c**, von lateral; Serosa bereits differenziert; die *gbb*-Expression zieht sich dorsoventralsymmetrisch (im Gegensatz zu *dpp*, vgl. Abb. 7a & b) nach posterior zurück, *gbb* bleibt aber an Serosa-Embryo-Grenze aktiv und auf die Serosa beschränkt. **d**, Bisbenzimid-Kernfärbung zu **c**. **e**, posterior pit-Stadium; starke Expression im Serosarand, die dorsal geschlossen und sogar verstärkt ist (im Gegensatz zu *dpp*, vgl. Abb. 7); die posteriore *gbb*-Domäne verstärkt sich im dorsalen Rand des posterior pit. **f**, differenziertes Blastoderm; keilförmige *otd-1*-Expression unmittelbar nach der Serosadifferenzierung; Bisbenzimid-Kernfärbung. **g**, späteres Stadium als **e**; eine starke *gbb*-Expression am Serosarand (Sterne) ist sichtbar, nun tritt zusätzlich auch *gbb*-Expression im Bereich präsumptiver Kopflappen auf, jedoch als gleichmäßiger Keil; die posteriore Grenze der embryonalen *gbb*-Expression entspricht der anterioren Grenze der Serosa-Expression von *gbb* (Rauten); auch von posterior breitet sich die *gbb*-Expression im embryonalen Epithel aus (Pfeile). **h**, *dpp*-Expression in dem zu **e** und **f** vergleichbaren posterior pit-Stadium; *gbb*- und *dpp*-Expression sind transient komplementär und ergänzen sich zu einem breiten Streifen; Koexpression gibt es anfangs nur in der *dpp*-Domäne im Serosarand, später auch in den Kopflappen (**g**).

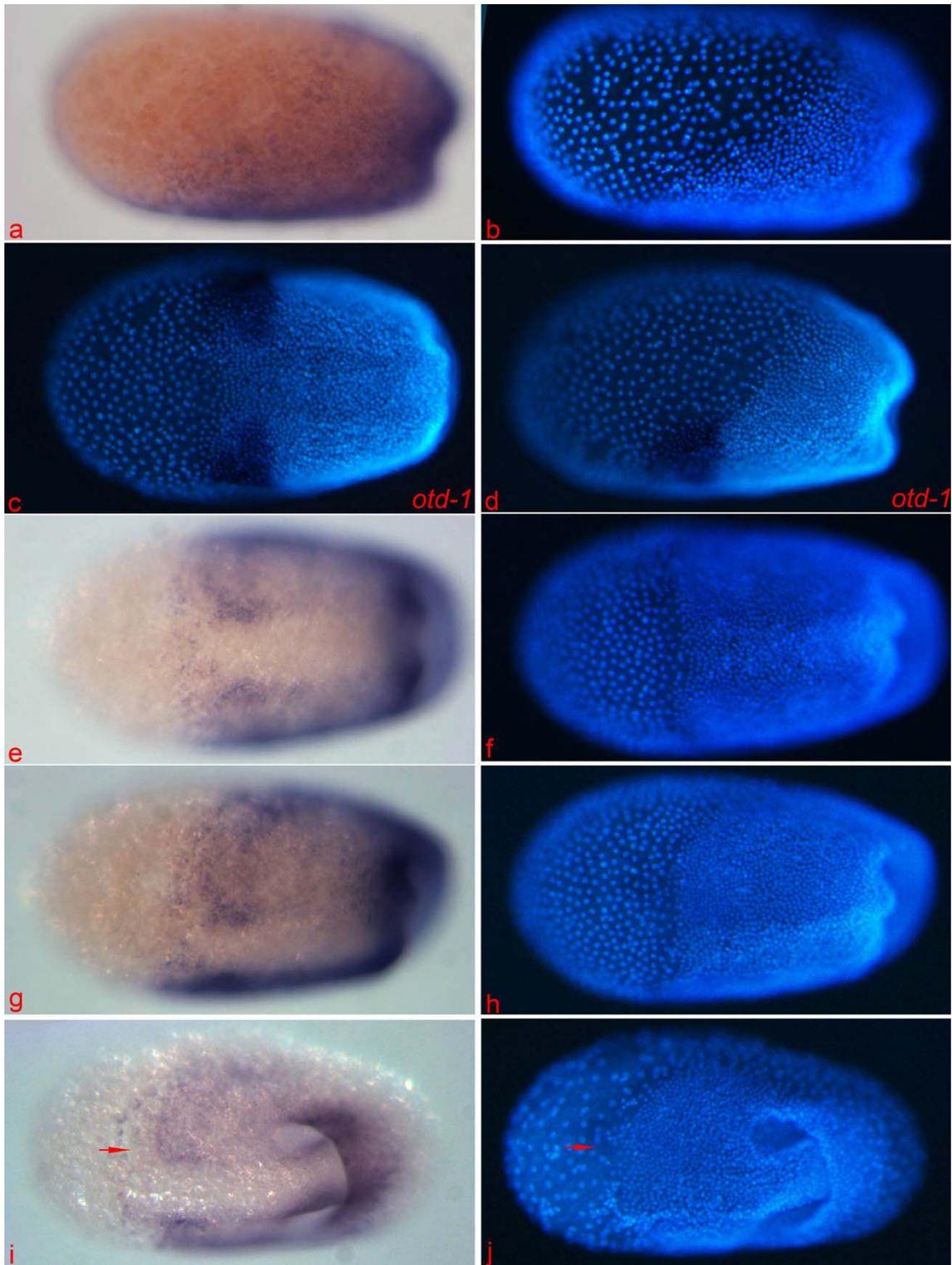
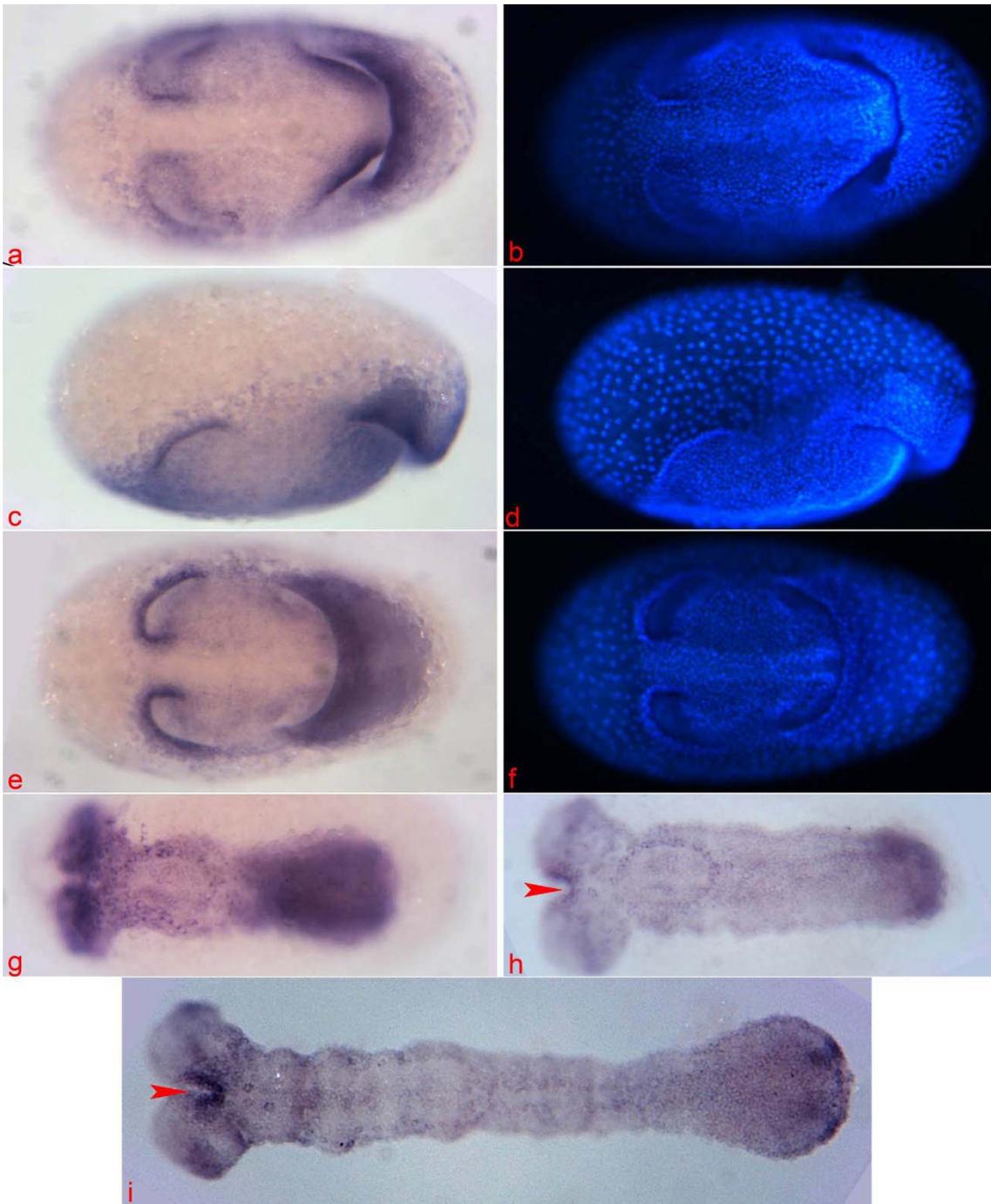


Abb. 26 (Seite 104): Expression von *Tc'gbb* und *Tc'otd-1* im Wildtyp: **a**, von lateral: spätes posterior pit-Stadium; dorsal geschlossene Expression im Serosarand und ubiquitäre Expression im Embryo, ein Teil der posterioren Amnionanlage ist als dorsal breiterer Gürtel schwächerer *gbb*-Expression zwischen Serosarand und posteriorer Amnionfalte zu erkennen. **b**, Embryo aus **a**; Bisbenzimid-Kernfärbung. **c**, von ventral; Bisbenzimid-Kernfärbung; die *otd-1*-Expression der Kopflappen liegt im Bereich der *gbb*-umrandeten Einsenkungen (vgl. **e**). **d**, Embryo aus **c**, von lateral. **e**, die posteriore Amnionfalte überschreitet den posterioren Pol; *gbb*-Expression findet sich auch im ventralen Serosarand; das Ektoderm zeigt eine mehr oder weniger ubiquitäre Expression, worin alle erkennbaren Muster als Transkriptionsmaxima eingebettet sind; die Kopflappendomänen umranden die prospektiven Einsenkungen; eine prominente Expression findet sich in den posterioren Seitenplatten und der Amnionfalte; keine oder eine sehr schwache Expression findet sich im ventralen Mesodermstreifen. **f**, Embryo aus **e** in Bisbenzimid-Kernfärbung. **g**, **h**, Embryo aus **e** bzw. **f** von ventrolateral. **i**, älteres Stadium als **e**; größeres Areal an ventralen „intermediären Zellen“ zwischen Serosagrenze und Ektoderm, diese exprimieren kein oder nur schwach *gbb* (Pfeil). **j**, Embryo aus **i** in Bisbenzimid-Kernfärbung; „intermediäre Zellen“ (Pfeil) unterscheiden sich durch mittlere Zell- und Kerngröße von den anderen beiden Populationen (Serosa und embryonale Zellen); ein Vergleich von **h** und **j** zeigt die zunehmende Ausdehnung der Serosazellen.

Abb. 27 (Seite 106): Expression von *Tc'gbb* im Wildtyp: **a**, von ventral: Keimrudiment; posterior geschlossene Expression im Serosarand; ubiquitäre Expression im Embryo, mit Ausnahme des ventralen Streifens. **b**, Embryo aus **a**, Bisbenzimid-Kernfärbung. **c**, von lateral; ganz umlaufende *gbb*-Expression im Serosarand; die Einsenkung der Kopflappen hebt zeitgleich die anteriore Amnionfalte; letztere zeigt eine starke *gbb*-Expression; die posterioren *gbb*-Expressionen der Kopflappendomänen persistieren. **d**, Embryo aus **c**, Bisbenzimid-Kernfärbung; die Serosa-Embryo-Grenze überschreitet den posterioren Pol. **e**, etwas älteres Keimrudiment, das Serosafenster bildet sich, die starke *gbb*-Expression in anterioren und posterioren Amnionanlagen wird besonders deutlich. **f**, Embryo aus **e**, Bisbenzimid-Kernfärbung. **g**, junger Keimstreif (etwa Entstehung von T2) mit ubiquitärer Expression; noch offenes Serosafenster mit *gbb*-exprimierenden anhängenden Serosazellen; die stärksten Expressionen liegen im Amnion über den Kopflappen und der Wachstumszone; expressionsfreie Regionen an Stomodaeum und im terminalen Pol der Wachstumszone sind verdeckt. **h**, junger Keimstreif (etwa Entstehung von T3) mit ubiquitärer Expression; noch offenes Serosafenster mit *gbb*-exprimierenden Zellen im Fensterrand (überwiegend nicht polyploid); eine starke *gbb*-Expression im Stomodaeum ist sichtbar (Pfeilspitze). **i**, junger Keimstreif (Stadium der Entstehung der ersten Abdominalsegmente); Rückzug der ubiquitären Expression; erste *gbb*-Domänen mit etwas stärkerer Expression sind im Gnathum als Transversalstreifen zu erkennen; das Amnion ist über dem Gnathum tlw. abgerissen, der Thorax ist durch Amnion verdeckt; eine starke *gbb*-Expression im Stomodaeum ist sichtbar (Pfeilspitze).



Expression von *gbb* in Wachstumszone, Seitenplattenektoderm und Amnion

Nach dem ersten Auftreten der *gbb*-Expression in den Rändern der Ventralfurche wird das Expressionsmuster vom Fortschreiten der Mesoderminvagination bestimmt. In jungen Keimstreifen ist die Mesodermeinfaltung der anterioren Segmente bis T1 ein zusammenhängender Prozeß, der von posterior nach anterior fortschreitet (Handel et al., 2005). Damit haben die *gbb*-Domänen in den Ventralfurchenrändern des jungen Keimstreifs zunächst einen gewissen Abstand voneinander (Abb. 26i, Abb. 27a), der im Zuge der Mesodermabfaltung in den vorderen Segmenten und in der anterioren Wachstumszone kleiner wird (Abb. 27g, h), bis sich die ektodermalen Ränder der Ventralfurche median berühren. In der caudalen Wachstumszone hingegen wird der Abstand beibehalten, bis Wachstum und Mesodermbildung abgeschlossen sind.

Alle vorgenannten Expressionen sind zunächst in eine schwächere, ubiquitäre Expression eingebettet, die sich erst nach der Bildung der ersten Abdominalsegmente auf die persistierenden Domänen im Keimstreif zurückzieht. Der Prozeß des Rückzugs beginnt mit der Entstehung der ersten Abdominalsegmente (Abb. 27i) und schreitet von anterior nach posterior fort.

In der Wachstumszone persistiert eine schwache flächige Expression mit den darin eingebetteten kurzen, anterior konvergierenden Domänen. Dieses Grundmuster bleibt prinzipiell während des Keimstreifwachstums erhalten. Die Expression wird nach anterior wesentlich schwächer: in der Zone neu entstehender Segmente der intermediären Wachstumszone (Übergangszone) ist die Expression – etwa analog der *twist*-Expression – auf ein niedriges Niveau abgeregelt (Abb. 29, Abb. 30).

Die Expression von *gbb* bleibt flächiger als bei *dpp*, das räumlich begrenzter exprimiert wird. Die *gbb*-Domänen liegen, im Gegensatz zu *dpp*, direkt am Rand des Ektoderms zum Mesoderm. In diesem Bereich haben mesodermale Zellen noch Kontakt zur Epitheloberfläche (Handel et al., 2005), sie lassen sich vom Lateralplattenektoderm morphologisch v.a. durch ihre größeren Kerne unterscheiden. Die Konvergenz der *gbb*-Domänen spiegelt somit den Schluß der Ventralfurche über dem Mesoderm der neu entstehenden Segmente wider. Auch die terminale *twist*-Domäne biegt aus der Endplatte nach anterior in den Boden der Wachstumszone um und verläuft noch ein kurzes Stück zwischen den *gbb*-Domänen nach anterior (Abb. 30a-d, (vgl. auch Handel et al., 2005).

Terminal, also am Übergang von Wachstumszonenboden und Wachstumszonendach (Endplatte) umranden die *gbb*-Streifen die terminale *twist*-Domäne, um im Dach wieder zu

konvergieren. Das Signal ist am Rand der *gbb*-freien *twist* Domäne (Abb. 29c, Abb. 30c) am stärksten.

Der Rückzug der ubiquitären *gbb*-Expression scheint das Amnion vollständig auszunehmen. Alle amniotischen Zellen exprimieren *gbb* (Abb. 27, Abb. 31). Verglichen mit der *dpp*-Expression im Amnion, zeigt sich auch hier wieder der charakteristische Unterschied der beiden Expressionen: *gbb* ist flächiger und gleichmäßiger exprimiert, durch Vergleich etlicher Individuen läßt sich aber ein Streifen stärkerer Expression um die Mediane des Amnions über etwa ein Drittel der Keimstreifbreite ausmachen (Abb. 31). Das mediane Expressionsmaximum ist die anteriore Fortsetzung der Expression im Dach der Wachstumszone und besteht möglicherweise aus paramedianen Streifen, was sich jedoch später kaum noch auflösen läßt.

Die longitudinalen *gbb*-Domänen in den Seitenplatten und im Amnion persistieren damit mit nur geringer Abwandlung in der im frühen Keimrudiment etablierten Form bis zum Ende des Keimstreifwachstums.

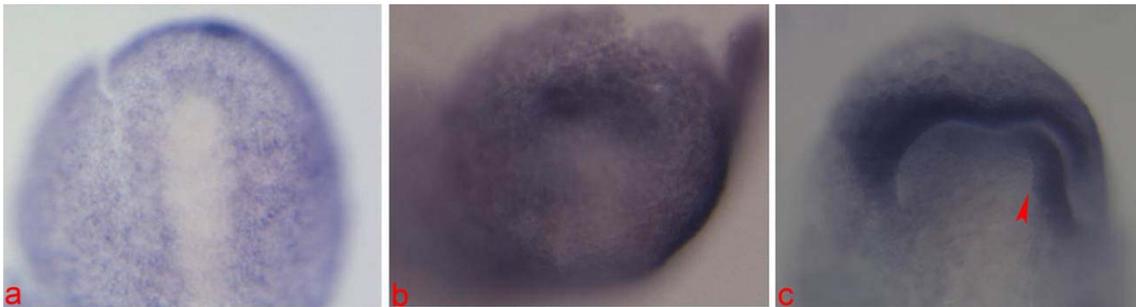


Abb. 28: Posteriore *gbb*-Domäne: **a**, von posterior (dorsal ist oben); frühes posterior pit-Stadium; im posterioren Pol und dem ventralen Streifen (prospektives Mesoderm) läßt sich kein *gbb*-Transkript detektieren; die vormalige posteriore Domäne hebt sich in dieser Phase nicht mehr von der ubiquitären Expression ab. **b**, von posterior (dorsal ist oben); posterior pit leicht konkav und expressionsfrei; in der prospektiven Amnionfalte verstärkt sich die Expression. **c**, Keimrudimentstadium von ventral; starke Expression in der posterioren Amnionfalte, insbesondere ihrem unteren Blatt, sowie im posterioren Seitenplattenektoderm (Pfeilspitze).

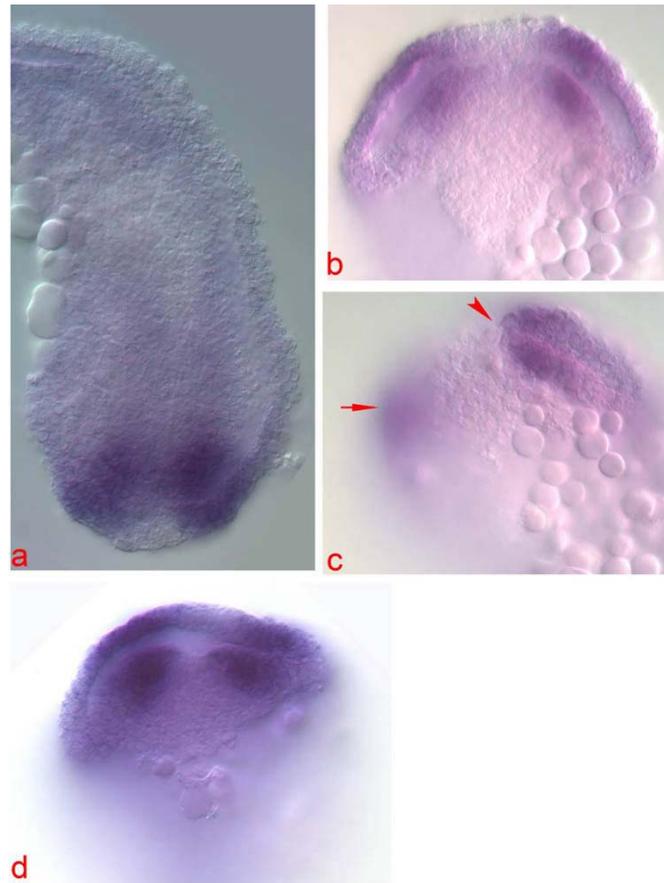


Abb. 29: *gbb*-Expression in der Wachstumszone: **a**, von ventral, im Stadium der Entstehung von A3; die stärkeren *gbb*-Domänen in den Seitenplatten reichen nur ein kurzes Stück nach anterior; nahezu deckungsgleiche Expression im Amnion; terminal befindet sich eine expressionsfreie Zone. **b**, optischer Anschnitt von posterior; „second layer“ und „outer layer“ (Seitenplattenektoderm) mit *gbb*-Expression unmittelbar an der Grenze zur „inner layer“ (im Gegensatz zu *dpp*, vgl. Abb. 13i); die „inner layer“ mit direktem Kontakt zur Amnionhöhle ist ebenfalls optisch angeschnitten; darunter ist die „globular mass“ angeschnitten. **c**, Wachstumszone aus **b**, Aufsicht auf den Übergang (Pfeilspitze) zwischen den Domänen in Wachstumszonendach und -Boden; entsprechende Stelle der gegenüberliegenden Seite außerhalb der Schärfenebene (Pfeil). **d**, optischer Anschnitt einer Wachstumszone weiter anterior als in **b**, dies bestätigt die mediale, randliche Lage der *gbb*-Domänen in den Seitenplatten.

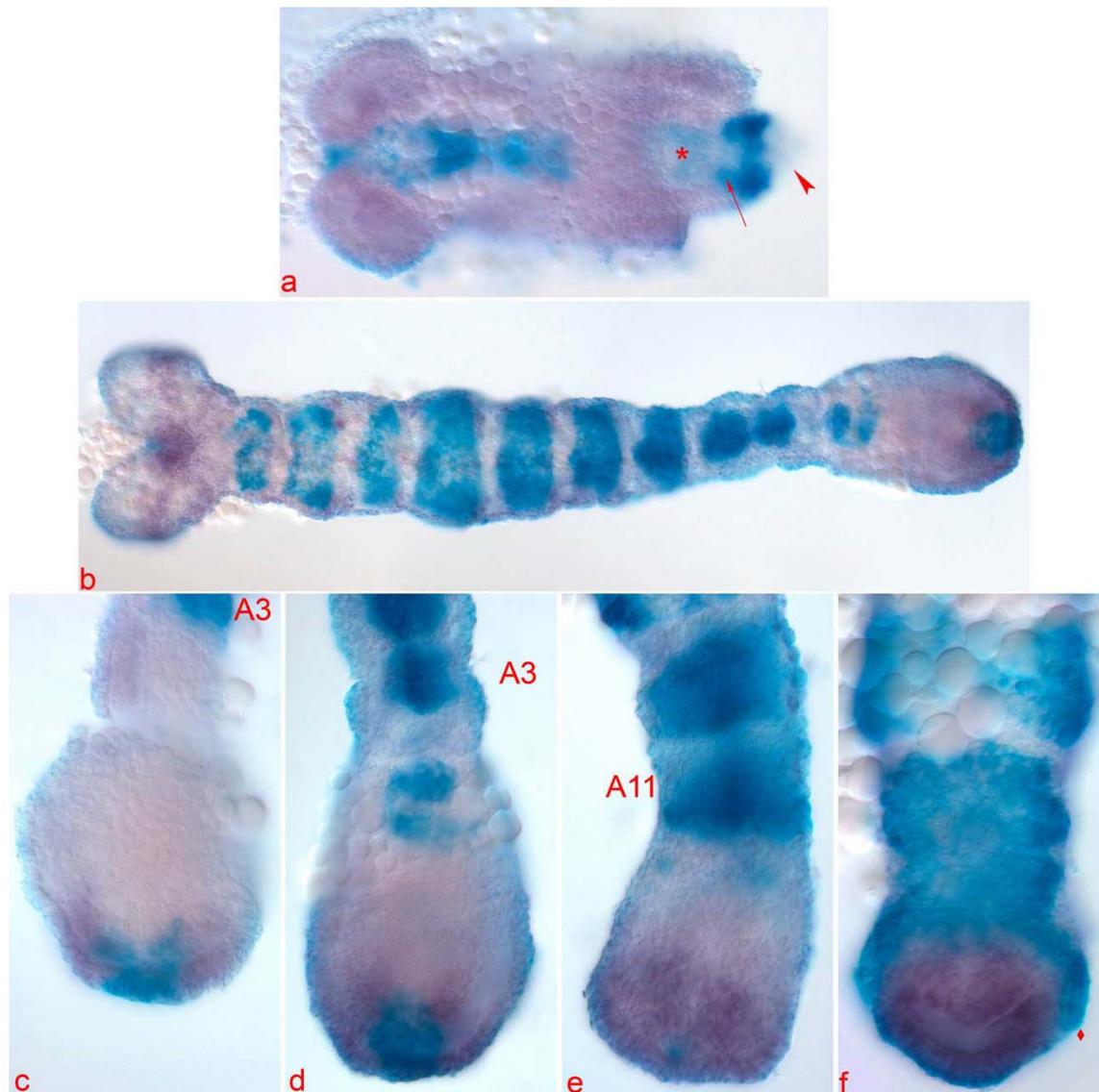


Abb. 30: Lagebeziehung zwischen *gbb*-Domänen (braun) und *twist*-exprimierendem Mesoderm (türkis): **a**, Keimrudiment, Wachstumszone tlw. abgerissen; daher sind posteriore *twi*-Domäne und „globular mass“ (*twist*-frei, Pfeilspitze) freigelegt; die terminale *twi*-Domäne biegt in den Boden der Wachstumszone um (Pfeil); die „inner layer“ exprimiert schwach *twi* (oder es handelt sich um ein Hintergrundsignal, Stern); der *twist*-Streifen löst sich in segmentale Mesodermblöckchen auf; in den dazwischen liegenden Regionen überbrückt die *gbb*-Expression den Streifen; insbesondere in der Übergangszone (anterior der „inner layer“); in der medianen; anterioren Einbuchtung findet sich eine kleine *twist*-Domäne (labral). **b**, Keimstreifen bei Entstehung von A4, stomodeale *gbb*-Domäne wird deutlich; mit transversalen Domänen zu Augen- und Antennenanlagen; kleine anteriore *twi*-Domäne liegt anterior des Stomodaeums (präsumptives Mesoderm der Labralanlagen); mesodermale Blöckchen lösen sich anterior beginnend auf, Mesodermzellen wandern nach lateral; „inner layer“ in der Wachstumszone exprimiert kein *twist*. **c**, Wachstumszone eines Keimstreifs bei Entstehung von A4, nur gerigfügig jünger als **b**, **d**; *twi*-Domäne vorwiegend terminal biegt etwas in den Boden der Wachstumszone um, lateral anschließend *gbb*-Domänen. **d**, Wachstumszone des Keimstreifs aus **b**; *twi*-Domäne terminal und im Boden der Wachstumszone; *gbb*-Expression verstärkt in den Seitenplatten und diffus in der Fläche. **e**, inaktive Wachstumszone eines ausgewachsenen Keimstreifs; *twist*-Blöckchen von A10 und A11; terminale *twi*-Domäne reduziert; *gbb*-Expression über „inner layer“ geschlossen, da sich die Seitenplatten zum Boden des präsumptiven Proctodaeums vereinigt haben. **f**, proctodeale Anlage mit *gbb*-Expression in Boden und Dach, Zellen des elften Mesodermblöckchens umschließen die Anlage (Raute). Die Türkisfärbung des Keimstreifrandes stellt ein Artefakt dar, beschriebene *twist*-Expressionen lassen sich in Einzelfärbungen reproduzieren.

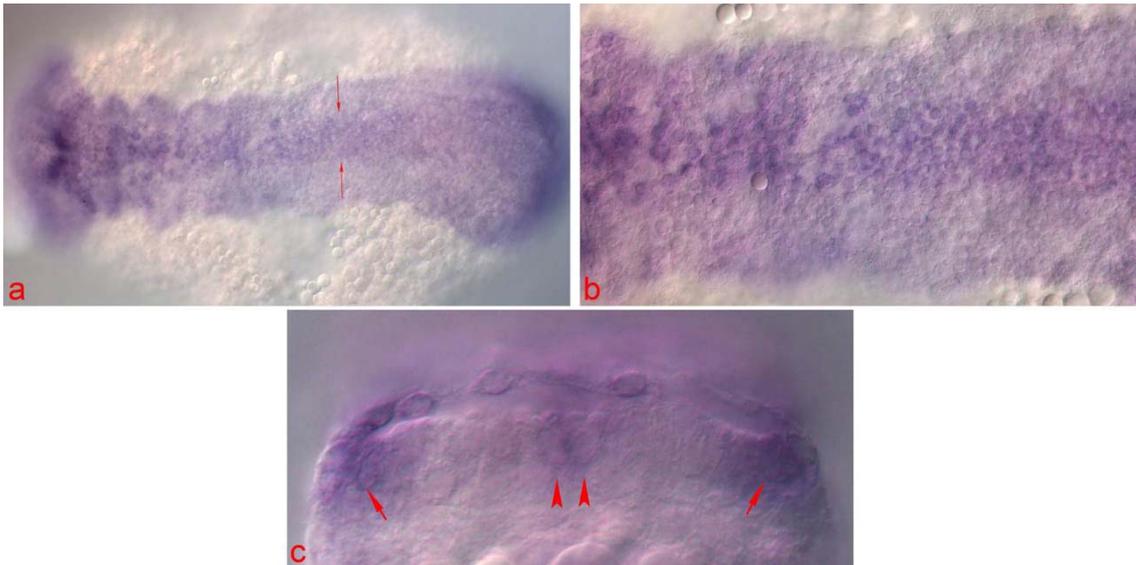


Abb. 31: *gbb*-Expression im Amnionepithel: **a**, Keimstreif etwa bei Entstehung von A1; das Amnionepithel zeigt eine verstärkte *gbb*-Expression im medianen Drittel (Pfeile). **b**, Ausschnittsvergrößerung von **a**; Veränderung der Zellmorphologie im Amnion von neugebildeten kuboidalen Zellen, posterior (rechts) zu älterem Plattenepithel, anterior (links). **c**, optischer Anschnitt durch ein Abdominalsegment eines älteren Keimstreifs, nach Rückzug der ubiquitären Expression; dorsale Domänen (Pfeile) sind von der medianen Domäne durch expressionsfreies Ektoderm getrennt; die mediane Domäne (Pfeilspitzen) umfaßt eine morphologisch distinkte Zellreihe beiderseits der Medianen; darüber finden sich durch die spaltförmige Amnionhöhle vom Keimstreif getrennt *gbb*-exprimierende Amnionzellen.

Zellmorphologie im Amnion

In situ-Hybridisierungen auf *gbb* sind, wegen dessen ubiquitärer Expression im Amnion gut geeignet, Zellmorphologie und Kerngröße der Amnionzellen zu beurteilen. Bei Verwendung von DIC ergeben sich insbesondere bei kollabierter Amnionhöhle Vorteile gegenüber der Mikroskopie von Bisbenzimidfärbungen. Fokussiert man auf subzelluläre Strukturen, ist das Amnionepithel gut gegen den Keimstreif abzugrenzen (Abb. 31a, b), was bei Bisbenzimidfärbungen schwieriger ist. Auch der signalfreie Kern hebt sich gut gegen das Zytoplasma ab. Sowohl anterior des Serosafensters über den Kopflappen, wie auch unmittelbar hinter dem Serosafenster wird in jungen Keimstreifen das Amnion aus Plattenepithel gebildet. Handel, Grunfelder et al. (2000) dokumentieren diese Merkmale für einen Keimstreifen mit gerade noch offenem Serosafenster etwa zur Zeit der Abgliederung von T2. Ein Größenunterschied zwischen Amnionzellen im Dach der Wachstumszone und über dem Gnathum läßt sich schon früher feststellen (Abb. 31). Beim Vergleich unterschiedlich alter Keimrudimente und Keimstreifen zeigt sich von der Wachstumszone ausgehend ein Kontinuum von kuboidalem Amnionepithel zu Plattenepithel, wobei Areale, die unmittelbar aus dem amniotischen Blatt der Amnionfalten (über Gnathum und T1) hervorgehen, also wahrscheinlich nicht durch Proliferation entstehen, doch die am stärksten

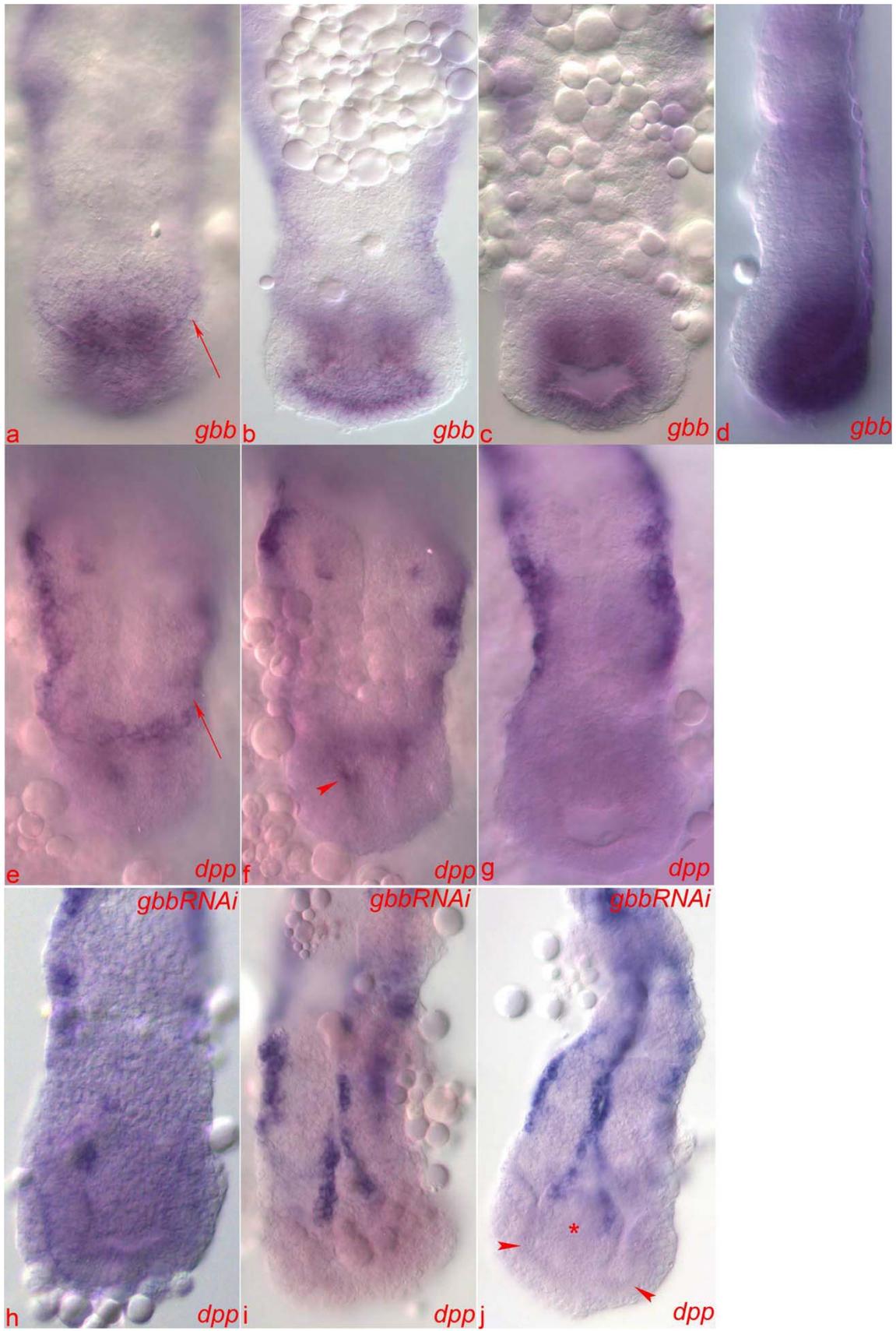
abgeflachten Zellen beinhalten (Abb. 31). Auf diese Weise kommt es zu einer anteroposterioren Aufteilung des Amnionepithels. Zusätzlich kommt es im Übergangsbereich anterior der Wachstumszone auch zu einer transversalen Unterteilung des Amnionepithels, wobei laterale Bereiche mit kuboidalen Zellen mit kleinem Kern und schmalem Cytoplasmasaum unmittelbar an das Keimstreifektoderm grenzen und daher von diesem nicht klar abzugrenzen sind. Bemerkenswert erscheint, daß man gerade in diesem Bereich flacher Zellen das maximale *gbb* Signal nachweisen kann. Der größere Kerndurchmesser geht wohl auf eine Abflachung zurück, eine Polyploidisierung ist mittels Kernfärbung nicht nachzuweisen. Die Konstellation der „zellmorphologischen Kompartimente“ im Amnion bleibt während des Keimstreifwachstums und Keimstreifstreckung erhalten. Erst im retrahierten Keimstreif ist eine scharfe Grenze zwischen Plattenepithel und dem weiter posterior anschließenden kuboidalen Epithel, das zu Anlagen von Endarm und Telson beiträgt, nachzuweisen (Abb. 32).

Die *gbb*-Expression im Telson

Nach Abschluß des Wachstums verbreitern sich im Telson die lateralen *gbb*-Domänen im Boden des posterioren Teils der ehemaligen Wachstumszone. Im Gegensatz zur *dpp*-Expression haben sie bis zu diesem Zeitpunkt persistiert (Abb. 30). Noch bevor die Anlage des Proctodaeums morphologisch zu erkennen ist, ergibt sich hieraus eine prominente, terminale Expression, die das gesamte Proctodaeum umfaßt (Abb. 32). Der Boden des posterioren Teils der ehemaligen Wachstumszone wird zum Boden (später ventral) des Proctodaeums. Die Verbreiterung der *gbb*-Domänen geht wohl weniger auf Aktivierung der *gbb*-Expression in den paramedianen Bereichen zurück, als auf ein Zusammenrücken der Ektodermränder (outer layer) durch Migration oder Wachstum. Im Gegensatz zur *dpp*-Expression liegt die *gbb*-Domäne der „inner layer“ unmittelbar benachbart. Es resultiert der Ausschluß der „inner layer“ von der Oberfläche zur Amnionhöhle. Das hier bisher als Endplatte bezeichnete Epithel der Wachstumszone begrenzt das Proctodaeum posterior, also nach Rückenschluß dorsal. So begründet sich auch die starke Expression in diesem Teil, die auf die bogenförmige *gbb*-Expression um die terminale *twist*-Domäne, zurückgeht. Die terminale *twist*-Domäne wird im Zuge der Ausdehnung *gbb*-exprimierenden Epithels zu einer zentralen, punktförmigen Expression reduziert (Abb. 30). Das elfte abdominale Mesodermblöckchen hängt noch lange mit dem des 10. Abdominalsegments zusammen und bildet so eine größere *twist*-Domäne. Bei Sichtbarwerden der Trennung der beiden Blöckchen

beginnen Zellen des 11. Mesodermlöckchens um die Anlage des Proctodaeums zu wandern, um diese ventral zu umfassen (Abb. 30f).

Abb. 32 (Seite 114): BMP-Expression in den Anlagen von Telson und Proctodaeum im Wildtyp und in *gbb*-knock down-Embryonen, außer d alle von ventral, d von lateral: **a**, Wildtyp, die auch posterior umlaufende *gbb*-Expression an der Abrißlinie zwischen Amnion und Keimstreif markiert die Grenze zwischen beiden Epithelien (Pfeil). **b**, **c**, optische Anschnitte des Präparates aus **a**, die in unterschiedlicher Ebene *gbb*-Expression in der gesamten proctodealen Anlage zeigen. **d**, terminale Segmente eines voll ausgewachsenen Wildtyp-Keimstreifs von lateral, prominente *gbb*-Expression finde sich in der proctodealen Anlage. **e**, Wildtyp, Expression von *dpp* entlang der Abrißlinie zwischen Amnion und Keimstreif (Pfeil, vgl. auch d). **f**, Wildtyp, nur eine sehr kleine dorsale *dpp*-Expressionen liegt am Eingang der proctodealen Anlage (Pfeilspitze). **g**, Wildtyp, es sind keine weiteren *dpp*-Expression in der proctodealen Anlage des Wildtyps zu finden. **h**, terminale Segmente eines *gbb*-knock down-Embryo mit kleiner ektopischer *dpp*-Domäne im Bereich des anterioren Randes der wildtypischen *gbb*-Expression. **i** & **j** terminale Segmente von *gbb*-knock down-Embryonen mit ausgedehnten ektopischen *dpp*-Expressionen in den medialen Rändern der Seitenplatten (Mesektoderm/ventrales Neuroektoderm); die „inner layer“ und evtl. Teile der „globular mass“ sind ins Lumen der inaktiven Wachstumszone gedrängt (Stern), die Seitenplattenränder sind nach oben/ventral gebogen, die hier beginnende ektopische *dpp*-Expression zieht sich entlang der Ventralfurche nach anterior, das dorsale Proctodaeum bleibt unberührt und zeigt die wildtypischen Längsfalten (Pfeilspitzen in **j**).



Die „dorsale *gbb*-Domäne“ und die „mediane *gbb*-Domäne“

Dorsale Domäne, mediane Domäne und das metamere Grundmuster bilden sich durch lokales Abschalten der bis dahin ubiquitären *gbb*-Expression (Abb. 27i). Die Konturen der persistierenden Expressionen sind etwa während der Abgliederung des ersten Abdominalsegmentes zu erkennen. Während der Differenzierung thorakaler Segmente exprimieren noch alle ektodermalen Zellen *gbb* (Abb. 27h). Zuerst treten zusammenhängende *gbb*-freie Flächen im Zentrum der Hemisegmente auf, sowie in den schmaleren Streifen an der segmentalen Falte. Mit der Ausdehnung dieser *gbb*-freien Epithelflächen präzisiert sich das metamere Grundmuster und die stabilen longitudinalen Domänen (Abb. 14d & Abb. 33d). An den Rändern des Keimstreifs entsteht dann (überlappend mit *dpp*) aus amniotischen und embryonalen Zellen die *gbb*-Domäne, die dorsale Zellschicksale umfaßt. Auf Grund der Genese der dorsalen *gbb*-Domäne lassen sich – im Gegensatz zur *dpp*-Expression – keine Individuen mit *gbb*-freiem Keimstreifrand finden. Die dorsale *gbb*-Domäne (Abb. 31c) ist ähnlich der Expression von *dpp*, d.h. auch sie ist metamer zusammengesetzt, bleibt aber auch hier wieder ausgedehnter als letztere. Im Gegensatz zu *dpp*, wird *gbb* in jungen Keimstreifen (Entstehung von A2) noch in durchgehenden Querstreifen exprimiert (Abb. 33d): zwei pro Segment, einer begrenzt den erhabenen Teil des Segmentes anterior und ist etwas breiter, der andere, schmalere liegt posterior. Die Verwendung von *twi* als Marker zeigt, daß die breitere segmentale Domäne am Vorderrand der *twist*-Domäne und damit des Segmentes liegt. Die posteriore transversale Domäne liegt an deren Hinterrand und damit unmittelbar vor der *en*-Domäne (Handel et al., 2005), also am Hinterrand des Parasegmentes. Dieses Grundmuster ist prinzipiell in jedem Segment einschließlich des Antennalsegments verwirklicht und in den Extremitäten tragenden Segmenten lediglich durch die Morphologie abgewandelt. Mit weiterem Wachstum des Keimstreifs wird die Expression weiter zurückgedrängt, sodaß schon bei der Abgliederung von A3, die medianen Domänen in die Ventralfurche zurückgedrängt werden und daher auf der segmentale Fläche unterbrochen scheinen.

Die *gbb*-Expressionen werden zunehmend von der Keimstreifoberfläche in die Ventralfurche und segmentalen Falten verdrängt.

Am deutlichsten zeigt sich dies im stärker skulpturierten Thorax. Hier exprimiert die mediale Säule des Neuroektoderms *gbb* (also die dorsoventral orientierten Epithelteile, Abb. 33a) und ebenso den neuroektodermalen Marker *otd-1* (vgl. Abb. 33a mit c). Unter Einschluß der dorsalen Domäne ist jedes Hemisegment vollständig mit *gbb*-exprimierendem Epithel umsäumt. Dies trifft auch für die abdominalen Segmente zu. Auch am Boden der Ventralfurche wird *gbb* exprimiert (Abb. 31c, Abb. 33b, d & e). Die medianen *gbb*-

exprimierenden Zellen unterscheiden sich durch ihre Morphologie vom umgebenden Ektoderm (Abb. 31c). Die intersegmentalen Abschnitte dieser medianen Domänen verbinden als erhabene Zellstränge die mesoderm-unterlegten Ektodermteile (Abb. 33e).

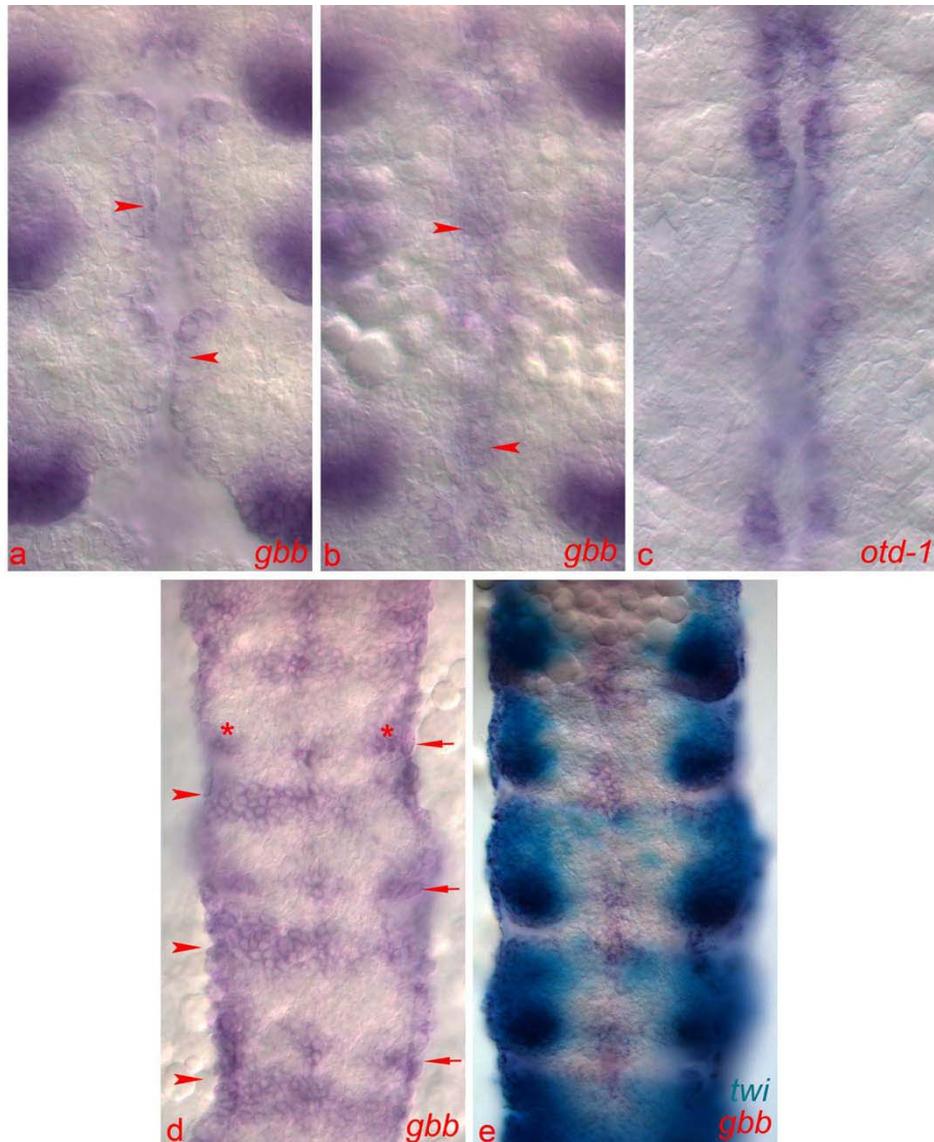


Abb. 33: Expression von *gbb* nach Rückzug der ubiquitären Expression im Wildtyp, zum Vergleich *otd-1* (blau in c) und *twi* (türkis in e), d & e jünger als a-c: **a**, Aufsicht auf das ventrale Ektoderm des Thorax, neuroektodermale *gbb*-Expression in den senkrechten (DV-orientierten) Epithelanteilen der Ventralfurche (nur medialen Säule des Neuroektoderm, Pfeilspitzen). **b**, ventrales Ektoderm des Thorax Schärfenebene tiefer im Präparat als a, mesektodermale *gbb*-Expression im Boden der Ventralfurche (midline cells, Pfeilspitzen). **c**, Aufsicht auf das ventrale Ektoderm des Thorax, *otd-1*-Expression in den senkrechten Epithelanteilen der Ventralfurche als neuroektodermaler Marker (nur mediale Säule). **d** ventrale Aufsicht auf Labialsegment und Thorax, transversale *gbb*-Expression am anterioren Segmentrand (Pfeilspitzen an T2-A1) ist in diesem Stadium breiter als die transversale Domäne am Hinterrand des Parasegmentes (Pfeile an T1-T3), Teile letzterer markieren die Extremitätenanlagen (Stern), die mediane Domäne ist durchgehend, verschwindet jedoch im Segment in der Tiefe, *gbb* ist im Bereich der segmentalen Falten in soliden mediane Zellsträngen exprimiert. **e**, ventrale Aufsicht auf Labialsegment und Thorax, Expression von *twist* als segmentaler Marker (türkis).

Expression von *gbb* in den thorakalen Gliedmaßenanlagen

Da die *gbb*-Domäne der Extremität zunächst Teil der Übergangsstelle der dorsalen Domäne in die posteriore metamere *gbb*-Expression ist, fällt sie erst später durch eine verstärkte Expression auf (Abb. 30d). Sie wird jedoch noch vor der morphologischen Veränderung der Anlage sichtbar, und verhält sich im übrigen ähnlich wie die *dpp*-Domäne, d.h. die dorsale Expression verschiebt sich im Laufe der Entwicklung zur Medianlinie hin. Sie behält jedoch zunächst Anschluß zur „dorsalen Domäne“. In der noch wenig erhabenen Gliedmaßenknospe nimmt die kappenförmige *gbb*-Domäne die gesamte Breite ein, ohne eine dorsoventrale Asymmetrie erkennen zu lassen. Die *dpp*-Domäne liegt hierin eingebettet (Abb. 14b & e). Durch die symmetrische *gbb*-Expression muß es schon früh zu einer erheblichen Überlappung mit der *wg*-Domäne auf der Ventralseite kommen. Erst in der gewachsenen Anlage kann man erkennen, daß das Maximum der Expression zu Dorsalseite verschoben ist (Abb. 15), die Koexpression mit *wg* bleibt jedoch. Während der Ringbildung der *dpp*-Expression wird *gbb* weiterhin als Kappe exprimiert, wobei der Gradient auch in der gestreckten Anlage weit nach proximal reicht. Auch *gbb* zeigt „proximale Domänen“ an der Basis der Thoraxgliedmaßen (Abb. 15b). Eine den isolierten, punktförmigen *dpp*-Domänen in den Abdominalsegmenten retrahierter Keimstreifen analoge *gbb*-Expression kann nur in A1 und A2 nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Es ist jedoch anzunehmen, daß dies methodisch bedingt ist.

Die Anlage des Stomodaeums

Die erste Anlage des Stomodaeums in *Tribolium* findet sich bald nach der Einsenkung der Kopflappen. Sie besteht aus den medialen, nach posterior gebogenen Anteilen der vorderen Begrenzung der Kopflappen, unmittelbar an der Grenze zum Mesoderm. Ihr auffälligstes Merkmal ist die prominente *gbb*-Expression (vgl. Pfeilspitze in spätem Stadium in Abb. 27i mit frühen Stadien in Abb. 27e & Pfeilspitze in h), die beim Schluß des Serosafensters die anterior gelegenen Teile des Kopflappenrandes an Expressionsstärke übertrifft (Abb. 27h). Diese starken Expressionen biegen posterior lateral um, also vom Seitenplattenrand weg und enden in der Fläche der Kopflappen (Daten nicht gezeigt). Sie bilden hier den Ursprung der unten beschriebenen transversalen Expressionen (Abb. 14d, Abb. 30b). Die posterioren Ränder der stomodealen Anlage werden mit den Seitenplattenrändern im Zuge der Internalisierung des Mesoderms einander median genähert und die Anlage erhält ihre grundsätzliche Form (Abb. 14d, Abb. 15b, Abb. 27h). Der Boden

der stomodealen Invagination fällt durch eine Besonderheit auf: Nachdem der stomodeale Hinterrand geschlossen ist, wird deutlich, daß das eingeschlossene Gewebe kein *gbb* exprimiert (Daten nicht gezeigt), ähnlich wie die Zellen der terminalen *twist*-Domäne in der Endplatte der Wachstumszone. Über eine lange Entwicklungszeit – bis zur Abgliederung von A2 – unterscheidet dies die Zellen von allen anderen Teilen des Embryos. In diesem anterioren Bereich findet sich früh, wenn der ventrale *twist*-Streifen nicht mehr einheitlich ist, das Maximum der anterioren *twi*-Expression, ganz in Analogie zur posterioren *twist*-Domäne in der Wachstumszone dieses Stadiums. Etwas später im Keimrudiment, wenn die gnathale *twist*-Expression entlang der *engrailed*-Domänen in segmentale Blöckchen unterteilt wird (Abb. 30), findet sich unmittelbar vor der stomodealen Anlage eine isolierte, starke *twist*-Domäne (diese diente als anteriorer Marker für die Expansion ventraler Schicksale im „Kappen-Phänotyp“ der *dpp*-RNAi). Diese äußerst anteriore Domäne hat einen deutlich größeren Abstand zur mandibularen *twist*-Expression, als die gnathalen Domänen untereinander. Die *twist*-Expression am Stomodaeum persistiert zunächst an dieser Position, um schließlich im Mesoderm der Labralanlagen aufzugehen, die später ebenfalls *gbb* exprimieren (s.u.).

Expression von *gbb* in praegnathalen und gnathalen Segmenten

Die frühesten Expressionen im Kopf sind die oben beschriebenen mit dem Stomodaeum assoziierten Domänen, dazu gehören auch die medialen Anteile eines transversalen Bandes (Abb. 14). Während das Serosafenster noch offen ist, zieht sich die ubiquitäre Kopflappenexpression soweit zurück, daß sich das transversale Band von Stomodaeum bis zum Kopflappenrand als erste segmentale *gbb*-Expression abzeichnet. Die amniotische Expression der Kopflappen bleibt sehr stark (Abb. 27g & h). Das o.g. Transversalband mit Anschluß zu den Augenanlagen, teilt den Kopfbereich in einen anterioren und einen posterioren Bereich (Abb. 14d). Im ersteren ist nur eine diffuse Expression mit etwas stärkerem Signal an den Rändern erkennbar, d.h. eine labrale Expression fehlt zunächst. Posterior des transversalen Bandes gehen vom Hinterrand des Stomodaeums weitere Streifen schräg nach lateral und folgen damit der Kontur der anterioren Domäne des Mandibularsegmentes. Die Expressionen des posterioren Teils lassen sich, wenn auch durch die Morphologie des embryonalen Kopfes kompliziert, auf eine Einheit des metameren Grundmusters zurückführen und markieren das Antennensegment (Abb. 14d, Pfeilspitze). Auch bilden sich in Analogie zur Initiation der anderen Extremitäten die Anlagen der Antennen exakt an der Berührungsstelle der randlichen „dorsalen Domäne“ und der

posterioren Streifen, die vom Stomodaeum ausgehen (Abb. 14d, Pfeil). Im Laufe der Embryonalentwicklung werden auch im Kopf die transversalen Domänen zunehmend abgeregelter und lückenhafter. Neue Expressionen entstehen beiderseits des medianen Spaltes vor dem Stomodaeum: die labralen Anlagen. Die Antennenanlage ist zu diesem Zeitpunkt bereits morphologisch erkennbar (Abb. 14e); die *gbb*-Expression ist hier viel stärker als in der angrenzenden transversalen Domäne. Die lateralen Reste des anterioren transversalen Bandes verstärken ihre Expression im Bereich der Augenanlagen und verlagern sich später bis zum posterioren Rand der Kopflappen. Die Labrumanlagen werden erhaben und zeigen auf Ihrer Medianseite eine deutlich stärkere Expression (Abb. 14e, Abb. 15b). Die Antennenanlagen zeigen später auch einen dorsoventral asymmetrischen Gradienten. Die Expression von *gbb* in den gnathalen Segmenten folgt dem metameren Grundmuster, wie es schon beschrieben wurde. Die Expression in den Anlagen der gnathalen Extremitäten gleicht derjenigen der thorakalen Extremitätenanlagen.

3.2.2 Knock down der *gbb*-Funktion durch embryonale RNAi

Wegen der auf den ersten Blick ähnlichen bzw. überlappenden Expressionsmuster von *dpp* und *gbb* wäre es durchaus nicht überraschend gewesen, wenn die beiden knock down-Phänotypen einander ähnlich gewesen wären. Stattdessen zeigte sich für *gbb*-knock down ein grundsätzlich anderer Phänotyp.

Da auch *gbb* eine Funktion in der Oogenese hat, mußte auch für dieses Gen zur Erzeugung von RNAi-Embryonen die aufwendigere embryonale Injektion angewandt werden. Erst gegen Ende der Arbeit konnten auch mittels Injektion in ältere, weibliche Käfer mit fortgeschrittener Oogenese (adulte RNAi) starke *gbb*-RNAi-Phänotypen erzeugt werden, bei nur mäßig herabgesetzter Fertilität.

Larvale Phänotypen

Nachdem die mit moderaten Konzentrationen (200ng/µl) von *gbb*-dsRNA durchgeführten RNAi-Experimente einen unerwartet komplexen Phänotyp erzeugten, wurde eine zweite Versuchsreihe mit höheren dsRNA-Konzentrationen durchgeführt. Es liegen damit Kutikulaphänotypen für embryonal injizierte dsRNA-Lösungen von 200ng/µl und 2000ng/µl vor (Abb. 34, Abb. 35). Der experimentelle Zugang wird durch zwei sich

überlagernde Probleme der *gbb*-RNAi erheblich erschwert: die geringe Penetranz kann durch Erhöhen der dsRNA-Konzentration nur in geringem Maße beeinflusst werden, zumal sich dadurch der ohnehin hohe Anteil von Individuen, die überhaupt keine Kutikula mehr ausbilden und damit nicht auswertbar sind, weiter erhöht. Überhaupt stellt sich eine geringere Sklerotisierung der Kutikula nicht nur als experimentelles Problem, sondern auch als ein Hauptmerkmal der *gbb*-Phänotypen dar. So wird die Morphologie der thorakalen Extremitäten und die Deformation abdominaler Segmente durch dieses Phänomen wesentlich bestimmt. Der durch den knock down der *gbb*-Expression erzeugte komplexe Phänotyp läßt sich in Teilaspekte aufgliedern, die sich zunächst zwei Gruppen zuordnen lassen. Zum einen gibt es eher globale, mehrere Segmente umfassende Defekte, die vornehmlich die dorsoventrale Musterbildung im Bereich des Abdomens betreffen, und zum zweiten relativ eng umgrenzte Effekte, die sich in der Verdopplung lokaler Strukturen zeigen. Wenn auch beide Versuchsreihen eindeutig zu ähnlichen Phänotypen führen, so verschiebt sich doch die Häufigkeit einzelner Defekte (Tab. 7, Tab. 9, Abb. 37).

Tab. 7: Prozentuale Häufigkeit von Phänotyp-Klassen nach embryonaler *gbb*-RNAi mit unterschiedlichen dsRNA-Konzentrationen. „Schwacher Praetarsus-Phänotyp“ bezeichnet eine nach dorsal abgewinkelte Klaue. Der „komplexe Phänotyp“ wird durch die in Tab. 8 gelisteten und im Text beschriebenen Einzeldefekte charakterisiert. Da Tiere mit komplexem Phänotyp zum Teil auch den Praetarsus-Phänotyp zeigen, sind die prozentualen Häufigkeiten dieser Klassen nicht kumulativ. „Setenband“ bezeichnet zusammenhängende Kutikularesten mehrerer Segmente mit borstenförmigen Sensillen (ohne weiteren Bezug auf deren Genese). „Schwach sklerotisierte“ Individuen können lediglich als kutikuläre Struktur identifiziert werden. Absolute Zahlen in Klammern.

| Injektionslösung Anzahl injizierter Eier | wt | schwacher Praetarsus-Phänotyp | komplexer Phänotyp | Setae-Band | schwach sklerotisiert oder leere Eihülle |
|---|-----------|--------------------------------------|---------------------------|-------------------|---|
| 200ng/µl n=129 | 22(28) | 37(48) | 26(34) | 8(10) | 7(9) |
| 2000ng/µl n=319 | 13(42) | 20(64) | 46(146) | 9(29) | 12(38) |
| H₂O n=96 | 96(92) | - | - | - | - |

Globale Veränderungen

Dorsalisierung der caudalen Abdominalsegmente

Der Habitus der auffälligsten Phänotypen wird durch einen verringerten Durchmesser der caudalen Abdominalsegmente bestimmt (Abb. 34b, d, e, f). Es handelt sich hierbei um eine vollständige oder partielle Dorsalisierung der normalen Ventralseite der betreffenden Segmente. Diese Dorsalisierung wird meistens durch Auftreten ektopischer Setae mit zugehörigem Dorn angezeigt. Bei diesen Dorsalmarkern handelt es sich um relativ lange borstenförmige Sensillen, die zusammen mit einem kurzen, stark sklerotisierten Dorn (engl. „bract“) nahe ihrer gelenkigen Verankerung assoziiert sind. In *gbb*-RNAi-Larven treten diese ektopischen Dorsalmarker oft bilateral auf, häufig jedoch nur einseitig. Das Segment ist dann unilateral dorsalisiert. Auffällig ist, daß auch bei den am symmetrischsten und vollkommensten transformierten Segmenten und Individuen nicht exakt die bilaterale Situation des Wildtyps auftritt, sondern die ektopischen Dorsalmarker stets einen deutlich größeren Abstand zur Mittellinie einhalten als die normalen und auch innerhalb des Segmentes anteroposterior unregelmäßig positioniert sind. Bevorzugt stehen sie nahe der hinteren Segmentgrenze. Auch die relative Anordnung von Seta und Dorn erscheint bei den ektopischen Dorsalmarkern regellos, während in der Wildtypsituation der Dorn stets lateral an der Borstenbasis sitzt. Die häufige Dorsalisierung des 9. abdominalen Segmentes zeigt sich im Auftreten von ein bis zwei ektopischen Urogomphi (Abb. 34b, d, Abb. 35b). In einigen Fällen ist hier eine perfekt symmetrische bilaterale Dorsalisierung zu sehen, wobei zusätzlich zu den beiden dorsalen Urogomphi des Wildtyps noch „ventralseitig“ ektopische Urogomphi hinzukommen. In dieser Konstellation stehen die im Wildtyp nach ventral gerichteten Pygopodien flossenartig nach posterior und lateral. Beide ektopische Urogomphi haben, wie die anderen Dorsalmarker auch, einen deutlich größeren Abstand zur Medianlinie (Abb. 35e). Die beschriebene Dorsalisierung beginnt häufig entlang der AP-Achse in einem Segment und umfaßt alle nachfolgenden Segmente, wobei dieser Defekt anterior von A4 kaum auftritt (Abb. 31). In vielen Fällen kommt es auch zur – dann zumeist partiellen – Dorsalisierung eines Segmentes und sowohl anterior gelegene wie auch nachfolgende zeigen eine normale dorsoventrale Ausprägung. Als Extremfall dieser schwachen „Dorsalisierung“ kommt eine intersegmentale Zäsur vor, wobei das ansonsten unveränderte posteriore Abdomen abgeschnürt erscheint (Abb. 34c). Zusätzlich sind die betroffenen Segmente meist deformiert, es kommt zu kegelförmigen Aussackungen der lateralen Kutikula (Abb. 34b). An deren Ende findet sich oft eine deformierte Tracheenöffnung oder aber ein ausgestülptes Atrium (häutiger, sackförmiger Vorhof der Trachee, der durch einen sklerotisierten Ring zur Epidermis

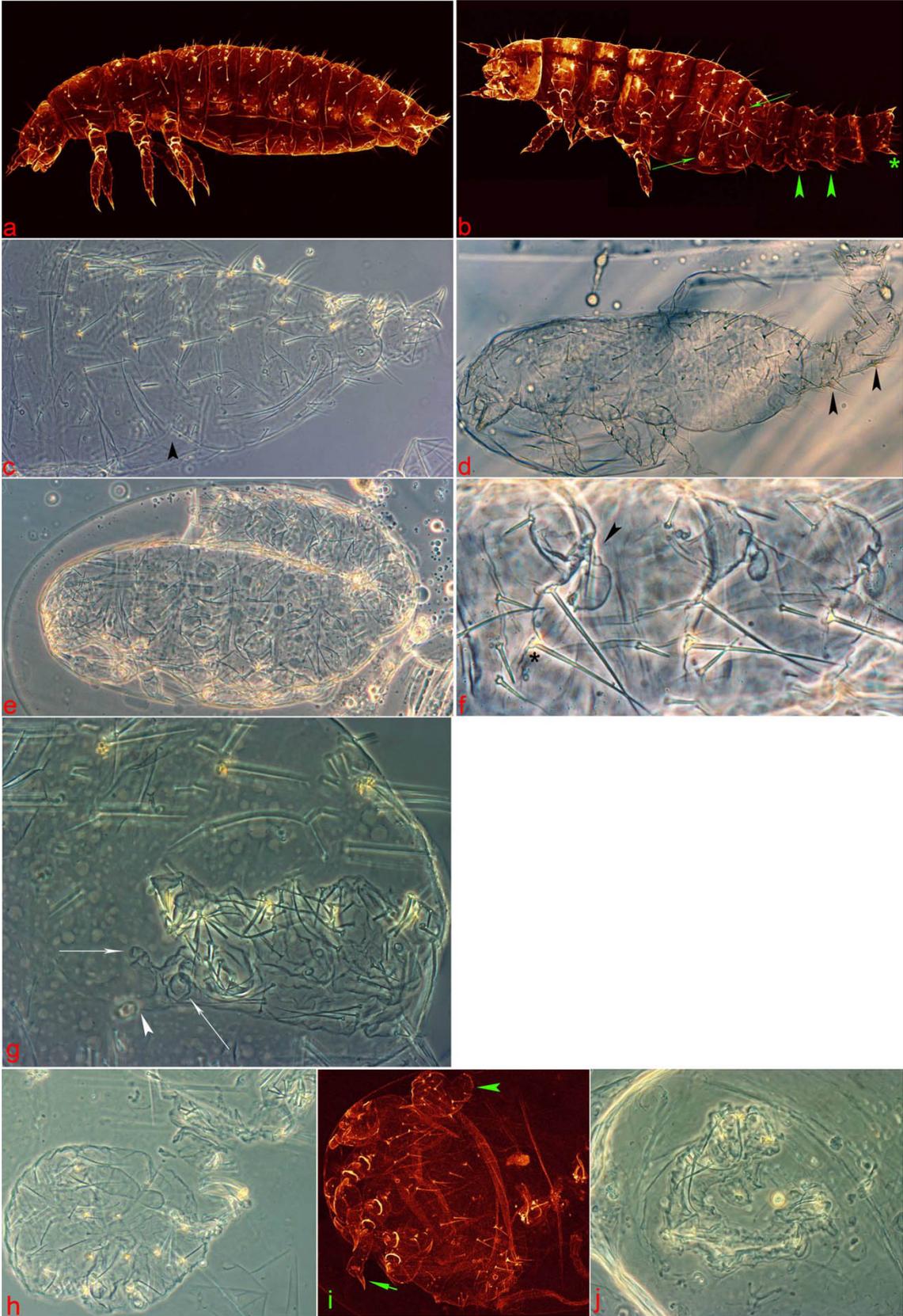
abgegrenzt wird), als eiförmiges Gebilde mit dünner Kutikula, das abgewinkelt, mit einem dünnen Stielchen der lateralen Aussackung aufsitzt. In manchen Fällen ist zusätzlich an dieser Stelle noch ein Stigma zu erkennen. Eines dieser Stigmata ist also ektopisch (Pfeilspitze & Stern in Abb. 34f).

Invagination der caudalen Abdominalsegmente

Neben dem Dorsalisierungsphänotyp tritt eine Invagination der posterioren Abdominalsegmente auf (Abb. 34g, Abb. 35). Hierbei sind die caudalen Segmente stülpfingerartig in das Abdomen invaginiert. Je nach Stärke der Ausprägung werden zunehmend anteriore Segmente mit einbezogen, wobei der Defekt anterior bis A3 begrenzt ist und davor gelegene Segmente in den auswertbaren Individuen nur sporadisch betroffen sind (Abb. 35). Die internalisierten Kutikulastrukturen einschließlich der Urogomphi sind in das enge Lumen des invaginierten, schlauchförmigen Abdomenteils gerichtet und entsprechend dicht gedrängt. Dennoch ist eine Zuordnung von Dorsalmarken und Stigmata zu den invaginierten Segmenten oft möglich. Hierbei fällt auf, daß drei Dorsalmarker pro Segment außerordentlich selten vorkommen (vier Dorsalmarker überhaupt nicht) und die Stigmata in Form und Durchmesser Wildtyp-Ausprägung zeigen (Abb. 34g). Die invaginierten Segmente sind also meist nicht dorsalisiert. Invagination ist zumeist auch der einzige Defekt, der in den vielen Individuen noch erkennbar ist, deren genauere Auswertung durch ihre schwache Ausbildung der Kutikula jedoch verhindert wird. In diesen Fällen ist zwar die relative Orientierung der Borsten zueinander eindeutig, die Ausdehnung des Defektes aber unklar und die Identifizierung der betroffenen Segmente so kaum mehr möglich (Abb. 34h-j).

Abb. 34 (Seite 123): *gbb*-knock down-Phänotypen I (L1-Larven, konfokale und DIC-Aufnahmen): **a**, Wildtyp-Larve zum Vergleich. **b**, *gbb*-knock down-Larve von dorsolateral; Abdominalsegmente nach A4 mit reduziertem Durchmesser, lateralen Erweiterungen der Körperwand in A6 & A7 (Pfeilspitzen), dilatierten Stigmen in A3 & A4 (Pfeile) und ektopischen Urogomphi (Stern). **c**, *gbb*-knock down-Larve von lateral; mit Konstriktion in A4 (Pfeilspitze), lateraler Erweiterung der Körperwand in A8 und unregelmäßiger Ausprägung der Urogomphi. **d**, *gbb*-knock down-Larve mit dorsalisiertem Abdomen von lateral, mit verjüngten Abdominalsegmenten nach A3, lateralen Erweiterungen der Körperwand in A7 & A8; verjüngte Segmente mit Dorsalmarkern (Pfeilspitzen) auf der eigentlichen Ventralseite einschließlich ektopischen Urogomphi **e**, Larve ähnlichen Phänotyps wie **d** in charakteristischer Lage in der Eihülle. **f**, Ausschnittsvergrößerung aus **e**; laterale Aussackungen

der Körperwand mit evaginierten Atrien (Pfeilspitze) und ektopischen Dorsalmarkern (Stern). **g**, invaginierte Abdominalsegmente (alle Segmente posterior A5); Enddarm (Pfeilspitze), Pygopodien (Pfeile) und alle anderen Kutikulastrukturen erscheinen weitgehend wildtypisch normal. **h**, schwach kutikularisierter Phänotyp; nur anteriore Segmente haben den Rückenschluß vollzogen, posteriore Segmente sind als inverses Band von Kutikulamarkern ausgebildet. **i**, konfokale Aufnahme eines Phänotyps ähnlich h, hier jedoch mit gut kutikularisierten Gliedmaßen; Labrum nach dorsal geklappt (Pfeilspitze); Praetarsus-Phänotyp mit nach dorsal geklappter Endklaue (Pfeil). **j**, Setae-Band als einzige Kutikulastruktur in einer geschlossenen Eihülle.



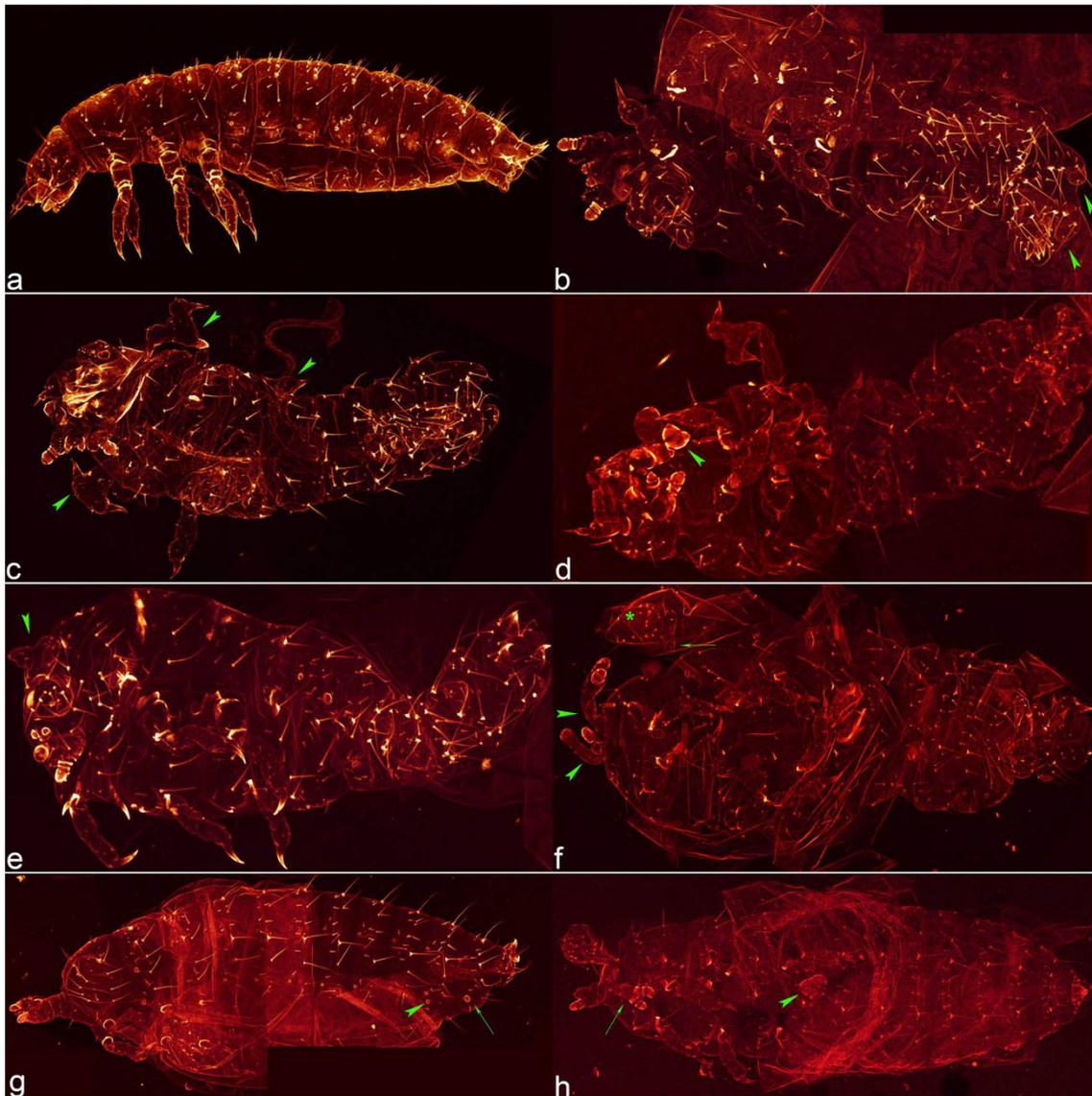


Abb. 35: *gbb*-knock down-Phänotypen II (L1-Larven, konfokale Aufnahmen): **a**, Wildtyp-Larve zum Vergleich. **b-h**, *gbb*-RNAi-Larven, **b**, Larve mit stark deformiertem Kopf; Antennal- und Mandibularsegment wahrscheinlich deletiert; laterale Erweiterungen der Körperwand in A7 & A8, diese Segmente mit ektopischen Dorsalmarkern, weiter posteriore Segmente mit lateralen Aussackungen der Körperwand mit evaginierten Atrien (Pfeilspitzen), sowie ektopischen Urogomphi. **c**, stark deformierter Kopf, Abdominalsegmente nach A6 invaginiert; thorakale Extremitäten mit Achsenverdopplung (Pfeilspitzen), auch diese zeigen eine nach dorsal geklappte Endklaue. **d**, zusätzlich zu Merkmalen aus **c**, noch Achsenverdopplung des distalen Maxillarpalpus (Pfeilspitze). **e**, deformiertes Labrum (Pfeilspitze); thorakale Extremität mit Achsenverdopplung (Stern); dorsalisierte Abdominalsegmente mit lateralen Aussackungen, ektopischen Dorsalmarkern und ektopischen Urogomphi. **f**, ähnliche abdominale Merkmale wie **e**; anteriore Kopfsegmente sind tw. deletiert; Achsenverlängerung verbliebener gnathaler Extremitäten (Pfeilspitzen); das Labrum (Stern) liegt isoliert (entweder abgerissen, da gestielt (Pfeil) oder der posteriore Kopf hat keine Kutikula gebildet). **g**, bis auf Maxillarsegment sind alle Kopfsegmente deletiert; ektopisches Stigma in A7 (Pfeilspitze), dilatiertes Stigma in A8 (Pfeil). **h**, das Labrum sitzt gestielt am Kopf an; ein verdoppeltes Hemilabium (Pfeil); abgerissener achsenverdoppelter Maxillarpalpus, dadurch die ventrale Mala deletiert (Pfeilspitze); abdominal wildtypisch.

Lokal begrenzte Defekte in *gbb*-RNAi-Larven

Gerade lokal begrenzte Defekte zeigen eine unterschiedliche Verteilung entlang der AP-Achse (Abb. 37).

Abgewinkelte Praetarsi

Eine zur Dorsalseite der Extremität hin abgewinkelte Klaue (Praetarsus) tritt häufig auch in den schwächsten *gbb*-Phänokopien auf, die durch Injektion von 200ng/μl dsRNA erzeugt wurden und keine weiteren Defekte zeigen (Tab. 7). Diese Veränderung geht meist einher mit einer bulbigen Verdickung des Tibiotarsus (stark gestörte Larve in Abb. 34i). Interessanterweise sind auch die achsenverdoppelten Extremitäten von diesem Defekt betroffen, wobei am gleichen Tier auch wildtypische Praetarsi vorhanden sein können (Abb. 35c, d).

Dilatierte Stigmata

Vornehmlich in Segmenten, die sich durch das Auftreten von ektopischen Dorsalmarkern schon als zumindest partiell dorsalisiert auszeichnen, fallen geweitete, bzw. in Form und Durchmesser unregelmäßige Stigmata auf. Die im Wildtyp nahezu kreisrunde Tracheenöffnung zeigt sich dort oft elliptisch oder unregelmäßig geformt von doppeltem bis vierfachem Durchmesser (Abb. 34b). Vereinzelt ist auch der begrenzende stark sklerotisierte Kutikularring einseitig durchbrochen. Die anschließende Trachee bleibt aber trotz Deformation erkennbar. Gelegentlich ist auch eine Verdopplung der Tracheenöffnung zu sehen (Abb. 35g). In Individuen mit dorsalisierten Abdominalsegmenten und kegelförmigen Auswüchsen sind die Stigmata auf den Auswüchsen gelegen, fehlen oder es kommen ektopische Stigmata vor. Die evaginierten Atrien wurden bereits beschrieben. Auch das Auftreten dilatierter Stigmata ist häufig unilateral und entlang der AP-Achse unterschiedlich. Im Gegensatz zu den ektopischen Dorsalmarkern kommt dieser Defekt jedoch auch in den Segmenten A1 und A2 häufig vor bzw. betrifft die thorakale Tracheenöffnung in T2.

Verdopplung von Feinstrukturen

Häufig kommt es zu spiegelsymmetrischen Verdopplungen von einzelnen Borsten, wobei die der dorntragenden Seten am leichtesten zu erkennen sind. Hier treten verschiedene Konstellationen auf: Erstens, nur der Dorn ist verdoppelt, während die benachbarte Seta unbeeinflusst bleibt. Zweitens, eine Seta trägt an beiden Seiten ihrer Basis einen Dorn. Drittens, die aus einer Anlagenverdopplung resultierenden beiden Setae stehen eng zusammen und tragen spiegelsymmetrisch jeweils basal einen Dorn. Und viertens, die resultierenden

beiden Dorne stehen eng zusammen und die Setae außen (Abb. 36a, b). Auch andere Borsten können verdoppelt sein. Darüber hinaus treten zweispitzige und dreispitzige Urogomphi auf (Abb. 36c). Auch dies ist eine lokale Erscheinung, die nicht immer mit dem Auftreten ektopischer Urogomphi einhergeht. Neben der offensichtlichen Verdopplung von Strukturen, sind T-förmig deformierte Borsten sehr häufig (Daten nicht gezeigt). Diese Defekte sind wie eingangs erwähnt lokal und stehen häufig isoliert in einem sonst der Wildtypsituation entsprechenden Segment.



Abb. 36: Verdopplung lokaler Kutikulastrukturen: **a**, spiegelsymmetrisch verdoppelte Seta mit Dorn. **b**, spiegelsymmetrisch verdoppelter Dorn. **c**, dreispitziger ektopischer Urogomphus (Pfeile).

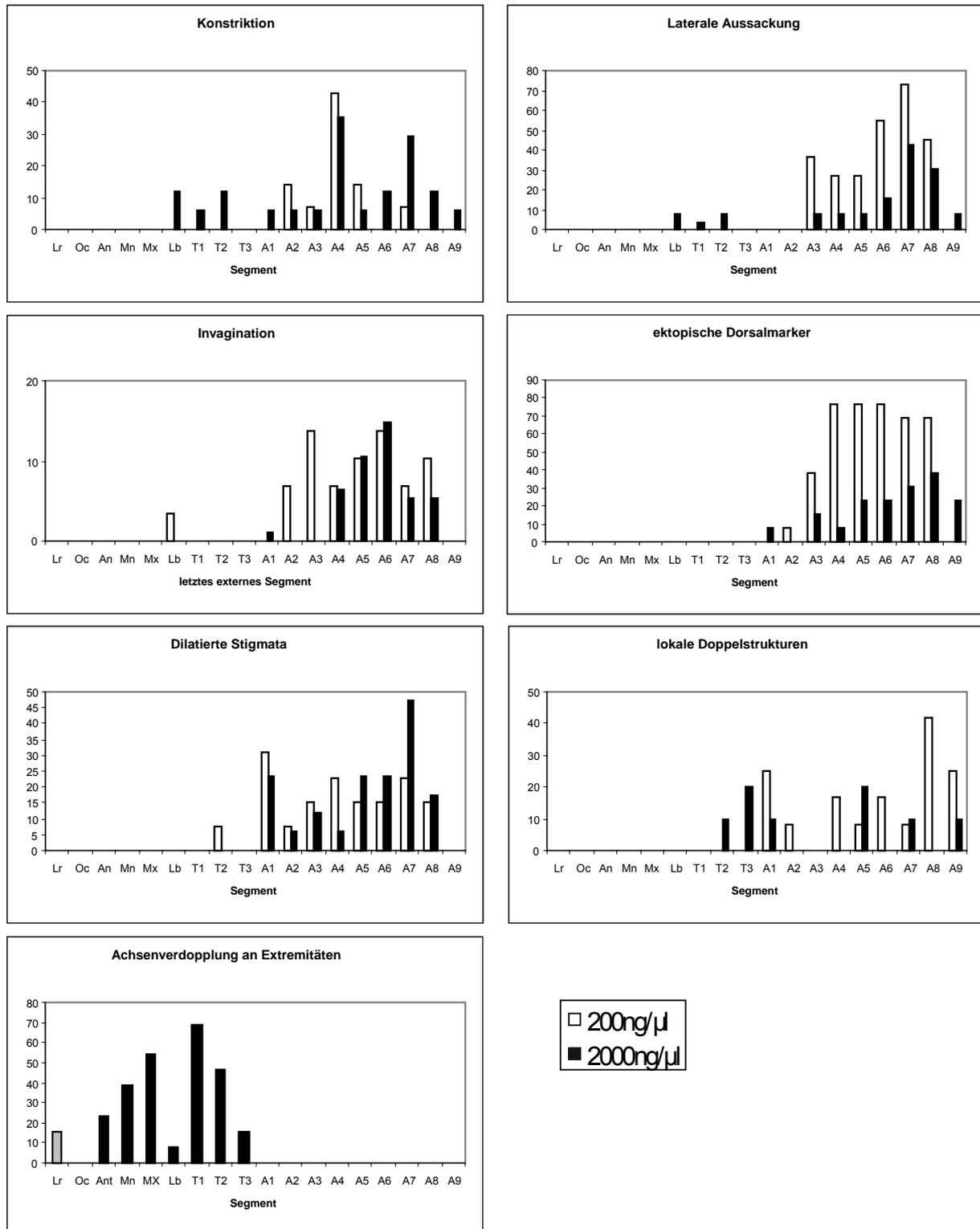


Abb. 37: Verteilung phänotypischer Defekte entlang der AP-Achse in Phänotypen aus embryonaler *gbb*-RNAi: Ordinatewerte: Anteil am gesamten Auftreten des betreffenden Defektes in %, die Abzisse entspricht der anteroposterioren Achse (Interkalarsegment und A10 bis Telson wurden weggelassen). „Achsenverdopplung“ im Labrum bezieht sich auf verdoppelte Sensillenfelder. Die Stichprobenumfänge sind für 200ng/μl bzw. 2000ng/μl im einzelnen: Konstriktion, n=12, n=25; laterale Aussackung, n=36, n=29; Invagination, n=21, n=41; ektopische Dorsalmarker, n=54, n=24; dilatierte Stigmata, n=20, n=27; lokale Doppelstrukturen, n=18, n=8; Achsenverdopplung an Extremitäten, n=35.

Achsenverdopplung der Extremitäten

Während durch niedrigere dsRNA-Konzentrationen die Entwicklung der Extremitäten nur selten und geringfügig gestört wird, ist die Verdopplung der proximodistalen Achse bei Injektion von 2000ng/μl ein häufiger auftretender Phänotyp (Tab. 9). Der Defekt betrifft die Gliedmaßen von Kopf und Thorax. Hierbei entwickelt sich z. B. eine thorakale Extremität (Abb. 38h-j & l-n) mit zwei getrennten distalen Podomeren, zumeist Praetarsus und Tibiotarsus, die an einem gemeinsamen Podomer ansetzen, das aus einem dorsalisierten Femur besteht. Wenn auch das Sensillenmuster häufig gestört ist, so zeigt die Lage der wichtigsten Marker, und die Position der verdoppelten Podomere relativ zueinander dennoch, daß es sich um eine Duplikation der Dorsalseite handelt. Eine Verzweigung im Trochanter mit Verdopplung der campaniformen Sensillen kommt ebenso vor, wie eine Verzweigung distal im Tibiotarsus lediglich mit Entwicklung zweier Klauen.

Gerade bei den Kopfextremitäten bestätigt sich der Befund, daß es sich stets um die Verdopplung der Dorsalseite der Extremität handelt: so läßt sich anhand der Befunde an Maxillen unterschiedlicher Individuen eine Serie darstellen, wobei der Verzweigungspunkt zunehmend weiter proximal liegt (Abb. 38c-f). Abb. 38c zeigt dabei einen Maxillarpalpus mit äußerst distalem Verzweigungspunkt und verdoppeltem apikalem Sensillenfeld. Der Grenzverlauf der sklerotisierten Kutikula läßt den Schluß zu, daß hier das Endglied nahezu vollständig dupliziert ist. In Abb. 38d ist der Verzweigungspunkt soweit proximal gelegen, daß zwei distale Glieder dupliziert sind. Abb. 38e zeigt zwischen den vollständig duplizierten Maxillarpalpen eine rudimentäre Mala, mit einem reduzierten Sensillenfeld. Abb. 38f zeigt schließlich zwischen vollständig duplizierten Maxillarpalpen eine Mala, deren Sensillenbesatz und Größe daraufhin deutet, daß schon innerhalb der Mala Schicksale dupliziert sind. Umgekehrt werden ventrale Schicksale (Mala-Bildungen in e, f und vermutlich Kutikula zwischen den Pfeilen in d) umso stärker reduziert, je weiter distal der Verzweigungspunkt liegt; es kommt dann lediglich zur Verdopplung der Sensillengfelder bzw. Teilen von ihnen.

Auch Duplikationen des Labialpalpus kommen vor, wobei es sich in dem in Abb. 38g gezeigten Fall, vermutlich um ein Hemilabium handelt und der Verzweigungspunkt liegt offenbar im Praementumglied.

Die Interpretation der Achsenverdopplung der Antennen ist schwieriger, da die dorsoventrale Zuordnung der Sensillen bei *Tribolium* unklar ist. Interpretiert man die gefundenen Duplikationen gemäß den Befunden an thorakalen und gnathalen Gliedmaßen, so könnte die papillenförmige Sensille auf dem Scapus einen Ventralmarker darstellen, die Sensillengruppe auf dem Pedicellus einen Dorsalmarker. In Abb. 38a trägt ein keulenförmig

verdickter Pedicellus zwei Flagellen. Dabei ist die benachbarte (dorsale) Sensillengruppe ebenfalls verdoppelt und liegt außerhalb der beiden Flagellen, weist also möglicherweise auf eine Verdopplung der Dorsalseiten hin, während in Abb. 38b eine einzelne papillenförmige Sensille auf dem Scapus die gemeinsame Ventralseite markieren würde.

Assoziierte Veränderungen der Extremitätenmorphologie

Die von Verdopplung betroffenen Extremitäten zeigen oft zusätzlich eine abnorme Längsstreckung. Hierbei verlieren gerade Coxa und Trochanter durch eine Verlängerung ihre typische Gestalt. Teilweise sind Podomere nicht klar voneinander abgrenzbar, häufiger jedoch sind die Podomere nicht Wildtyp-ähnlich miteinander artikuliert, sondern durch dünne, stielchenartige Bildungen miteinander verbunden. Diese Stielchen sind oft dünnhäutig, oder setzen sich aus dünner Kutikula und einem mikroskopisch sehr auffälligen stark sklerotisierten Teil zusammen. Es handelt sich hierbei vermutlich um dorsale Teile von Gelenken (Abb. 38h, n).

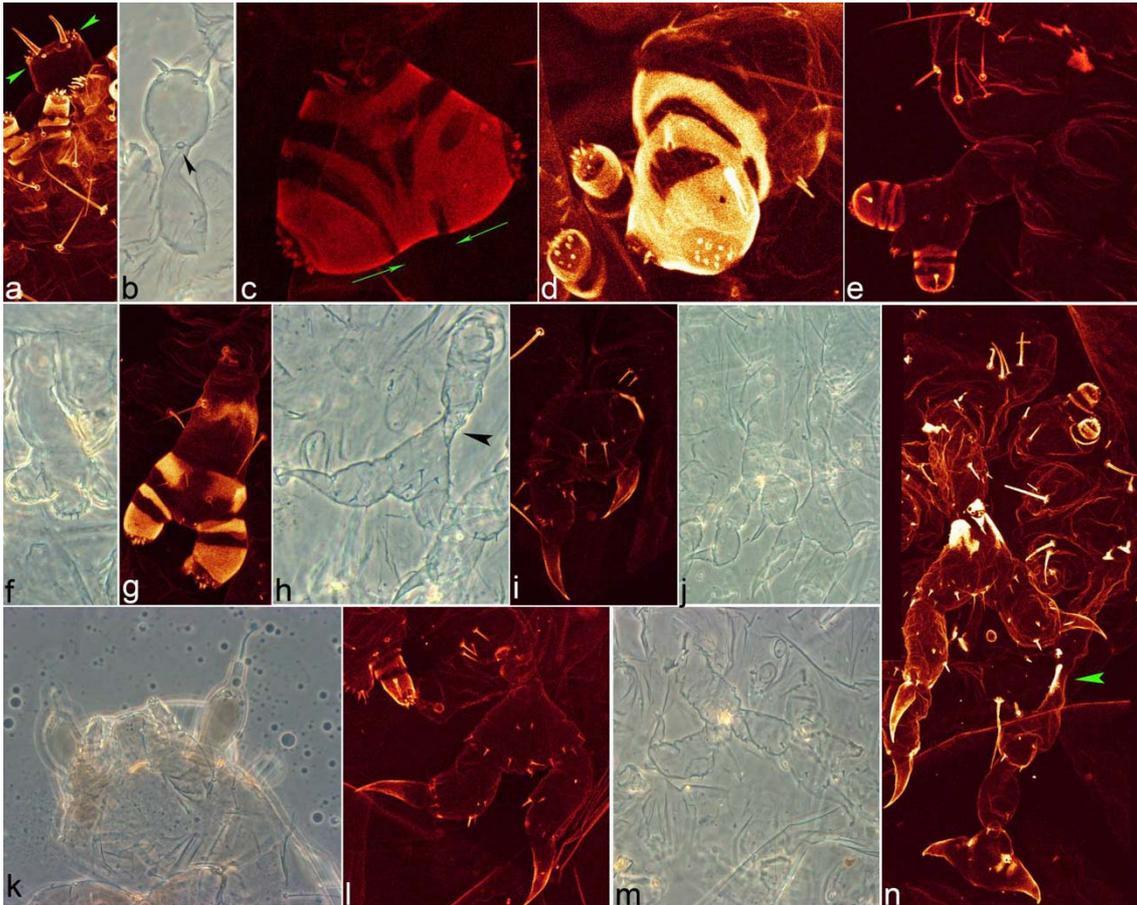


Abb. 38: Achsenverdopplung der Extremitäten in *gbb*-RNAi-Larven, konfokale Aufnahmen und DIC: **a**, Antenne partiell dupliziert: Pedicellus mit verdoppelten Flagellen und verdoppelten Sensillengruppen (Pfeilspitzen). **b**, Antenne partiell dupliziert, distale Konstellation wie **a**; die papillenförmige Sensille (Pfeilspitze) ist nicht dupliziert. **c**, abgerissener Maxillarpalpus (dreigliedrig); die zwei distalen Glieder verdoppelt; (interpretativ: ventrale Zellschicksale möglicherweise zwischen den Sensillenfeldern entlang der Pfeile). **d**, Maxillarpalpus (dreigliedrig); nur das distale Glied verdoppelt; zwischen den Sensillenfeldern liegen wahrscheinlich ventrale Zellschicksale, da auch der erhalten Stipes ist, aber die ventrale Mala fehlt. **e**, Maxille mit vollständig verdoppeltem Palpus und gemeinsamer reduzierter Mala (Duplikationspunkt also vermutlich an proximodistaler Position der ventralen Mala-Anlage). **f**, Maxille mit vollständig verdoppeltem Palpus und gemeinsamer Mala, diese ist stärker erhalten als in **e**. **g**, Hemilabium mit verdoppeltem Labialpalpus (zweigliedrig); der Verzweigungspunkt liegt im Praementum (**c** & **g** stammen vom gleichen Individuum (Abb. 35h), zusätzlich ist noch eine Wildtyp-Maxille vorhanden). **h**, **i**, **j**, **m** & **n** Auswahl an thorakalen Extremitäten mit Achsenverdopplung; die Extremitäten sind häufig symmetrisch entwickelt, proximal des Verzweigungspunktes ist das Sensillenmuster unregelmäßig und spärlicher, das Trochanter-Femur-Gelenk ist häufig stiel förmig verlängert (Pfeilspitzen in **h** & **n**), hier treten auch häufig stark sklerotisierte Teile auf. **k**, Antennen und Maxillen des Wildtyps; das Labium ist abgerissen.

Kopfdefekte

Auch in der *gbb*-RNAi kommen Kopfdefekte (Tab. 9) vor. Neben Deletionen anterior des Maxillarsegmentes (Abb. 35g) werden sie am häufigsten durch die Tendenz aller Extremitäten – einschließlich des Labrums – zu übermäßigem Längenwachstum bestimmt. Dies führt häufig zum Abreißen der gestielt wirkenden Teile während der Präparation (Abb. 35f, h).

Fragmentierung

Bei sehr starken Phänokopien kommt es häufig zu einem Umklappen des Labrums nach dorsoposterior über den restlichen Kopf. Teilweise werden auch die Antennen mit einbezogen. In diesen Individuen ist eine geordnete metamere Abfolge der Kopfextremitäten oft schwierig zu erkennen. Im Extremfall scheinen sich v.a. Labral- und Antennensegment schon während der Embryonalentwicklung vom Rest des Embryos abzulösen und liegen dann als isolierte Hohlgebilde im Ei. Sie lassen sich durch ihren Sensillenbesatz meist leicht identifizieren.

Tab. 8: Häufigkeit von Einzeldefekten innerhalb des komplexen Phänotyps nach embryonaler *gbb*-RNAi. Da die Defekte in einem Individuum nebeneinander auftreten können, ist die prozentuale Häufigkeit nicht kumulativ. Die Daten entstammen den in Tabelle 6 aufgeführten Experimenten. Es sind die relativen (%) und absoluten (n) Häufigkeiten angegeben.

| <i>gbb</i>-RNAi-Defekte | 200ng/μl n=34 | 2000ng/μl n=146 |
|--|----------------------|------------------------|
| Kopfphänotyp | 0 | 20(29) |
| achsenverdoppelte gnathale Extremität | 0 | 4(6) |
| achsenverdoppelte thorakale Extremität | 0 | 9(13) |
| deletierte Extremität | 0 | 26(38) |
| sklerotierter Ring / Achsenverlängerung Extremität | 6(2) | 4(6) |
| abdominale Invagination | 85(29) | 64(94) |
| interner Urogomphus | 23(8) | 20(29) |
| ventral ektopische Dorsalmarker | 38(13) | 9(13) |
| verdoppelte Seta oder Dorn | 35(12) | 7(10) |
| dilatiertes Stigma | 38(13) | 12(17) |
| ektopisches Stigma | 3(1) | 1,4(2) |
| ektopischer Urogomphus | 50(17) | 26(38) |
| laterale Aussackung | 34(11) | 18(26) |
| segmentale Konstriktion | 41(14) | 12(17) |
| reduzierter abdominaler Umfang | 23(8) | 13(19) |

3.2.3 Adult-parentale RNAi

Nachdem sich schon bei der Untersuchung der *dpp*-Funktion und möglicher redundanter *gbb*-Funktionen gezeigt hatte, daß die Rolle beider BMP während der Oogenese die Nutzung der pupalen RNAi ausschließt, wurden zur Gewinnung einer ausreichenden Anzahl von Embryonen für die in situ-Hybridisierung *gbb*-dsRNA in Imagines injiziert. Dabei zeigte sich, daß sich mit Injektionen von 1000ng/μl dsRNA achsenverdoppelte Extremitäten

in der F1 erzeugen lassen. Konzentrationen von 2000-4000ng/μl wurden getestet, um die Penetranz dieses starken Extremitätenphänotyps zu erhöhen. Diese Konzentrationen setzten jedoch – auch in Imagines injiziert – die Fertilität so stark herab, daß sie nicht weiter eingesetzt wurden.

Tab. 9: Häufigkeit der aus eRNAi bekannten Defekte in Kutikulapräparationen von Gelegen von Käfern, die als Imagines mit *gbb*-dsRNA injiziert und zur Gewinnung von Embryonen zur in situ-Hybridisierung benutzt wurden. Die Ablagen wurden am 3., 4. und 5. Tag nach der Injektion genommen. Es sind die relativen (%) und absoluten (n) Häufigkeiten angegeben.

| Injektionslösung Anzahl injizierter Eier | wt | schwacher Praetarsus- Phänotyp | achsen- verdoppelte Extremität | Invagination | schwach skerotisiert oder leere Eihülle | <i>Dll</i> - Phäno- typ |
|--|--------|--------------------------------------|--------------------------------------|--------------|--|-------------------------------|
| <i>gbb</i> -dsRNA, 3.Tag 1000ng/μl n=31 | 19(6) | 29(9) | 10(3) | 23(7) | 23(7) | - |
| <i>gbb</i> -dsRNA, 4.Tag 1000ng/μl n=86 | 23(20) | 31(27) | 7(8) | 27(23) | 14(12) | - |
| <i>gbb</i> -dsRNA, 5.Tag 1000ng/μl n=56 | 20(11) | 43(24) | 4(2) | 27(15) | 11(6) | - |
| <i>Dll</i> -dsRNA, 1000ng n=103 | - | - | - | - | - | 99(102) |

3.2.4 Expression molekularer Marker in *gbb*-RNAi-Embryonen

Wegen des komplexen *gbb*-RNAi-Phänotyps und des nicht unerheblichen Anteils an Eiern, die keine Kutikula differenzieren, können molekulare Marker die Interpretation der Phänotypen erleichtern und Hinweise auf die Wirkungsweise von *gbb* geben.

Die Expression von *dpp* ist in *gbb*-RNAi-Embryonen dramatisch verändert

In Blastoderm- und posterior pit-Stadien fallen noch keine Abweichungen vom Wildtyp-*dpp*-Expressionsmuster auf. In jungen Keimstreifen mit noch weit offenem Serosafenster zeigen sich flächige, ektopische *dpp*-Domänen ohne distinktes Muster (Daten nicht gezeigt). In älteren Keimstreifen zeigt die in situ-Hybridisierung in *gbb*-RNAi-

Embryonen fundamentale Veränderungen der *dpp*-Expressionsmuster, die sich in einer Expansion der dorsalen *dpp*-Domäne und Auftreten ektopischer („ventraler“) *dpp*-Domänen äußert.

Expansion „dorsaler *dpp*-Domänen“

Die konventionelle Methode zur Devitellinisierung von *Tribolium*-Embryonen durch osmotischen Schock und Scherung, also nicht manuell, liefert bei der Präparation von *gbb*-RNAi-Embryonen überwiegend Keimstreifframente mit einer Expansion der „dorsalen *dpp*-Domäne“ vom lateralen Keimstreifrand hin zur Mittellinie. Insbesondere bei embryonalen Injektionen machen sie den größten Teil präparierbarer Individuen aus. Dementsprechend repräsentieren sie den stärksten auf Expressionsebene nachweisbaren Phänotyp.

Die *dpp*-Expansion verläuft bei moderater Ausprägung ziemlich genau entlang des Wildtyp-Musters von *gbb*, wobei jedoch meist ein medianer Streifen ausgespart bleibt (Abb. 39). Durch Vergleich vieler Fragmente läßt sich die Tendenz erkennen, daß die ektopische *dpp*-Expression die Transversalstreifen der *gbb*-Expression selbst in Expressionsstärke und Breite „nachbildet“. Dennoch bleibt die *dpp*-Expression stets unregelmäßiger als die *gbb*-Expression an entsprechender Stelle. Das Merkmal des expressionsfreien, medianen Streifens ist ziemlich konstant und ist auch bei starken Phänotypen mit flächiger *dpp*-Expression über das *gbb*-Wildtypmuster hinaus, häufig festzustellen. Kommt es zu einer ektopischen Expression in diesem medianen Streifen, so ist diese oft unregelmäßig und auf wenige Segmente beschränkt (Abb. 39e). Es fällt auf, daß von Embryonen mit diesem Expressionsmuster, selbst in Präparationen in denen sich weiterentwickelte Keimstreifen mit anderen phänotypischen Veränderungen finden, wie z. B. eher lokalen ektopischen Domänen, keine Stadien mit Extremitätenanlagen gefunden werden. Vielmehr scheint eine chaotische Proliferation des Ektoderms zu erfolgen, was zu starker Deformation der Keimstreifen führt. In den mit ektopischer *dpp*-Expression assoziierten Proliferationsherden bilden die Zellen polarisiert erscheinende Stränge und mehrschichtige tumorartige Verbände aus (Befunde aus Bisbenzimidfärbungen, Daten nicht gezeigt). Auch geht dies häufig mit dem Eintauchen der Keimstreifen in den Dotter einher, was die Präparation erheblich erschwert (Abb. 40). Ein weiteres häufiges Merkmal ist die Bildung lateraler Inzisionen an den Segmentgrenzen, die wohl die starke Tendenz zur Fragmentierung erklären.

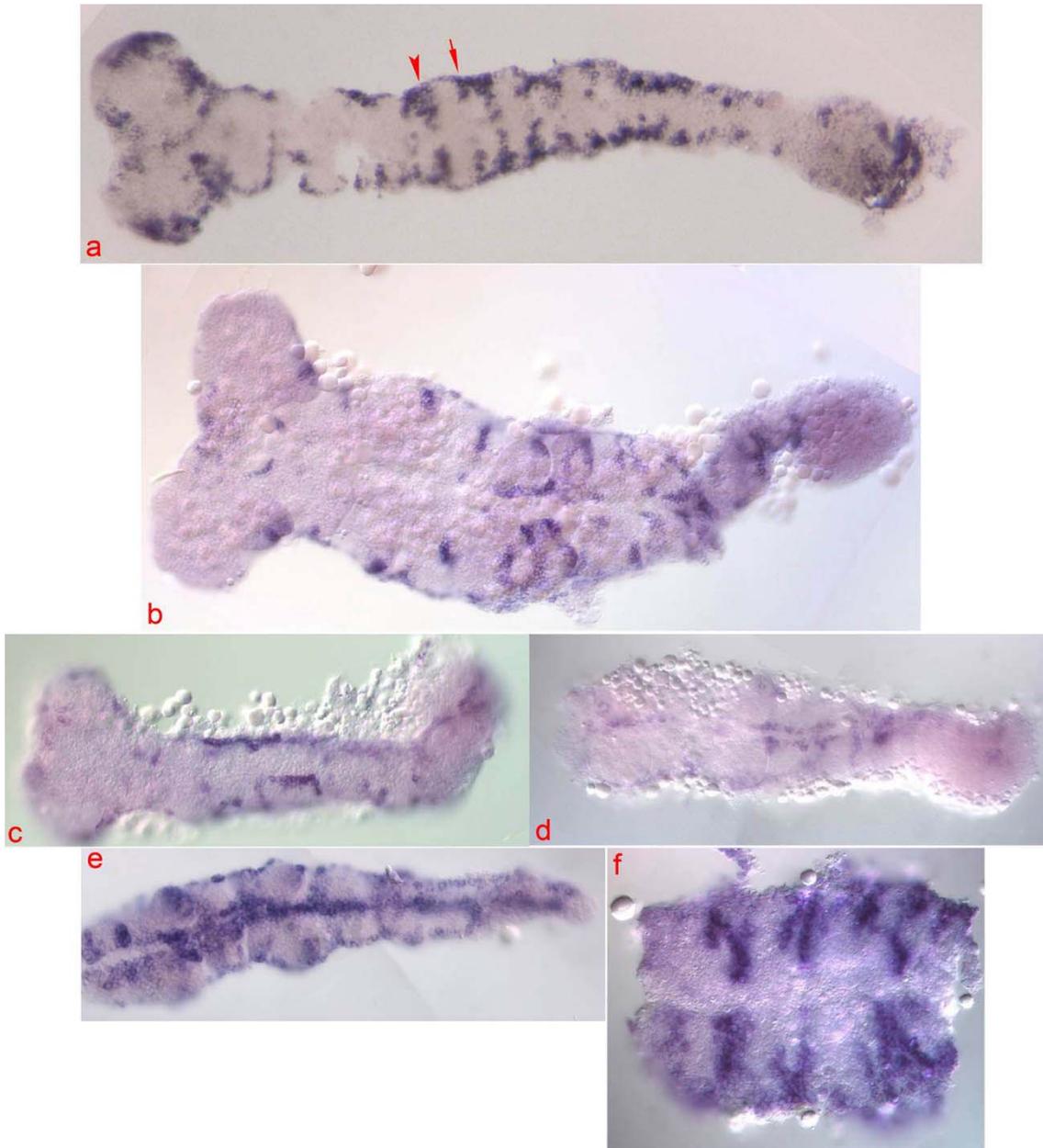


Abb. 39: Expansion dorsaler *dpp*-Domänen nach medial, und ektopische *dpp*-Expression entlang der Mittellinie, in *gbb*-RNAi-Keimstreifen und -Fragmenten (anterior nach links): **a**, moderat betroffener Keimstreif, *dpp*-Expression dehnt sich von ihre normalen Domäne am Keimstreifrand in transversalen Streifen zur Medianen hin aus, in Kopf und Thorax scheint dabei, den anterioren (Pfeilspitze) und posterioren (Pfeil) transversalen *gbb*-Domänen entsprechend, annähernd das Muster der *gbb*-Expression nachgezeichnet zu werden; ektopische Expression findet sich auch in der Wachstumszone. **b**, flächige ektopische *dpp*-Expression im Bereich des Thorax, abdominales Amnion reduziert. **c**, ektopische *dpp*-Expression an der Ventralfurche mit transversalen Ausläufern, abdominales Amnion reduziert. **d**, Fragment ähnlich c. **e**, wesentlich stärkere und ausgedehntere ektopische *dpp*-Expression als in c. **f**, thorakales Fragment phänotypisch ähnlich zu a.

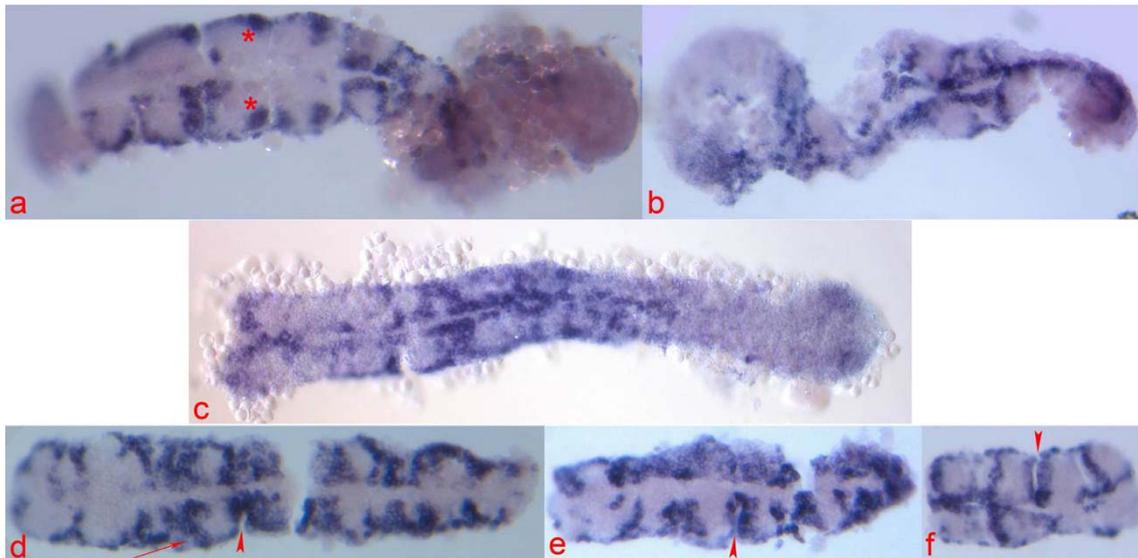


Abb. 40: Starke ectopische *dpp*-Expression und Fragmentierung in *gbb*-RNAi-Keimstreifen (in allen Keimstreifen und Fragmenten anterior nach links): qualitativ ähneln diese Phänotypen den aus Abb. 39, die ectopische *dpp*-Expression ist jedoch stärker: **a**, ectopische *dpp*-Expression in Transversalstreifen zur Mittellinie hin, normale Domänen der Beinanlagen sind sichtbar (Sterne), in A1 findet sich auch ectopische *dpp*-Expression an der Ventralfurche, das restliche Abdomen ist in den Dotter eingetaucht. **b**, vollständiger, aber stark deformierter Keimstreif, ectopische *dpp*-Expression in Transversalstreifen und entlang den Ventralfurchenrändern, also im Bereich der *gbb*-Domänen des Wildtyps. **c**, Fragment, Merkmale wie **a**, Kopfsegmente jedoch abgerissen. **d**, **e**, **f**, Fragmente mit Inzisionen im Bereich der segmentalen Falten (Pfeilspitzen), im Bereich starker ectopischer *dpp*-Expression, bilden sich Nester kettenartig aneinander gereihter Zellen (möglicherweise aufgrund verstärkter Proliferation, Pfeil, vgl. auch Abb. 16), Bisbenzimidfärbung bestätigt diesen Befund (Daten nicht gezeigt).

Lokale ectopische *dpp*-Domänen

Die etwas weniger stark gestörten Keimstreifen zeigen eher begrenzte Anomalien bezüglich der *dpp*-Expression. Isolierte Inseln von 1-20 *dpp*-exprimierenden Zellen treten entlang der gesamten AP-Achse nahe der Mittellinie auf. Lediglich im Bereich neu entstehender Segmente und im ausgewachsenen Keimstreif von A6 bis zum Proctodaeum zeigt sich auch bei moderat gestörten Individuen eine klare Tendenz zu zusammenhängend linienförmiger, paramedianer Expression gegenüber punktförmiger Expression in vorderem Abdomen, Thorax und Kopf.

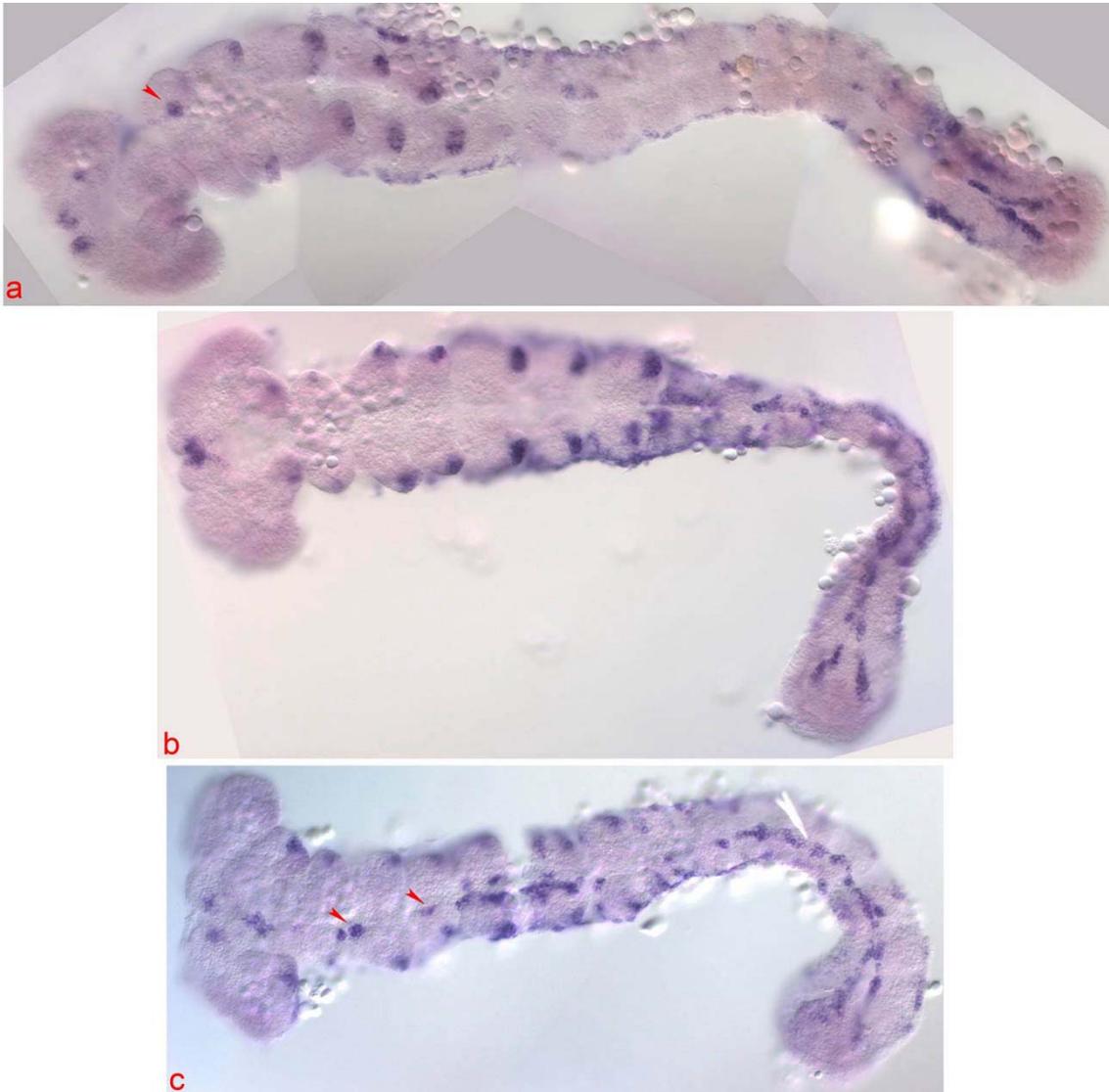


Abb. 41: Moderate *gbb*-RNAi-Phänotypen: ectopische *dpp*-Expression an der Ventralfurche des posterioren Abdomens bis zu den Seitenplattenrändern (outer layer) der Wachstumszone, diese sind durch die internalisierte „inner layer“/„globular mass“ hochgebogen, (vgl. Abb. 45) zusätzlich in **a**, punktförmige ectopische *dpp*-Expression im ventralen Mandibularsegment und anterioren Abdominalsegmenten (Pfeilspitze). **b**, anteriores Abdomen mit flächig-ectopischer Expression ab A1. **c**, ectopische *dpp*-Expression im Bereich der Ventralfurche des Thorax und des Abdomens, punktförmige ectopische *dpp*-Expression im ventralen Maxillar- und Labialsegment (Pfeilspitze).

***Dpp*-Expression in den Extremitätenanlagen von *gbb*-RNAi-Embryonen**

Die *dpp*-Expression in *gbb*-RNAi-Embryonen könnte Hinweise auf die Ursache der Podomerduplikationen liefern, wie sie sich in Kutikulae von *gbb*-RNAi-Larven finden. Dabei lassen sich zwei Klassen von *dpp*-Expressionen unterscheiden. In den meisten *gbb*-RNAi-Embryonen, die überhaupt Extremitätenanlagen ausbilden, kommen lokale *dpp*-Foci vor. Diese liegen häufig nahe der Mittellinie, vereinzelt aber auch direkt auf der ventralen Seite der Extremitätenknospe. Dabei zeigen sich beliebige Variationen (Abb. 43): Eine ektopische Domäne im Bereich der ventralen Wildtyp-*gbb*-Domäne kann sich auf die Extremitätenanlage ausdehnen. Es kann sich aber auch eine isolierte Domäne unterschiedlicher Größe finden. Oder letztlich: die Wildtyp-*dpp*-Domäne ist bis auf die Ventralseite der Anlage ausgedehnt. In vielen Fällen sind die Extremitätenknospen stark deformiert, wobei eine abgerundet blasenförmige Ausprägung am häufigsten vorkommt. Als Extremform ist das gesamte Ektoderm des Hemisegmentes aufgewölbt und es finden sich entweder zwei sehr große, aber getrennte *dpp*-Domänen, oder aber eine zusammenhängende über die gesamte Hemisegmentbreite (Abb. 39b, Abb. 40a). Generell läßt sich in allen *gbb*-RNAi-Embryonen eine Verringerung des proximodistalen Wachstums der Extremitätenanlagen gegenüber solchen in vergleichbar alten Wildtypembryonen feststellen. Die zweite Klasse von embryonalen Extremitätenphänotypen zeigt ein Wildtyp-ähnliches *dpp*-Expressionsmuster auf der distalen Extremitätenknospe. Dabei liegt auch das Maximum der *dpp* Expression wie im Wildtyp dorsal. Dennoch zeigen solche Beinknospen eine Tendenz zur Zweispitzigkeit (Abb. 42). Die Signifikanz dieser subtilen Veränderung läßt sich nicht mit letzter Sicherheit sagen, dennoch findet man dies im Wildtyp an thorakalen Extremitäten nicht. Bemerkenswerter scheint, daß man in den meisten Fällen in unmittelbarer Nähe der ektopischen Spitze eine ektopische lokale *dpp*-Expression nahe der Mittellinie findet (Abb. 42).

Neben diesen Deformationen kommen auch Deletionen einzelner Extremitätenanlagen vor. In starken Phänotypen, die durch ausgedehnte Bereiche ektopischer *dpp*-Expression oder laterale Inzisionen geprägt sind, werden zumeist gar keine Extremitätenanlagen entwickelt. Es fällt auf, daß grundsätzlich überhaupt keine ektopischen Domänen auf der dorsalen Extremitätenanlage zu finden sind. Auch in Embryonen mit vielen ektopischen *dpp*-Foci tritt zum Beispiel eine proximale Vergrößerung der distalen *dpp*-Domäne oder eine distale Expansion der proximalen *dpp*-Domäne nicht auf.

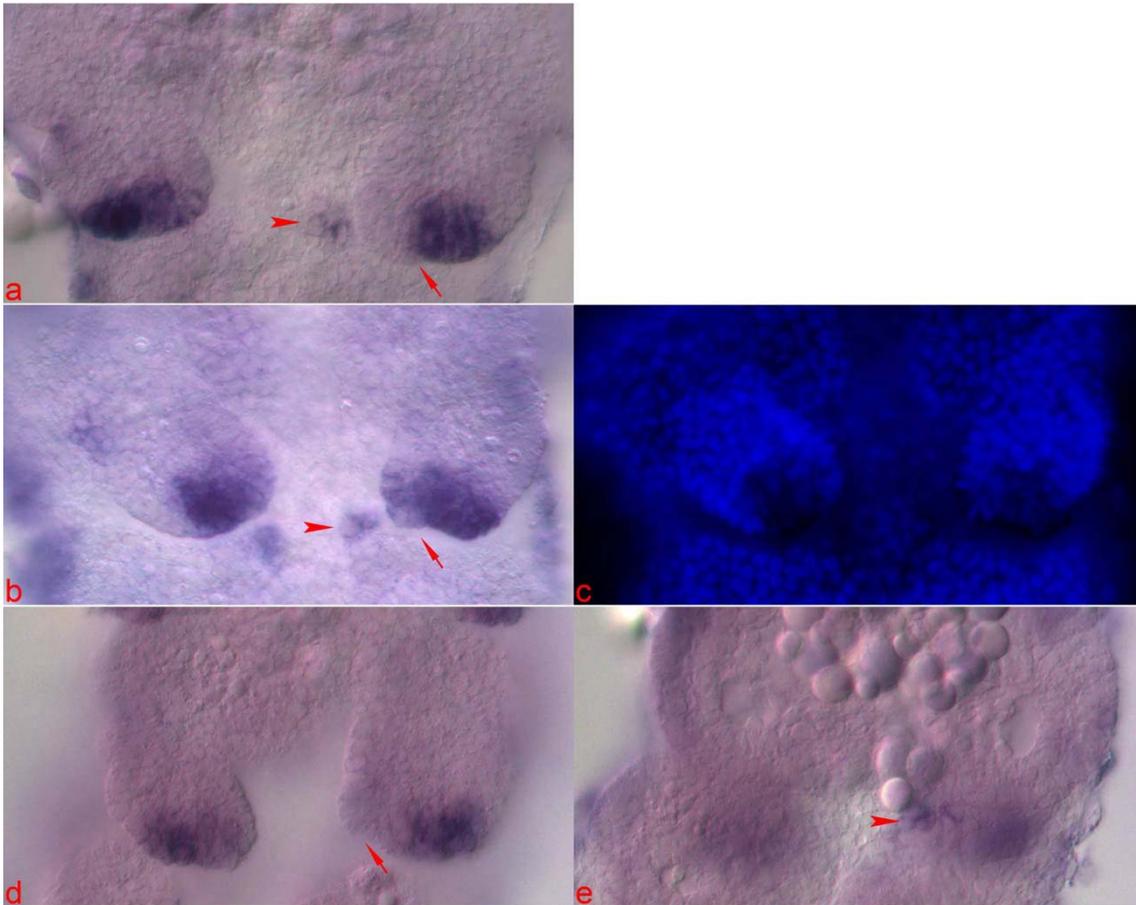
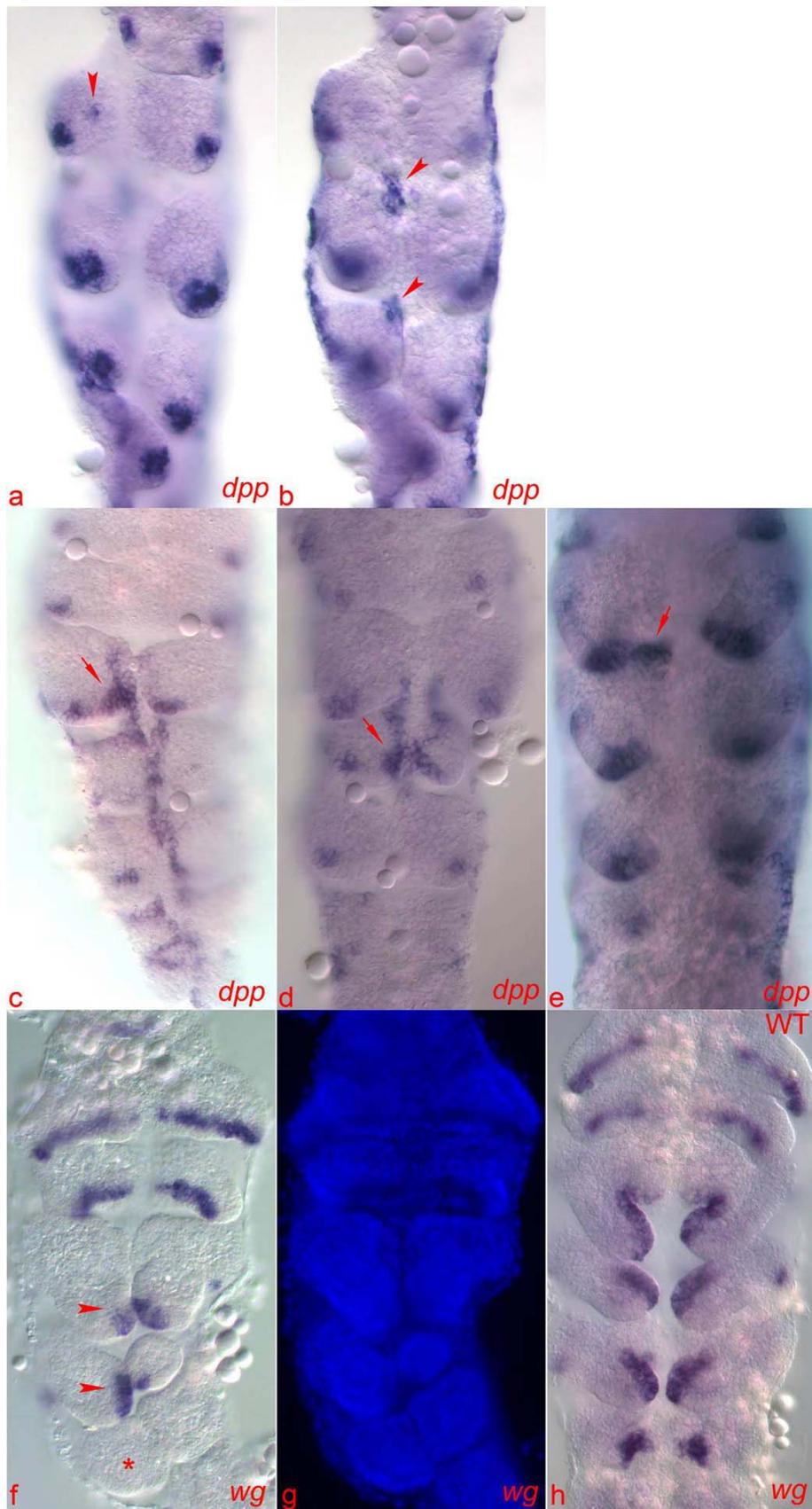


Abb. 42: Zweispitzigkeit von Extremitätenknospen in unmittelbarer Nähe einer ectopischen *dpp*-Domäne: **a**, **b**, **d**, unterschiedliche *gbb*-knock down-Embryonen, ectopische *dpp*-Expressionen (Pfeile) liegen im ventralen Ektoderm desselben oder des benachbarten Segments, die anomale Knospenspitze (Pfeilspitzen) liegt zur Ventralseite der Extremität hin; in **d** liegt die ectopische *dpp*-Expression von der Beinknospe verdeckt. **e**, Präparat aus **d**, tiefere Schärfeebene mit der ectopischen *dpp*-Domäne (Pfeilspitze).

Abb. 43 (Seite 139): Störung der Extremitätenanlagen durch ectopische *dpp*-Expression: **a-e**, Beispiele für ectopische *dpp*-Domänen in *gbb*-RNAi-Embryonen, die zur Duplikation der proximodistalen Achse führen könnten **a**, punktförmige, ectopische Expression auf der proximalen Labialanlage (Pfeilspitze). **b**, ectopische Domänen im ventralen Ektoderm nahe der Extremitätenanlage (Pfeilspitzen) des Embryo aus **a**. **c**, **d**, **e**: Beispiele für ectopische Domänen im ventralen Ektoderm, die auf die Extremitätenanlage übergreifen (Pfeile). **e**, ähnlicher Phänotyp wie **a**, große Nähe der ectopische *dpp*-Expression (Pfeil) zur Extremitätenknospe des anterior gelegenen Segmentes. **f** & **g**: reduzierte *wingless*-Expression in *gbb*-knock down-Phänotypen: **f**, die *wingless*-Expression auf den Ventralseiten von Maxillar- und Labialanlage ist wildtypisch normal, die *wingless*-Expression auf den Ventralseiten der thorakalen Extremitätenknospen nach posterior ist zunehmend reduziert. In T1 & T2 sind die *wg*-Streifen auf die distale Knospe beschränkt und unterschiedlich stark verkürzt (Pfeilspitzen), die Knospen sind blasenförmig deformiert. In T3 ist keine zusammenhängende Expression in den Extremitätenknospen nachweisbar, die Anlagen zeigen kaum Proximodistalwachstum (Stern). **g**, Bisbenzimid-Kernfärbung zu **f**. **h**, *wg*-Expression eines vergleichbar alten Wildtypembryos, das reduzierte PD-Wachstum im *gbb*-knock down-Phänotyp wird im Vergleich besonders deutlich.



Die veränderte Expression von *wingless* in *gbb*-RNAi und die durch *wg* angezeigten phänotypischen Veränderungen

Wg ist segmental und in den Extremitäten exprimiert und kann als Marker ventraler Schicksale dienen. Die auffälligste Veränderung ist die Reduzierung ventralen Ektoderms, soweit sie durch die Verkleinerung der *wg*-Domäne angezeigt wird. Im Allgemeinen scheinen abdominale Segmente häufiger betroffen zu sein. In moderateren Phänotypen beschränken sich die Anomalien auf das Abdomen, wobei sich das wildtypische *wg*-Expressionsmuster findet und kaum verändert ist. Bei diesen Individuen ist oft lediglich das Amnion reduziert. Dieser Phänotyp zeichnet sich durch Einwachsen des Keimstreifs in den Dotter aus. Die größte Gruppe präparierbarer Embryonen stellen jedoch solche mit verkleinerten oder fehlenden *wg*-Domänen in den abdominalen Segmenten (Abb. 44). In Kopf und Thorax gehen mit einer reduzierten *wg*-Expression zumeist Mißbildungen und Deletionen der Extremitätenanlagen einher (Abb. 43f). In Embryonen, deren Extremitätenentwicklung schon weiter fortgeschritten ist, sind in den betroffenen Segmenten die Anlagen reduziert oder es hat sich überhaupt keine Gliedmaßenknospe ausgebildet. Verkümmerte Anlagen sind häufig blasenförmig ohne ausgeprägte PD-Achse. Auch diese Störungen treten seltener bilateral auf. Selbst im Falle einer deletierten Extremitätenanlage kann der ursprünglich ventral davon gelegene Teil des *wg*-Streifen unbeeinflusst bleiben. In sehr starken Phänotypen lassen sich nur noch *wg*-Domänen des Kopfes z.B. der Augen und der Wachstumszone nachweisen, während in allen dazwischenliegenden Segmenten *wingless* nicht exprimiert wird. Diese stark deformierten Keimstreifen wachsen i. d. R. vollständig in die Dottermasse ein, und halten keinen Kontakt zur Serosa.

Die *wingless*-in situ-Hybridisierung in *gbb*-RNAi-Embryonen zeigt regelmäßig eine Reduktion der *wg*-Expression in der Knospe. Die normalerweise auf der Ventralseite der Extremitätenanlage von der distalen Spitze bis zur Mittellinie reichende *wg*-Domäne ist mehr oder weniger von proximal nach distal zurückgedrängt. Dabei kann ein verkürzter ventraler Streifen erhalten bleiben, oder nur eine distale fleckenförmige Domäne. In letzteren Fällen kann sie auch terminal liegen, d.h. eine DV-Asymmetrie ist dann nicht zu erkennen. Die Extremitätenknospen sind hier häufig deformiert. In vielen Embryonen fehlt eine *wg*-Expression in einzelnen Extremitätenknospen vollständig. Diese Knospen, wenn man sie überhaupt als solche ansprechen kann, neigen auch zu einer blasenförmigen Gestalt.

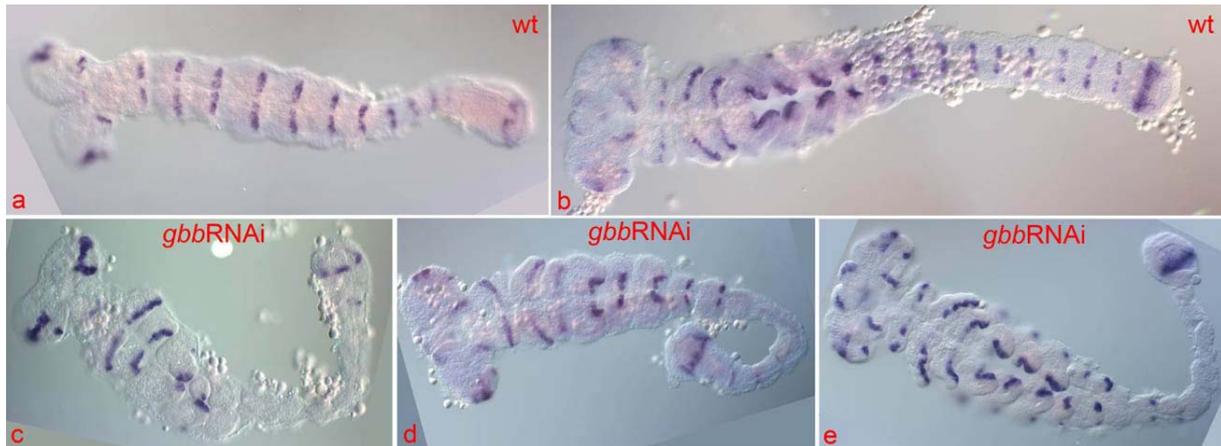


Abb. 44: Reduzierte *wg*-Domänene in abdominalen Segmenten von *gbb*-RNAi-Embryonen: **a**, wachsender Wildtyp-Keimstreif, *wg*-Expression in segmentalen Streifen. **b**, ausgewachsener Wildtyp-Keimstreif, *wg*-Expression in segmentalen Streifen, die einen deutlichen Abstand (dorsale Anlagen) zum Keimstreifrand lassen. **c**, *gbb*-RNAi-Embryo (aus Abb. 43f), nahezu vollständige Reduktion der *wg*-Domänen der abdominalen Segmente, *wg*-Expression der Wachstumszone ist vorhanden. **d**, *gbb*-RNAi-Embryo, vollständige Reduktion der *wg*-Domänen in A3-5, posterior davon nur schwache *wg*-Expression, die *wg*-Domäne der Wachstumszonen ist Wildtyp-ähnlich; thorakale Segmente sind wenig gestört. **e**, *gbb*-RNAi-Embryo, partielle und unregelmäßige Reduktion der *wg*-Domäne nach A3; thorakale Segmente sind wenig gestört.

Reduktion des Amnions

Die dritte Gruppe phänotypischer Veränderungen betrifft die Reduktion des Amnions. Bei den durch in situ-Hybridisierung analysierten Embryonen waren ausschließlich abdominale Segmente betroffen (Abb. 45). In extremen Fällen fehlt das Amnion von A1 bis zum letzten Abdominalsegment, häufiger sind jedoch nur A7 bis A9 betroffen. Oft sind auch nur Segmente des vorderen Abdomens betroffen, während die hinteren dann wieder ein Amnion ausbilden. Nicht alle amniotischen Zellen lassen sich von solchen des Keimstreifs morphologisch unterscheiden: posterior – über der Wachstumszone – und nahe an den lateralen Rändern handelt es sich nicht um ein typisches Plattenepithel. Daher ist das Fehlen von Plattenepithel kein Beleg für die vollständige Reduktion des Amnions. Zusätzlich zeigt mit *twist* markiertes Mesoderm die Reduktion des Amnionepithels an (siehe unten, Abb. 45, Abb. 46).

Beim Fehlen des Amnions werden die beiden lateralen Ränder des Keimstreifs und damit die „dorsale *dpp*-Domäne“ über dem ventralen Keimstreif zusammengebracht. In diesem häufigen Phänotyp resultiert ein recht dickwandiger Schlauch geringen Umfangs, der metamere Verdickungen aufweist (Abb. 45a-e). Im Idealfall vereinen sich die dorsalen *dpp*-Domänen zu einer einzigen „nahtförmigen“ *dpp*-Domäne (Abb. 45e) nun in äußerst ventraler Position im Ei (nicht auf den Anlagenplan des Embryo bezogen). Teilweise zeichnet sich auch

noch das segmentale *dpp*-Muster des Wildtyps ab. Im überwiegenden Teil der Embryonen, auch in moderaten Phänotypen, ist die *dpp*-Domäne jedoch unregelmäßig und über mehrere Segmentlängen unterbrochen, also nicht etwa nur verdeckt durch umgebendes Mesoderm (Abb. 45a-f). Im Wildtyp unterlagert invaginiertes mesodermales Gewebe zunächst als abgerundet-rautenförmiges Blöckchen das Ektoderm eines jeden Segmentes. Mesoderm unter der *en*-Domäne exprimiert kein *twi*. Später spalten sich die Blöckchen entlang des Keimstreifs von anterior nach posterior zu lateralen Domänen auf. Diese Aufspaltung beginnt etwa gleichzeitig mit der Initiation der Gliedmaßenanlage. In ihrer endgültigen Position unterlagern die Mesodermblöckchen das dorsale Ektoderm (Handel et al., 2005). In Keimstreifen von *gbb*-RNAi-Embryonen mit reduziertem Amnion umgeben die Mesodermblöckchen gürtelförmig jedes Segment, was die metameren Verdickungen erklärt (Abb. 45a, c, g). In jungen Segmenten liegen sie unter dem ventralen Ektoderm und nur ihre Spitzen treffen sich über der nun medianen, der Serosa genäherten und offenbar teilweise fusionierten *dpp*-Domäne (Abb. 45c). Die *twi*-in situ-Hybridisierung bestätigt somit, daß *gbb*-RNAi-Keimstreifen durchaus noch primäre Dorsoventral-Polarität besitzen, insbesondere, was die Entstehung des Mesoderms in der Wachstumszone betrifft. Dabei entspricht das Migrationverhalten der Mesodermzellen dem des Wildtyps. In der Folge treffen die anfangs dem Dotter aufliegenden (im Wildtyp ventral) Mesodermblöckchen nun auf der der Serosa zugewandten Seite des Ektoderm Schlauches in der Mittellinie aufeinander. Häufig ist auch ein Amnion verringerter Breite, das zu hochgebogenen Keimstreifrändern führt, mit normal ausgeprägter *dpp*-Domäne. Als Folge des Verlustes des Amnions kommt es häufig zu einer Loslösung des auswachsenden Keimstreifs von der Serosa und einem Einwachsen in den Dotter. In der Bisbenzimidfärbung sind die einander genäherten Keimstreifränder als Doppelreihe von Kernen zu sehen (Abb. 46m). Zusammen mit den *twi*-exprimierenden Mesodermblöcken, zeigen sie, daß die Orientierung der DV-Achse entsprechender Abschnitte dann nicht mehr relativ zum Ei fixiert ist. Dabei ermöglicht der Verlust des Amnion-Serosa-Kontaktes offenbar in einigen Fällen eine vollständige Umdrehung der DV-Achse und führt dann zu einem tordierten abdominalen Keimstreif.

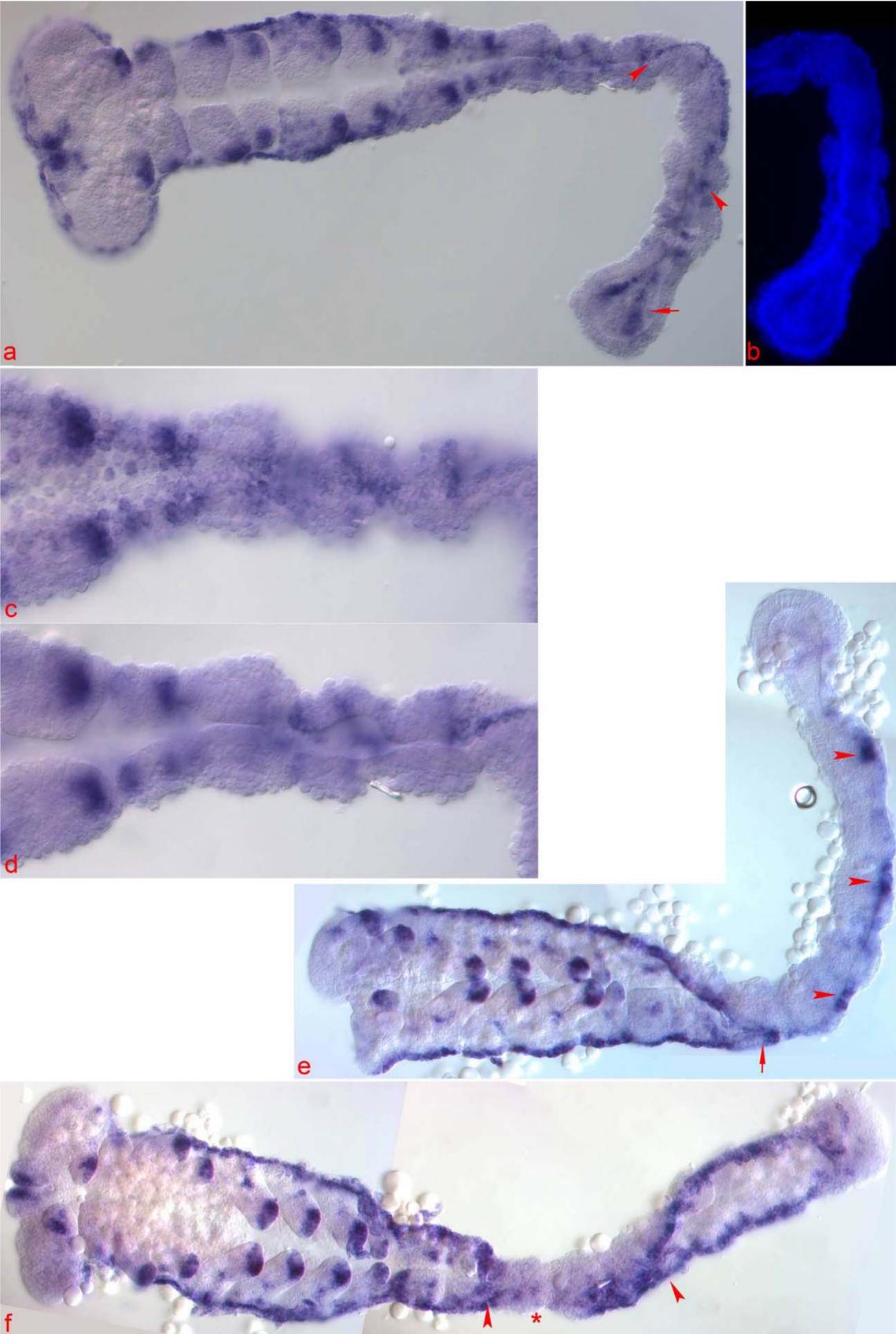
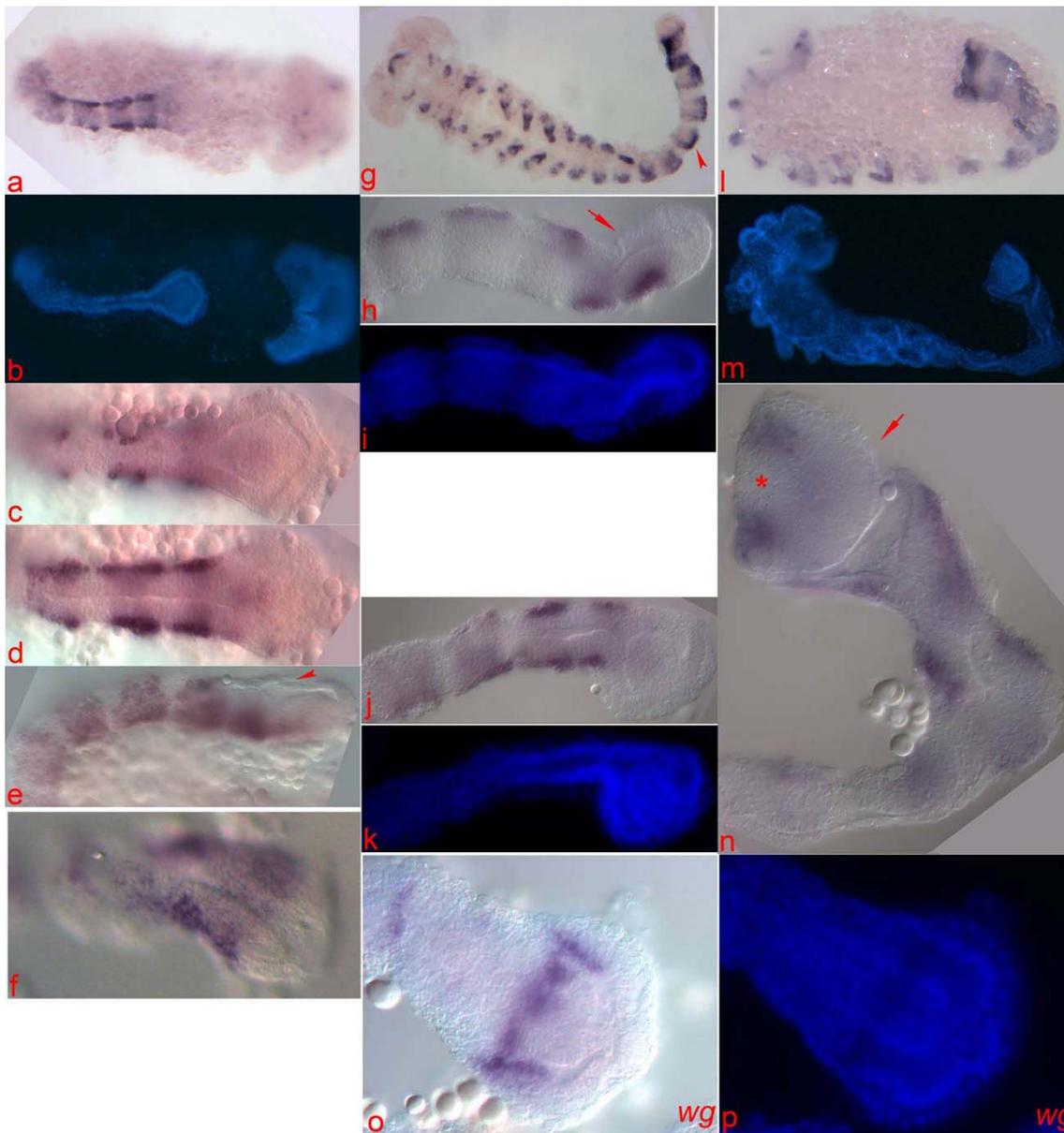


Abb. 45 (Seite 143): Reduktion des Amnions über abdominalen Segmenten in *gbb*-RNAi-Embryonen: **a**, die ektodermalen Ränder des Keimstreifs sind saumartig über dem Abdomen geschlossen (Pfeilspitzen). In der Wachstumszone ist eine ektopische *dpp*-Expression (Pfeil) an den ventralen Seitenplattenrändern zu erkennen. **b**, Bisbenzimid-Kernfärbung zeigt die mesodermale Umhüllung von A4 bis zur Wachstumszone. **c**, Detail des ektodermalen Schlauchs aus **a**, die normale dorsale *dpp*-Domäne ist im Bereich der Amnionreduktion nur unregelmäßig und lückenhaft nachzuweisen, das im Wildtyp desselben Stadiums normalerweise vorhanden amniotische Plattenepithel ist hier vollständig reduziert. **d**, optischer Anschnitt des ektodermalen Schlauches zeigt kuboidales Ektoderm umhüllt von mesodermalen Zellen. **e**, ähnlicher Phänotyp wie **a**, die Amnionreduktion beginnt über A4 (Pfeil), die anterior prominenten dorsalen *dpp*-Domänen vereinigen sich dort über dem Keimstreif und sind weiter posterior nur lückenhaft ausgebildet, ihre segmentale Periodizität ist auch hier an den Expressionen an den segmentalen Falten zu erkennen (Pfeilspitzen). **f**, die Amnionreduktion betrifft nur die Segmente A3 bis A8, in A3 und A8 selbst ist das Amnion unvollständig reduziert, und die ektodermalen Ränder nähern sich dort (Pfeilspitzen), über A4 und A5 ist die dorsale *dpp*-Domäne reduziert (Stern). Amniotisches Plattenepithel ist in allen gezeigten Keimstreifen durch die Präparation verloren gegangen.

Abb. 46 (Seite 145): *twist*-in situ-Hybridisierung in *gbb*-RNAi-knock down-Phänotypen: **a**, Embryo dessen Wachstumszone von rudimentärem amniotischem Epithel bedeckt ist, der Keimstreif wächst wildtypähnlich entlang der Serosa aus. **b**, Bisbenzimid-Kernfärbung zu **a**. **c**, Detail von **a**, optischer Anschnitt der Wachstumszone und Fokus auf die Oberfläche des ektodermalen Schlauchs der Segmente A10 und 11, dort sind einzelne *twi*-exprimierende Zellen zu erkennen. Da die Migration der Mesodermzellen von A10 und A11 erst spät erfolgt, ist der Mesodermring noch nicht geschlossen. **d**, optischer Anschnitt des ektodermalen Schlauches und der Wachstumszone, deren ektodermale Ränder sind hochgebogen und von Mesodermzellen der „inner layer“ unterlagert, diese Zellen exprimieren kein *twist*; Mesodermblöckchen von A9, A10, A11 unterlagern den ektodermalen Schlauch. **e**, gleicher Embryo wie **a-d**, optischer Anschnitt der Wachstumszone und laterale Aufsicht auf den ektodermalen Schlauch zeigen *twist*-exprimierendes Mesoderm und *twist*-freie Mesodermzellen der „inner layer“ die außen dem Ektoderm aufliegen, teils aber auch den hochgewölbten Wachstumszonenboden unterlagern; die Wachstumszone besitzt ein amniotisches Dach (Pfeilspitze). **f**, stereomikroskopische Aufsicht auf eine vergleichbare Wachstumszone, die lateralen Ektodermflanken sind zu einem Dach hochgebogen, um den Verlust von Amnionfläche zu kompensieren (das mediane die Lücke schließende Epithel ist durch die Präparation abgerissen). **g**, ausgewachsener Keimstreif mit reduziertem Amnion über A4 bis A10, die auseinanderweichenden segmentalen Mesodermblöckchen treffen sich auf der Seite, die der Ventralfurche gegenüberliegt (Pfeilspitze). **h**, Telson-/Proctodaeumanlage des Embryos aus **g** mit wildtypähnlichem Habitus und amnionähnlichem Epithel (Pfeil). **i**, Bisbenzimid-Kernfärbung zu **h**. **j**, Telsonanlage, bei der die „inner layer“/„globular mass“ in die Amnionhöhle verlagert wurde, möglicherweise sekundär im Zuge des Ausgleichs von Verlust an Amnionfläche (die Genese ähnelt wahrscheinlich der Wachstumszone in Abb. 21l & m). **k**, Bisbenzimid-Kernfärbung zu **j**. **l**, Embryo mit spiralig in den Dotter eingewachsenen Abdominalsegmenten. **m**, Bisbenzimid-Kernfärbung zu **l**. **n**, Telson-/Proctodaeumanlage des Embryos aus **l**, der terminale Teil ist ventral auf den anterioren Teil zurückgebogen, um das reduzierte Amnion zu ersetzen (Pfeil). *Twist*-exprimierende Zellen des elften Mesodermblöckchens sind gabelförmig um die Stelle der proctodealen Anlage (Stern) gewachsen, dort sind „inner layer“/„globular mass“ in das Lumen der Amnionhöhle gedrängt.

o, *wingless*-Expression einer Wachstumszone in einer früheren Phase, als die in **a** gezeigte, gleichen Phänotyps, *wg*-Expression wie im Wildtyp über die mediane „inner layer“ hinweg. **p**, Bisbenzimid-Kernfärbung zu **o**, die „inner layer“ biegt die Seitenplattenränder nach oben.



Die späte Expression der beiden BMP nahe des Proctodaeum

Die posterioren Defekte in larvalen Phänotypen betreffen zumeist die Urogomphi, Anhänge des 11. Abdominalsegmentes. Die andere große Klasse von Phänotypen in *gbb*-RNAi-Larven zeigt eine Invagination von Abdominalsegmenten, mit unterschiedlicher Ausdehnung des Defektes nach anterior. In vielen solcher Kutikulae läßt sich zeigen, daß auch posteriore und terminale Strukturen wie Urogomphi und Pygopodien vollständig gebildet werden. Auch Reste des Enddarms lassen sich aufgrund der kutikulären Intima darstellen. Im größten Anteil dieser Embryonen jedoch würden terminale Defekte im Gewirr der zusammengeballten Kutikulastrukturen verborgen bleiben. So läßt sich bei der Untersuchung der *gbb*-RNAi-Embryonen im Keimstreifstadium eine Klasse von Defekten finden, die in

Kutikulapräparaten so nicht zu Tage tritt. In diesen Embryonen ist die „inner layer“ in das Lumen der Amnionhöhle gedrängt. Dadurch nähern sich die Seitenplattenränder (Mesektoderm und Neuroektoderm) der Wachstumszone nicht median wie im Wildtyp, sondern sind in die Amnionhöhle hochgebogen (Abb. 45a & b, Abb. 46e, h & i, j & k, o & p). Dieser Phänotyp findet sich in moderaten Phänotypen ebenso (Abb. 41), wie in ausgewachsenen Keimstreifen, deren anteriore Abdominalsegmente schon eine deutliche Reduzierung der Amnionfläche zeigen (Abb. 45a & b, Abb. 46e, h & i, j & k, o & p), und deren Keimstreif daher zu einem ektodermalen Schlauch gebogen ist. Es sei angemerkt, daß es dabei oft nicht zu einer vollständigen Reduzierung des Amnions im Bereich der Wachstumszone kommt, jedoch zu einer deutlichen Verringerung seiner transversalen Ausdehnung.

In Embryonen mit reduziertem abdominalem Amnion fällt die inzwischen inaktive Wachstumszone häufig durch ihre ausgesprochen symmetrische Rautenform auf (z.B. Abb. 45a & b, Abb. 46a-d, f). Im Gegensatz hierzu zeigt der Wildtyp in diesem Stadium eine stumpfe, nahezu rechteckige terminale Region.

Die Kernfärbung mit Bisbenzimid (Abb. 45b, Abb. 46p) zeigt die Ursache der Verformung. Anterior ist der Keimstreif stärker als im Wildtyp zusammengeschnürt. Zusätzlich wird die „inner layer“ (Handel et al., 2005) nicht von der Keimstreifoberfläche ausgeschlossen, da offenbar die Invagination dieser Mesodermvorläuferzellen gestört ist. Anstatt sich zum Boden des Proctodaeums zu vereinigen, klaffen daher die Seitenplatten auseinander und bedingen die Rautenform. Posterior hiervon bildet sich der dorsale Teil des Proctodaeums in ungestört wildtypischer Ausprägung mit den charakteristischen Längsfalten des Epithels (Abb. 45, Abb. 46o, p, Abb. 32i, j). Betrachtet man die *dpp*-Expression in solchen Embryonen, so findet man ektopische Expression in den hochgewölbten Seitenplatten (Abb. 32j, Abb. 41a-c, Abb. 45a) von anterior bis zum posterioren Enden der „inner layer“. Damit tritt auch in dieser Phänotypklasse die ektopische *dpp*-Expression im Bereich der *gbb*-Domäne des Wildtyps auf. Wie beschrieben setzt sich dies auch nach anterior in den Keimstreif fort, gegebenenfalls kommt es zu einer Auflösung der paramedianen *dpp*-Streifen in Punktreihen.

In einer *wingless* in situ-Hybridisierung verläuft die W-förmige posteriore *wingless*-Domäne transversal über die hochgewölbte „inner layer und die Seitenplatten, etwa auf halber AP-Ausdehnung der „inner layer“. Wie im Wildtyp exprimieren also beide Zelltypen hier *wg*. Im Wildtyp markiert diese Domäne zunächst den anterioren und lateralen distalen Rand des Proctodaeums, später den gesamten distalen Rand. Die W-Form kommt durch anterioren

Längsfalten des Proctodaeums zustande. Die *twist*-in situ-Hybridisierung zeigt, daß auch in starken Phänotypen das Migrationsverhalten der Mesodermzellen aus dem elften Abdominalsegment dem Muster des Wildtyps (Abb. 30f) ähnelt. Die Zellen wandern nach lateral und posterior, d.h. sie umwandern dabei lateral die dem Dotter zugewandte Fläche der „inner layer“ deren Zellmasse in die Amnionhöhle gedrängt ist (Abb. 45a & b, Abb. 46n).

Ein weiterer hiervon unabhängiger Defekt betrifft die Reduktion des Amnionepithels über der ehemaligen Wachstumszone bzw. dem Telson. Diese für die anteriore Abdominalsegmente beschriebene mehr oder weniger vollständige Reduktion führt zu einem sterischen Problem. Es lassen sich zwei Lösungswege zur Kompensation dieses Flächenverlustes finden. In einem Teil der Embryonen werden die lateralen Ränder der Segmente A10, A11 und Telson bilateralsymmetrisch nach ventral gebogen. Es resultiert eine perfekte Rautenform, von ventral gesehen. Dennoch findet sich nahe der Mittellinie wahrscheinlich Amnionepithel, meist jedoch nur über eine geringe Breite (Abb. 46f, h). Diese Embryonen behalten regelmäßig mindestens terminal Kontakt zur Serosa, wenngleich sie diesen „streckenweise“ dort wo das Amnion fehlt, verlieren können. Diese Keimstreifen wachsen entweder gerade an der Oberfläche des Dotters aus (Abb. 46a, b, g, h) oder nur anteriore Abdominalsegmente sind eingetaucht. Bei einer zweiten Form faltet sich die posteriore Hälfte der „Raute“ über ihre anteriore Hälfte und kompensiert so den Verlust der Amnionfläche (Abb. 46l-n). Auch hierbei finden sich an den Rändern die Rudimente des Amnions als Plattenepithel. Die oben beschriebenen Verhältnisse von „inner layer“, Ektoderm und *twist*-exprimierendem Mesoderm bleiben unberührt. Dieser zweite Lösungsweg scheint vornehmlich in solchen Embryonen verwirklicht zu werden, deren abdominale Segmente frei in den Dotter hineinwachsen.

Die *dpp*-in situ-Hybridisierung zeigt in relativ wenig defekten, Wildtyp-ähnlichen Keimstreifen einzelne eng umgrenzte, ektopische Expressionen im Seitenplattenektoderm der posterioren Abdominalsegmente (Abb. 32h). Diese kleinen *dpp*-Domänen liegen ebenfalls im Bereich der *gbb*-Domäne des Wildtyps. In diesen Embryonen ist das Ektoderm im Bereich der Proctodaeumanlage median geschlossen, und die Zellmasse der „inner layer“ aus dem Lumen der Amnionhöhle ausgeschlossen. Diese schwachen Phänotypen haben im posterioren Bereich ein vollentwickeltes Amnion und dementsprechend ergibt sich hier auch der Habitus des Wildtyp-Keimstreifs. Es ist denkbar, daß solche Expressionen für die Duplikation der Urogomphi ursächlich sind.

3.2.5 Befunde zur Anlage der Trachealplakoden in *Tribolium*

Die im Folgenden gezeigten in situ-Hybridisierungen wurden im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt und werden mit Mikrofotografien cytologischer Färbungen und rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen verglichen, die mir freundlicherweise von Jochen Trauner bzw. Hildegard Wohlfrom zur Verfügung gestellt wurden.

In *Tribolium*-Keimstreifen findet sich eine Reihe punktförmiger *dpp-gbb*-Koexpressionen im prospektiven lateralen Ektoderm. Die starken segmentalen Expressionen dieser Reihe liegen im posterioren Teil eines jeden Segmentes, während sich auch anterior davon an der vorderen Segmentgrenze regelmäßig eine viel schwächere *dpp*-Expression an vergleichbarer dorsoventraler Position findet (Abb. 48). Diese sind im retrahierten Keimstreif (bei etwa 30% Entwicklungszeit) zu erkennen, liegen aber erst später isoliert.

Offensichtlich werden die Trachealplakoden in *Tribolium* in allen drei Thorakalsegmenten primär als morphologisch sichtbare Invagination des Epithels angelegt (Abb. 47) und in T1 und T3 erst sekundär wieder verschlossen. Die Invagination der Trachealplakoden (tracheal pit) beginnt etwa in 24h alten Embryonen, in T1 und T3 sind sie in 36h alten Embryonen fast verschwunden. Während dieser Zeit scheinen sich die Anlagen immer weiter zum Vorderrand des Segmentes zu bewegen. Derivate der Trachealplakode aus T3 wachsen in das zweite Thorakalsegment ein, möglicherweise unter Bildung eines primären Tracheenastes

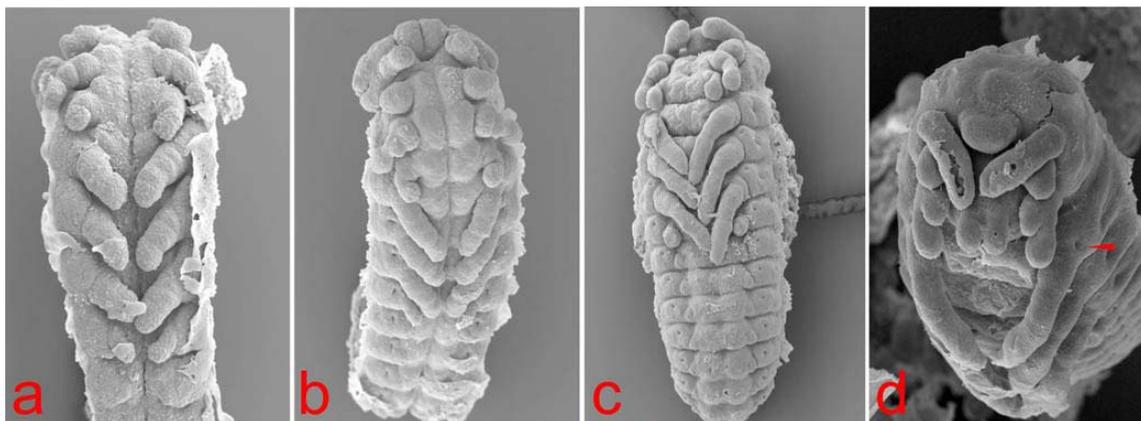
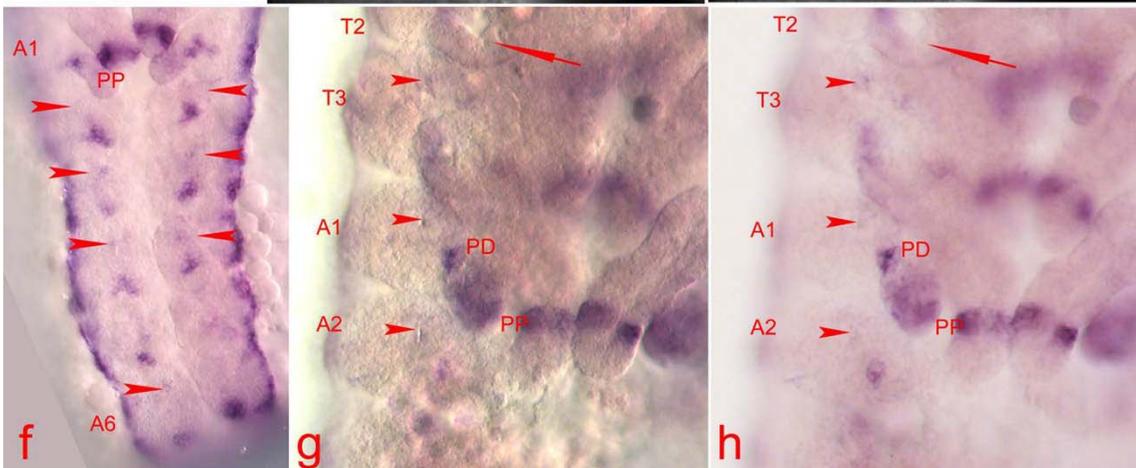
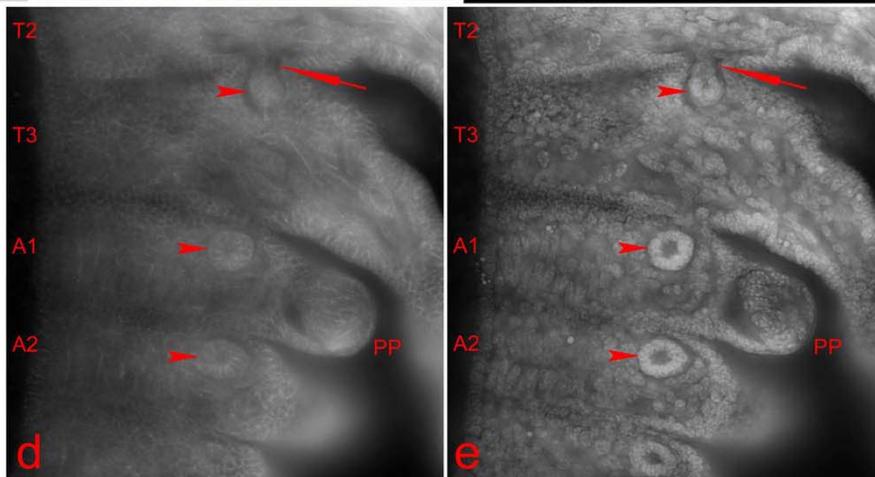
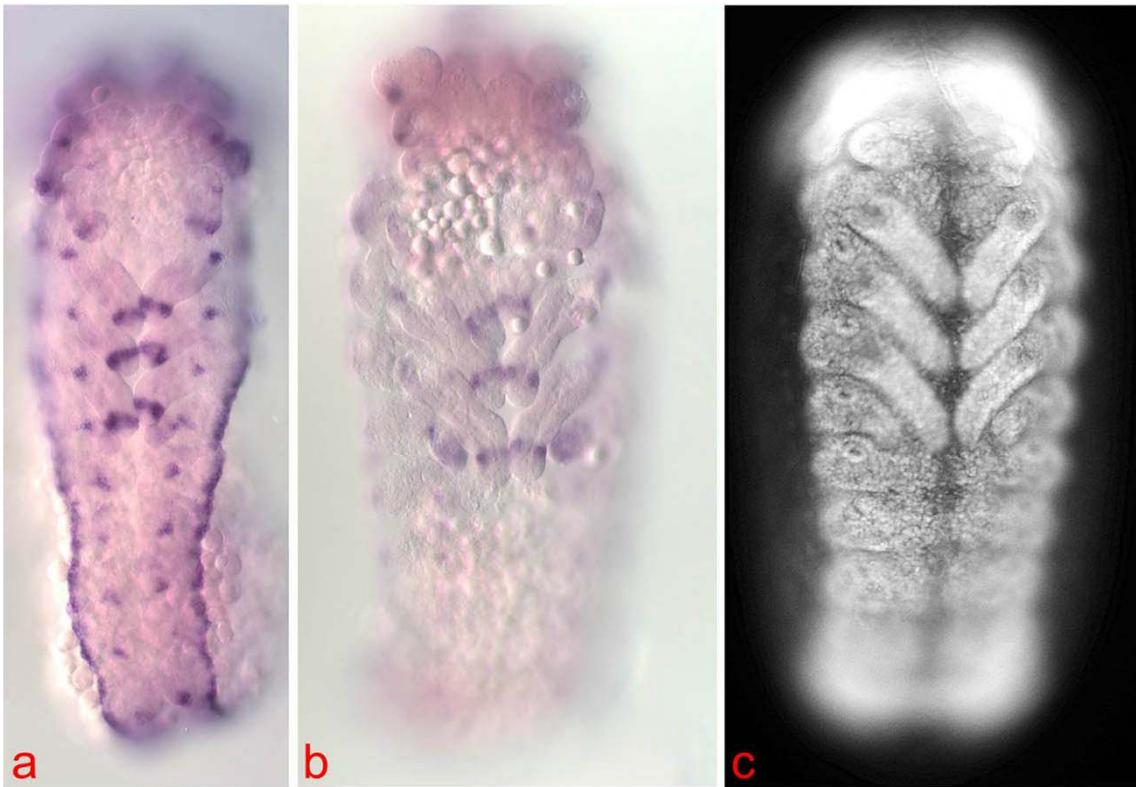


Abb. 47: SEM-Aufnahmen von *Tribolium* Embryonen: **a**, 24h, Trachealplakoden sind noch nicht zu erkennen. **b**, 28h Trachealplakoden mit äußeren Öffnungen am Vorderrand der Segmente. **c**, 36h alter Embryo, Tracheenöffnungen noch weiter nach anterior verschoben, **d**, Tracheenöffnung von T1 (Pfeil) in c nicht zu sehen. (Aufnahmen freundlicherweise von H. Wohlfrom zur Verfügung gestellt)

Abb. 48 (Seite 150): *dpp*-Expression in den Trachealplakoden, ausgewachsene Keimstreifen, a jünger als b & c: **a**, Übersicht: ventrolaterale *dpp*-Domänen treten posterior in den Segmenten als prominente punktförmige Domänen auf (vermutlich metamer homolog den proximalen *dpp*-Domänen der Gliedmaßen) und flächige *dpp*-Expressionen (nahe der Nachweis-Grenze) finden sich im anterioren Teil der Segmente, beide zusammen ergeben bilateral eine ventrolaterale Reihe. **b**, Übersicht für die Detailabbildungen g & h (Nomarski). **c**, Tracheenanlagen von T2 bis A2 in der Schärfenebene am Vorderrand eines jeden Segmentes als Zellringe, Bisbenzimid-Kernfärbung. **d**, Immunfluoreszenzfärbung von α -Tubulin, die Tracheenanlagen liegen direkt an den Segmentgrenzen (Pfeilspitzen), ein Tracheenast wächst von T3 nach T2 (Pfeil). **e**, Bisbenzimid-Kernfärbung, zur Übersicht. **f**, Ausschnitt aus **a**, die *dpp*-Expression an den anterioren Segmentgrenzen könnte mit frühesten Anlagen der Trachealplakoden assoziiert sein (Pfeilspitzen). **g** (Nomarski) & **h** (Durchlicht), Embryo aus **b**, *dpp*-Expression in den ringförmig angeordneten Zellen der thorakalen Tracheenanlagen (Pfeilspitzen) anterolateral der proximalen Domänen (PD), Pleuropodium (PP). der Pfeil in g & h verweist auf die proximale *dpp*-Domäne an der Extremitätenbasis von T2 (Aufnahmen c-e freundlicherweise von J. Trauner zur Verfügung gestellt).



4 DISKUSSION

Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen lieferten neben den Erkenntnissen zu *gbb*-Expression und Funktion auch Details der *dpp*-Wildtyp-Expression im Blastoderm, die bisher nicht beschrieben worden waren. Zusammen mit den hier gewonnenen funktionellen Daten zu *Tc'dpp* tragen diese Expressionsdetails zum Verständnis der Etablierung der Dorsoventralachse im *Tribolium*-Embryo bei. Insbesondere deuten die Ergebnisse dieser Arbeit auf neue, aus *Drosophila* nicht bekannte Musterbildungsprozesse in der Wachstumszone hin und liefern Hinweise auf Wirkungsmechanismen und Interaktionen bei der BMP-Signaltransduktion.

Von den drei in *Drosophila* gefundenen BMP *dpp*, *gbb* und *scw* sind in anderen Insekten wie *Anopheles*, *Schistocerca* und *Tribolium* lediglich *dpp* und *gbb* gefunden worden. Auch nach gezielter Suche findet sich im Genom von *Anopheles* kein Hinweis auf die Existenz eines *screw*-Orthologs. Die Situation in Vertebraten ist ähnlich (Lieber & Luckhart, 2004). Die vorliegende Expressionsanalyse und funktionelle Analyse im Kurzkeiminsekt *Tribolium castaneum* liefert nun Hinweise, daß *gbb* in ursprünglicheren Insekten möglicherweise *screw* funktionell ersetzt. Dabei unterscheiden sich möglicherweise wesentliche Aspekte der *dpp/gbb*-Musterbildung prinzipiell. Andere aus *Drosophila* bekannte Teilsysteme, wie das Sog-Tsg-/Tld-Shuttle-System, sind wahrscheinlich auch in *Tribolium* an der *dpp/gbb*-abhängigen Musterbildung beteiligt.

Im Unterschied zum Langkeimembryo von *Drosophila* unterliegt der *Tribolium*-Embryo während der Entwicklung der Körpergrundgestalt und der Etablierung der Achsen viel radikaleren Veränderungen. Die blastokinetischen Bewegungen unter Beteiligung der extraembryonalen Gewebe sind ausgeprägter, was die Topologie erheblich kompliziert. Vor diesem Hintergrund zeigt sich, daß *dpp* im Laufe der Ontogenese schon bis zur Streckung des Keimstreifs viele verschiedene Funktionen übernimmt. Dementsprechend zeigen die Expressionsmuster dieses Gens eine größere Dynamik als in der frühen Embryonalentwicklung von *Drosophila*. Dies gilt auch für das mit *dpp* koexprimierte bzw. geschachtelt exprimierte *gbb*. Dabei stehen diese beiden BMP-Liganden offenbar in enger Wechselwirkung bei der Aktivierung der Signaltransduktion.

RNAi-Experimente mit *dpp*-RNA liefern nahezu ausschließlich sehr starke Phänotypen, die vornehmlich auf Störungen früher Genfunktionen in der dorsoventralen Musterbildung zurückzuführen sind. Aus diesem Grund sind Aspekte der späteren *dpp*-Funktionen experimentell kaum zugänglich. Auch dsRNA-Injektionen in ältere Keimstreifen

brachten keine brauchbaren Ergebnisse, daher muß sich die Diskussion diesbezüglich auf die Interpretation detaillierter Expressionsanalysen im Wildtyp beschränken.

Während bei Koinjektion von dsRNA beider BMP Phänotypen resultieren, die von frühen *dpp*-Funktionsstörungen dominiert werden, liefert die RNAi mit *gbb*-dsRNA überraschende Einblicke. Aus den Phänotypen können nicht nur Rückschlüsse auf die Interaktion der beiden BMP gezogen werden. Wegen der inhibitorischen Wirkung von *gbb* auf spätere *dpp*-Funktionen lassen sich auch Erkenntnisse über diese sonst unzugänglichen *dpp*-Funktionen gewinnen. Dies betrifft insbesondere die dorsoventrale Musterbildung während der Bildung neuer Segmente in der Wachstumszone, und die Achsenbildung der Extremitäten. Es zeigt sich, daß die inhibitorische Wirkung von *gbb* auf die *dpp*-Expression, wie sie jüngst auch für die Flügelimaginalscheibe von *Drosophila* gefunden wurde (Soares & Wharton, 2005), in *Tribolium* viel weiter verbreitet ist. Die Rolle von BMP-Morphogenen bei der dorsoventralen Musterbildung im *Tribolium*-Keimstreif wird wesentlich durch diese antagonistische Wechselwirkung bestimmt. Daneben ist sie wahrscheinlich auch in der Gliedmaßenentwicklung und bei der Determinierung extraembryonaler Anlagen von Bedeutung. Der Modus der dorsoventralen Musterbildung in *Drosophila* unter Beteiligung von *screw* könnte unter diesen Gesichtspunkten stark abgeleitet sein. Die Notwendigkeit eines zweiten Liganden – *screw* in *Drosophila* und *gbb* in *Tribolium* – könnte hingegen ein konserviertes Merkmal von BMP-Signaltransduktionssystemen sein. Hinweise darauf finden sich auch im Vertebratensystem (Dick et al., 2000; Schmid et al., 2000). Dabei erscheint die Wechselwirkung der beiden BMP eng kontextbezogen. Gbb wäre demnach der phylogenetisch ältere Ko-Ligand neben Dpp.

4.1 *Dpp* ist essentiell für die dorsoventrale Musterbildung im Blastoderm

Der knock down der *dpp*-Funktion durch RNAi erzeugt fast ausschließlich starke Phänotypen, bei denen die Anlagen des Vorderkopfs als Kappe auf dem Dotter verbleiben und die posterioren Segmente terminal und mit invertierter AP-Achse in den Dotter invaginieren. Dorsale Anlagen fehlen im gesamten Keimstreif, während die Musterbildung ventraler Anlagen nahezu ungestört abzulaufen scheint.

Die terminale Invaginationstelle zeigt eine gestörte dorsoventrale Polarität und bildet keine Amnionfalte aus, ist aber dennoch nicht völlig dorsoventral-symmetrisch drehrund. Die dorsoventrale Asymmetrie betrifft ventrale Anlagen. Der internalisierte Teil des Keimstreifs

besteht aus invaginierten blastodermal angelegten Segmenten, die auf eine noch partiell funktionierende Anatrepsisbewegung hindeuten, und aus Segmenten, die durch die Wachstumszone gebildet werden.

4.1.1 *Dpp* determiniert dorsale Anlagen im Blastoderm

Die frühe zygotische *orthodenticle*-Expression zeigt umfassende Auswirkungen des *dpp*-knock downs auf den blastodermalen Anlagenplan. Bei Betrachtung von lateral erscheinen die *otd-1*-Domänen des Wildtyps beiderseits des *twi*-Streifens als keilförmige Expressionen, die sich nach dorsal verschmälern, und sich auf der Dorsalseite nicht berühren. Ihre anteriore Grenze zeigt gleichzeitig die gekippte Serosa-Embryo-Grenzlinie an. In starken *dpp*-RNAi-Phänotypen ("Kappenphänotyp") jedoch ist sie eine breite (25-30% EL), gürtelförmige und vor allem dorsal geschlossene Domäne. Sowohl die vordere, wie auch die hintere Grenze stehen senkrecht zur AP-Achse. Die *otd-1*-Expression ist auf embryonale Zellen beschränkt und zeigt daher, dass die Serosa stark zum anterioren Pol gedrängt wird. Ein Vergleich mit *otd-1*-Expressionen in *zen-1*-RNAi-Embryonen (van der Zee et al., 2005) zeigt, daß im Gegensatz zu letzteren bei den *dpp*-RNAi Phänotypen wohl eine Serosa vorhanden ist, jedoch als DV-symmetrische Kappe. Im Gegensatz dazu ist in *torso-like*-RNAi-Blastodermen die Serosa zwar zurückgedrängt, jedoch bei vollem Erhalt der dorsoventralen Polarität (Schoppmeier & Schröder, 2005).

Gbb und *wg* zeigen beide in *dpp*-RNAi-Embryonen ringförmige, dorsal geschlossene Domänen. Im Wildtyp hingegen ist *wg* in transversalen Streifen exprimiert und die *gbb*-Expression in den Einsenkungen der Kopflappen. Beide Expressionen reichen dorsal nur bis zum Embryorand.

Bei Ausfall der *dpp*-Funktion wird offenbar der blastodermale Anlagenplan sowohl nach dorsal wie auch nach anterior verschoben. In der Folge werden Serosa-Schicksale zu embryonalen Schicksalen transformiert. Dies geschieht zwar auch ventral, aber vor allem im dorsalen Bereich, wo die Serosa im Wildtyp ihre größte anteroposteriore Ausdehnung hat.

Neuere Untersuchungen von Van der Zee (in Vorbereitung) zeigen, dass die Aktivierung des BMP-Signalweges (pMAD-Verteilung im Blastoderm) schon im undifferenzierten Blastoderm, wenn *dpp* noch als anteriore Kappe exprimiert wird, dorsal am stärksten ist. Die dorsale BMP-Aktivierung ist weitgehend unabhängig vom Ort der *dpp*-Expression (Van der Zee in Vorb.) und wird vornehmlich durch die ventrale Expression des *short-range*-BMP-Antagonisten *sog* bestimmt. Da es große Überlappungen in den *dpp*- und *gbb*-Domänen sowohl im undifferenzierten, wie auch im differenzierten Blastoderm gibt, wird

vermutlich ein Großteil der BMP-Liganden als Dpp-Gbb-Heterodimere sezerniert. Wenn Heterodimere wie in *Drosophila* (Shimmi et al., 2005c) effektiver durch Sog transportiert werden, könnten die Anlagen, die im Blastoderm dorsal liegen zumindest bis zu einem gewissen Grade von Dpp-Gbb-Heterodimeren determiniert werden und somit von *gbb* abhängig sein. Dies sind vor allem die dorsalen Teile der posterioren Amnionanlagen (siehe unten). Demgegenüber könnten die dorsalen Schicksale des Kopfes und der anterioren Segmente, die noch im Einflußbereich der anterioren Amnionanlage liegen, von dem dort lokal exprimierten Dpp erreicht werden. Sie wären daher von der *gbb*-Expression weitgehend unabhängig und die Bedeutung von Gbb im dorsoventralen Musterbildungsprozeß würde von anterior nach posterior zunehmen.

4.1.2 Die anteriore *dpp*-Expression unterliegt zunehmend dorsoventralen Einflüssen

Der Einfluß des AP-Systems auf die Expression beider BMP ist von Beginn an offensichtlich. Erst mit dem Zurückziehen der Expressionsgradienten zur Serosa-Embryogrenze treten dorsoventrale Asymmetrien auf, die den zunehmenden Einfluß des DV-Systems deutlich machen (Abb. 7, Abb. 51). Ähnlich wie in *Drosophila* etabliert sich auch in *Tribolium* eine dorsoventrale Polarität in der *dpp*-Expression, wahrscheinlich unter Einfluß des NF- κ B/Dorsal-Systems (Chen et al., 2000). Im Unterschied zu *Drosophila*, wo der Gradient nukleären Dorsal-Proteins letztlich eine komplementäre Expression von *dpp* bewirkt, ist die Interaktion der beiden Signalwege in *Tribolium* von gänzlich anderer Qualität.

Die früheste *dpp*-Expression – in terminalen Kappen – scheint zunächst ausschließlich durch das AP-Musterbildungssystem kontrolliert zu werden, da ihre Geometrie anfangs jegliche dorsoventrale Asymmetrie vermissen läßt. Eine direkte reprimierende Kontrolle durch *dorsal* kann in *Tribolium* also nicht vorliegen, da *dpp*-Expression und nukleäres Dorsal im ventralen Bereich des Blastoderms überlappen.

Gbb zieht sich dorsoventral-symmetrisch zurück (Abb. 25c), sodaß die dorsoventrale Polarität der resultierenden Expression lediglich durch die posteriore Begrenzung der gekippten Serosa vorgegeben wird. Demgegenüber zieht sich die Expression von *dpp* schon vor der Differenzierung des Blastoderms auf eine ventrale Region zurück. Diese Ausprägung ist das erste Anzeichen von Einflüssen aus dem dorsoventralen System, wobei aber nach wie vor ventrale Faktoren die *dpp*-Expression aktivieren, statt wie in *Drosophila* zu inhibieren. Anterior lokalisierte Faktoren (Bucher et al., 2005), die *dpp* reprimieren könnten, könnten zusammen mit der aktivierenden Funktion von *dl* auf *dpp*, unmittelbar den zur AP und DV-

Achse gekippten Verlauf der *dpp*-Domäne erklären: eine von anteroventral nach dorsoposterior verlaufende Achse äquivalenter Kombinationen ventraler Aktivierung und anteriorer Repression könnte den Verlauf der Serosa-Embryogrenze definieren.

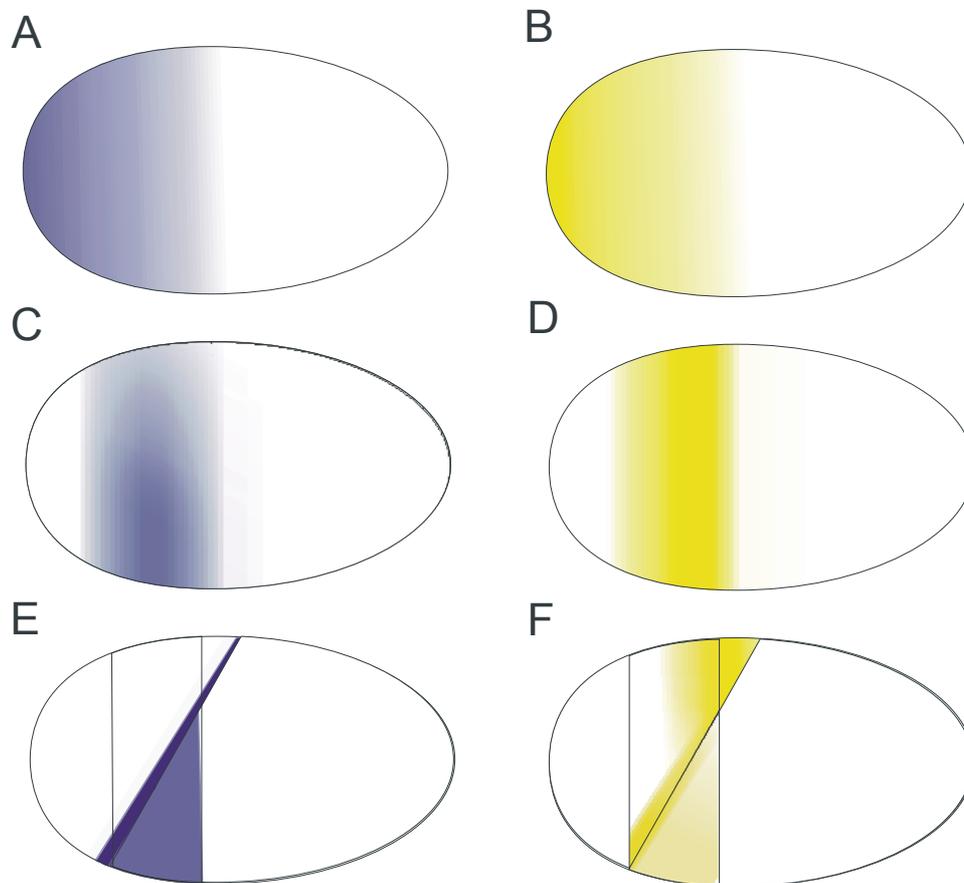


Abb. 49: Einfluß des anteroposterioren Musterbildungssystems auf die BMP-Expression im Blastoderm, vereinfacht: **A, B** dorsoventralsymmetrische Gradienten von *dpp* (violett) und *gbb* (gelb). **C, D** beide BMP ziehen sich auf eine Gapsen-artige Domäne zurück; bei *dpp* (**C**) wird der Einfluß ventraler Aktivatoren sichtbar. **E, F** nach der Differenzierung der Serosa unterliegen die BMP-Expressionen in Serosa und Embryo unterschiedlicher Kontrolle, in Kombination zeigen beide Expressionsmuster den Einfluß der AP-Systems.

4.1.3 Eine distinkte Zellpopulation zwischen Serosa und Embryo exprimiert *dpp*

Die ventrale Verbreiterung der *dpp*-Domäne liegt direkt vor dem *twi*-Streifen. Letzterer hat sich in dem Stadium, in dem sich Serosa- und Embryozellen gerade gut durch ihre unterschiedlichen Durchmesser und den DNA-Gehalt ihrer Kerne differenzieren lassen, bereits etwas von anterior zurückgezogen (Handel et al., 2005). Betrachtet man Details der Bisbenzimid-Kernfärbung an dieser Stelle, so lassen sich insgesamt drei distinkte Zellpopulationen unterscheiden (Abb. 7g, h; Abb. 8a-f): anterior, große polyploide Serosazellen; posterior, Zellen des Embryo sensu stricto, und drittens eine intermediäre

Zellpopulation, die einen geringeren Zelldurchmesser aufweist als die Serosazellen und möglicherweise auch einen niedrigeren DNA-Gehalt. Die Zellen des eigentlichen embryonalen Epithels sind noch kleiner und ihre Kerne wesentlich dichter gepackt. Während in der gesamten Fläche des embryonalen Epithels Mitosen nachzuweisen sind, finden sich in der intermediären Zellpopulation zu diesem Zeitpunkt keine Mitosen. Diesen Befunden nach nehmen diese Zellen die gesamte Fläche der medianen Einbuchtung zwischen den Kopflappen ein, und ziehen sich als Zellreihe entlang der Serosa-Embryo-Grenze nach dorsal. Auch *zen-1*-RNAi-Experimente weisen diese Zellen durch ektopische *twist*-Expression als distinkt von der Serosa aus (van der Zee et al., 2005).

Diese intermediären Zellen exprimieren *dpp* auf niedrigerem Niveau (posteriorer Teil der rautenförmigen Domäne), wobei das Maximum der *dpp*-Expression in Serosazellen (anteriorer Teil der rautenförmigen Domäne) liegt. Eine *gbb*-Expression läßt sich in den intermediären Zellen nicht nachweisen.

Es ist anzunehmen, daß es sich bei dieser zusammenhängenden Zellpopulation um die anteriore Amnionanlage handelt, da sie den Amnionmarker *Tc'pannier* exprimieren (Tc'GATAx, Berns, 2001; Kalscheuer, 2004; van der Zee et al., 2005). Damit kommt diesen Zellen eine Schlüsselrolle bei der Bildung des Serosafensters zu (Handel et al., 2000): Alle Zellen posterior der intermediären Zellen invaginieren, während sie selbst den "Schnürring" bilden oder in dessen unmittelbarer Nachbarschaft liegen.

4.1.4 Randliche Serosazellen exprimieren *dpp* und *gbb*

Die Determinierung von Serosaschicksalen erfolgt durch *zen-1* (van der Zee et al., 2005). Unmittelbar an der Grenze zum Embryo bzw. den intermediären Zellen liegt eine Reihe ausgezeichneter Serosazellen, die stark *dpp* und *gbb* exprimieren. Die *gbb*-Domäne läuft rings um die Serosa-Embryo-Grenze. Möglicherweise sind diese, den intermediären Zellen anterior benachbarten Serosazellen den *necklace*-Zellen von *Schistocerca* homolog. Diese exprimieren ebenfalls *zen* und *dpp* (Dearden et al., 2000; Dearden & Akam, 2001). Auch *necklace*-Zellen sind am Schluß des Serosafensters beteiligt und verbleiben danach in der Serosa (Dearden et al., 2000).

In *Tribolium* läßt sich an der Grenzlinie auf Seiten der Serosa auch aktivierte MAP-Kinase (Schoppmeier & Schröder, 2005) nachweisen. Der Amnionmarker *Tc'pannier* (van der Zee et al., 2005) wird in den unmittelbar benachbarten Zellen exprimiert und es erscheint gut möglich, daß das BMP-Signal aus den nahen Serosazellen diesen Faktor aktiviert.

4.1.5 *Dpp* spielt möglicherweise eine Rolle bei der Determinierung der anterioren Amnionanlage

In starken *dpp*-RNAi-Phänotypen bleibt die Serosa-Embryo-Grenze senkrecht zur AP-Achse orientiert. In Bisbenzimid-Färbungen läßt sich hier eine distinkte Population intermediärer Zellen nicht finden. Auch der Amnionmarker *pannier* wird in *dpp*-RNAi-Embryonen nicht exprimiert (van der Zee, in Vorb.).

Im Gegensatz zum *dpp*-knock down erlaubt knock down von *zen-1*, das an der Determination der Serosa zumindest beteiligt ist, noch die Ausbildung eines Keimrudiments von annähernd wildtypischer Gestalt (van der Zee et al., 2005). In diesen „big head“-Phänotypen ist die Serosa durch Amnion ersetzt und die Grenze des Embryos zu dem flächigen Amnion ist unscharf. Die in dieser Situation vermutlich ungestörte Funktion der BMP könnte die geeignete Positionierung der anterioren Amnionanlage (und damit in diesem Fall, die Grenzlinie zwischen Amnion und Embryo) kontrollieren.

Die keilförmige, anteroventrale *dpp*-Domäne determiniert möglicherweise unter der Kontrolle anteriorer und ventraler Faktoren die anteriore Amnionanlage. Da es in der *dpp*-Domäne intermediärer Zellen nicht zur Koexpression von *dpp* und *gbb* kommt, könnten hier vorwiegend Dpp-Homodimere die BMP-Funktion erfüllen, wenn die Umverteilung der BMP-Liganden durch Sog vornehmlich Dpp-Gbb-Heterodimere betrifft.

4.1.6 *Dpp* ist für die Determination dorsaler Anlagen im wachsenden Keimstreif erforderlich

Internalisierte Teile von *dpp*-RNAi-Keimstreifen sind röhrenförmig und zeigen dorsal geschlossene *wg*-Domänen auch in älteren Stadien, wenn sich die *wg*-Streifen im Wildtyp von den dorsalen Rändern des Keimstreifs zurückgezogen haben. Daher sind vermutlich alle dorsalen Schicksale deletiert und dementsprechend ist auch keine dorsale *gbb*-Domäne vorhanden. Eine *gbb*-in situ-Hybridisierung zeigt aber in den verbleibenden ventralen Anlagen ein Wildtyp-ähnliches Muster mit transversalen Streifen und einer ventralen Expression, die Mesektoderm und die mediale Säule des Neuroektoderms markiert. Diese Details könnten dahingehend interpretiert werden, daß *gbb* nicht direkt positiv durch *dpp* kontrolliert wird, andererseits könnte *dpp* in den Koexpressionszonen durchaus die *gbb*-Transkription aufrechterhalten.

Die *dpp*-Expression in dorsalen Anlagen innerhalb einer ubiquitären *gbb*-Expression verschiebt in diesen Zellen die reine Sekretion von Gbb-Homodimeren zur überwiegenden Sekretion von Dpp-Gbb-Heterodimeren (neben Dpp-Homodimeren), die dann als Morphogene dienen. Im Keimstreif-Stadium von *Tribolium* determiniert damit ähnlich wie bei *Drosophila*-Embryo die *dpp*-Expression (auch die des Amnions) dorsale Anlagen.

Neben *wg* und *gbb* zeigt auch die *twist*-in situ-Hybridisierung einen ungestörten Ablauf der Mesodermabfaltung und Mesodermmigration an. Die molekularen Marker zeigen damit einen Wiltyp-ähnlichen ventralen Anlagenplan und eine nahezu ungestörte ventrale Musterbildung durch die Wachstumszone an. Gleichzeitig wird deutlich, dass *dpp* sowohl für die dorsoventrale Musterbildung im Blastoderm, wie auch durch die Wachstumszone essentiell ist und die Funktionen von *gbb* und *dpp* hier nicht redundant sind. *Gbb* ist offenbar auch nicht hinreichend um Schicksale zu determinieren, die nicht den Hochpunkt, sondern eher intermediäre BMP-Aktivierung repräsentieren, wie etwa die dorsale Epidermisanlage.

Zusammenfassend gewinnt man anhand der Wildtypexpression und den *dpp*-RNAi-Phänotypen den Eindruck, dass *dpp* im Blastoderm-Stadium nicht nur einen dorsoventralen BMP-Aktivitäts-Gradienten etabliert (van der Zee, in Vorb.), sondern auch die Lage der Serosa-Embryo-Grenze bestimmt und damit sekundär auch Anlagen in einem dorsoventralen BMP-Aktivitätsgradienten positioniert. Daneben ist *dpp* essentiell für die Entstehung der anterioren Amnionanlage (einschließlich ihrer lateralen Teile). Offenbar transferiert *dpp* eine ventrale Asymmetrie (*dl*, *sog*) ins laterale und dorsale Ektoderm, sowie in die Amnionanlagen.

4.2 Das Amnion entsteht aus drei unterschiedlichen Anlagen

Das Amnionepithel über dem Keimstreif entsteht aus der anterioren Amnionanlage, die die Population *dpp*-exprimierender intermediärer Zellen umfaßt, sowie zwei posterioren Anlagen: der überwiegende Teil des „Daches“ über posteriorem Gnathum, Thorax und Wachstumszone, wird im Blastoderm als breiter Gürtel *pannier*-exprimierender Zellen zwischen Serosa-Embryo-Grenze und der dorsalen Lippe des posterior pit angelegt. Dieses Areal exprimiert kein *dpp* und zunächst auch kein *gbb*. Die zweite posteriore Anlage, die zur Bildung des Amnions über Wachstumszone beiträgt, sind die *dpp*-exprimierenden Zellen der dorsalen Lippe des posterior pit. Damit entsteht die *dpp*-Expression im Amnion aus zwei zunächst getrennten *dpp*-Domänen unterschiedlicher Herkunft. Die erste, die anteriore, ist die

im vorherigen Kapitel beschriebene *dpp*-Expression der anterioren Amnionanlagen und bleibt mit dem Serosafenster assoziiert. Die zweite geht auf die Expression im Rand des posterior pit zurück und breitet sich später vom Dach der Wachstumszone nach anterior aus. Erst kurz vor Schluß des Serosafensters vereinigen sich beide *dpp*-Domänen zu einer zusammenhängenden Amnionexpression. Die *dpp*-Expression im Amnion hat vermutlich zwei Funktionen, zum einen spezifiziert sie amniotische Anlagen und zum anderen trägt sie in einem frühen Keimstreifstadium durch langreichweitige Gradienten zur dorsoventralen Musterbildung im Ektoderm bei.

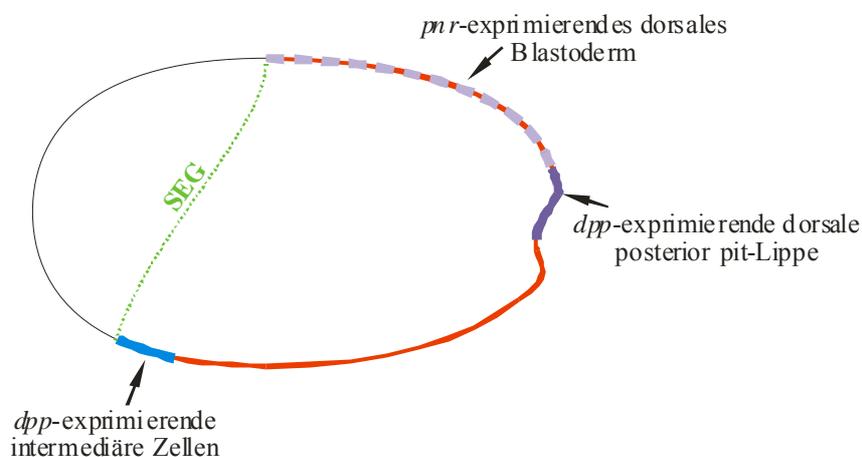


Abb. 50: Herkunft der Amnionanlagen im Blastoderm: *dpp*-exprimierende intermediäre Zellen zwischen Serosarand und eigentlichem Embryo bilden die „anteriore Amnionanlage“ des Blastodermstadiums. Eine breite, gürtelförmige *pannier*-Domäne enthält amniotische Schicksale und zieht sich bis in den Bereich des posterior pit (van der Zee et al., 2005). Die dorsale posterior pit-Lippe exprimiert neben *pnr* auch *dpp* und stellt die am weitesten posterior gelegene Amnionanlage dar. Sagittal.

4.2.1 Die anteriore Amnionanlage bedeckt den Vorderkopf und bildet das Serosafenster

Im Laufe der Einsenkung des Keimrudiments bleibt der anteriore, zur Serosa gehörige Teil der rautenförmigen *dpp*-Domäne auf der Oberfläche als *dpp*-exprimierendes Dreieck exponiert (Abb. 8g). Die *dpp*-exprimierenden intermediären Zellen der medianen Bucht gehen wie die weiter lateralen in die anteriore Amnionfalte ein. Daher läßt sich entlang des Randes des Serosafensters von Beginn an anterior und lateral eine lückenlose *dpp*-Expression nachweisen (Abb. 8h, i; Abb. 10), während sie posterior zunächst nur sehr unregelmäßig in einzelnen randlichen Zelle auftritt. Erst spät, wenn das Fenster schon eine kreisförmige Kontur hat und sich zu schließen beginnt, ist der Saum *dpp*-exprimierender Zellen auch

posterior geschlossen. Damit spiegeln die Expressionsverhältnisse hier ziemlich genau die *dpp*-Expression an der Serosa-Embryo-Grenzlinie wieder, die posterior auch schwächer bzw. lückenhaft ist.

Interessanterweise ist am Serosafenster auch aktivierte MAP-Kinase nachzuweisen (Schoppmeier & Schröder, 2005), die auch an der Serosa-Embryo-Grenze zu finden ist. Als weiterer molekulare Marker wird *hunchback* in diesem Muster exprimiert (Wolff et al., 1995). Eine nahezu identische Expression der Gene *zen*, *dpp* und *hb* findet sich in *Schistocerca* (Dearden & Akam, 2001). Insgesamt weisen diese Befunde diese Amnionzellen als Subpopulation aus, die über die morphogenetischen Bewegungen hinweg an der Serosa-Grenze verbleibt. Die *dpp*-Expression im anterioren Amnion scheint damit eine Einheit darzustellen, die der posterioren amniotischen *dpp*-Expression gegenübersteht. Bemerkenswert scheint, daß sich die *zen-2*-Expression ebenfalls auf den anterioren Teil des Amnions beschränkt, der auch in unmittelbarem Kontakt zur Serosa stand (van der Zee et al., 2005), also ebenfalls eine Unterteilung des Epithels markiert. Der BMP-Signalweg spielt in zwei ganz ähnlichen Prozessen der Fusion epithelialer Blätter eine Rolle: während des embryonalen Rückenschlusses und des imaginalen Thorax-Rückenschlusses von *Drosophila*. In beiden Prozessen kollaborieren JNK-Signalweg und *dpp*-Signalweg eng (Riesgo-Escovar & Hafen, 1997b; Scuderi & Letsou, 2005; Stronach & Perrimon, 2001), wobei beim weniger gut untersuchten thorakalen Rückenschluß der JNK-Signalweg offenbar die zelluläre Adhäsion reguliert und *dpp* die Organisation des Cytoskelets; eine direkte gegenseitige Regulation der beiden Signalwege scheint hier zu fehlen (Agnes et al., 1999; Martin-Blanco et al., 2000; Zeitlinger & Bohmann, 1999). Auch auf eine Beteiligung von *gbb* läßt sich aus genetischen Analysen schließen (Chen et al., 1998a).

Beim embryonalen Rückenschluß wird eine ausgezeichnete Zellreihe an der Grenze zur Amnioserosa determiniert, die „leading edge cells“ (LE). *Dpp* definiert hier eine kompetente Zone durch Aktivierung der Gene *hindsight* (*hnt*) und *u-shaped* (*ush*) (Stronach & Perrimon, 2001), ist aber seinerseits in den LE-Zellen wieder Targetgen von *pannier* (*pnr*) (Herranz & Morata, 2001) und *ush*. Der *dpp*-Signalweg steuert in einer späten Phase die Konstitution von Teilen des Cytoskelets der LE-Zellen und des unmittelbar angrenzenden dorsalen Ektoderms (Ricos et al., 1999; Riesgo-Escovar & Hafen, 1997a). Die Aktivierung von *zipper* (*zip*, Myosin II) durch *dpp* (Arquier et al., 2001) in LE-Zellen (Harden, 2002; Young et al., 1993) führt zur Ausbildung eines ringförmigen kontraktiven Filamentbündels in der LE-Zellreihe. Dieser Filamentring erzeugt einerseits die tangentialen Kräfte der Schnürbewegung (Jacinto et al., 2002; Kiehart et al., 2000) und ist zudem notwendig, um die

Integrität der randlichen Zellreihe zu wahren, indem er die Bewegung der LE einschränkt (Jacinto et al., 2002).

In *Tribolium* spielt *dpp* möglicherweise eine ganz ähnliche Rolle bei der frühen Bewegung der anterioren Amnionfalte und beim Schluß des Serosafensters. *Dpp* wird wie beschrieben auch hier sowohl in den Zellen in der „Lippe“ des Serosafensters exprimiert, wie auch in den umgebenden Serosazellen.

4.2.2 Mittlere Amnionbereiche entstehen aus *pannier*- exprimierenden Zellen des dorsalen Blastoderms

Die posteriore Amnionfalte findet ihren Ursprung in der dorsalen Lippe des posterior pit. Zwischen Serosa-Embryogrenze und der posterior pit-Lippe liegt ein breites Blastodermareal, das den Amnionmarker *Tc'pannier* exprimiert (van der Zee et al., 2005). Die posteriore Amnionfalte wird zum überwiegenden Teil aus Epithel dieses breiten, dorsalen Blastodermgürtels gebildet, das sich in seiner Zellmorphologie nicht von restlichen embryonalen Epithel unterscheidet. Es erstreckt sich über 25-30% des Eiumfanges zwischen der Serosa-Embryo-Grenze und dem Scheitel der Falte (mittlere Phase I in Handel et al., 2000). Im Zuge der Anatrepsis wird dieser Blastodermabschnitt eingefaltet und bildet somit das posteriore Keimrudimentdach. Es bedeckt damit vom hinteren Rand des Serosafensters ausgehend Maxillar- und Labialsegment, sowie das erste Thorakalsegment und den anterioren Teil der Wachstumszone. Die Gesamtheit, oder (wahrscheinlicher) Teile dieses dicken Epithels differenzieren sich später zu amniotischem Epithel. Dieser Differenzierungsprozess geht dann ebenfalls mit der Expression von *dpp* einher.

4.2.3 Das *dpp*-exprimierende Wachstumszonendach generiert Amnionepithel

Die Neuentstehung von Amnionepithel aus dem Wachstumszonendach könnte auf lokale Proliferation zurückgehen, oder auf Konvergenz und Migration von Zellen des Wachstumszonendachs. Dabei werden offenbar zunächst kuboidale Zellen in das Amnion über der Übergangszone verbracht, die sich mit größer werdender Distanz zur Wachstumszone zu Plattenepithel abflachen. Dabei kommt es nicht nur in transversaler Richtung zu einer Veränderung der Zellmorphologie (Handel et al., 2000) mit einer Abflachung von der medianen Zone her, sondern auch in anteroposteriorer Richtung (Abb. 31). Über der anterioren Wachstumszone liegt eine amniotische Übergangszone, in der

median gelegene Zellen sich stärker abflachen als laterale. Letztere werden hierdurch zum Keimstreifrand gedrängt. Insgesamt gesehen findet man jedoch weiter anterior zunehmend flachere Zellen. Das Epithel über Kopf und Gnathum bildet dabei das Extrem und zeichnet sich dadurch gegenüber dem durch die posteriore Amnionfalte gebildeten Amnion aus. *Dpp*-RNAi-Phänotypen, die möglicherweise auf eine verzögerte oder unvollständige *Dpp*-Depletion zurückgehen, könnten auf eine unmittelbare Funktion von *gbb* bei der Bildung des Amnions durch das Wachstumszonendach hindeuten: hier verliert sich die Bildung von Amnionepithel vollständig während der fortschreitenden Wachstumszonenaktivität (Abb. 19f).

4.2.4 Die *dpp*-Expression der Wachstumszone bildet durch anteriore Expansion eine zusammenhängende amniotische *dpp*-Domäne

Die in der dorsalen Lippe des posterior pit vorhandenen BMP-Expressionen gehen auf die terminale posteriore Kappe zurück, die sich zeitgleich mit der anterioren Kappe nachweisen läßt. Eine Expression im dorsalen Rand des posterior pit findet sich auch bei *Oncopeltus fasciatus* (Angelini & Kaufman, 2005). Die *dpp*-exprimierenden intermediären Zellen an der Serosa-Embryo-Grenze sind also zunächst durch die "*dpp*-freie" *pannier*-Domäne von der posterioren *dpp*-Domäne im Scheitel der Amnionfalte getrennt. Die Serosa-Embryogrenze überschreitet gerade erst den posterioren Pol, wenn die *dpp*-Domäne schon ins Innere verlagert ist. Die durch die Einstülpungsbewegung am posterior pit entstehende Kavität stellt die Wachstumszone des späteren Keimrudimentes und Keimstreifens dar. Mit dem Fortschreiten der Invagination embryonalen Gewebes an dieser Stelle wird die *dpp*-Expression stärker und nimmt bereits ihre grundlegende Form in der Wachstumszone an. Es handelt sich um zwei Längsstreifen in den lateralen Bereichen des posterior pit. Diese bilaterale Expression findet sich bald in Boden und Dach der prospektiven Wachstumszone. Das Muster bleibt in der Wachstumszone dann bis zum Stadium des ausgewachsenen Keimstreifs erhalten.

Die „Querverbindung“ zwischen diesen bilateralen Expressionen, die aus der dorsalen Lippe des posterior pit stammt, kommt dabei im Epithel über der anterioren Wachstumszone zu liegen (Übergangszone, Abb. 10c, e, f).

Diese *dpp*-Domäne dehnt sich in der weiteren Entwicklung nach anterior in das *pannier*-exprimierende Keimstreifdach (s.o.) bis zu den *dpp*-Expressionen am Serosafenster aus. Damit vereinigen sich anteriore und posteriore *dpp*-Expressionen im Amnion zu einer

zusammenhängenden amniotischen *dpp*-Domäne (vgl. Abb. 10e mit f). Weiterhin erreicht die amniotische *dpp*-Expression nun auch posterior des Serosafensters den Keimstreifrand (Abb. 10f).

Auf die *dpp*-Expression im Amnionepithel könnte der GATA-Transkriptionfaktor *pannier* (*pnr*) (Ramain et al., 1993; Winick et al., 1993) eine aktivierende Kontrolle ausüben. In *Drosophila* ist er zunächst von *dpp* kontrolliert (Ashe et al., 2000), wird aber in einer späteren Phase Aktivator der *dpp*-Expression in leading edge-Zellen und ist für den Rückenschluß wesentlich (Herranz & Morata, 2001). Die enge Beziehung der Expression des *Tribolium*-Orthologs von *pannier* (Berns, 2001; Kalscheuer, 2004) zur amniotischen Anlage zeigt sich schon im differenzierten Blastoderm an der Serosa-Embryo-Grenze (van der Zee et al., 2005) und bleibt bis zur Expression im Amnion stabil. Gerade im Bereich der Wachstumszone ähnelt sie sehr der *dpp*-Expression (Berns, 2001).

4.2.5 Dorsoventrale Musterbildung im Ektoderm durch amniotisches Dpp

In Keimrudiment und auswachsendem Keimstreif geht der ektodermalen, randlichen *dpp*-Expression grundsätzlich eine amniotische *dpp*-Expression voraus (Abb. 10, Abb. 11). Die amniotische *dpp*-Expression könnte damit zur dorsoventralen Musterbildung im Keimstreif beitragen, noch bevor *dpp* im dorsalen Ektoderm selbst exprimiert wird.

Vor Auftreten einer *dpp*-Expression im Rand des Keimstreifs zeigt sich bereits ein deutlicher Abstand des dorsalen Endes der *wg*-Streifen zum Keimstreifrand (Giorgianni, 2004). Die relativ starke Expression von *dpp* im Bereich des gnathalen Amnions macht eine Expression im Keimstreifrand zunächst überflüssig. Ein BMP-Signal aus dem Amnion könnte in dieser frühen Phase die Determination dorsaler Schicksale einleiten und durch Repression zu dem beobachteten Rückzug des Markers *wg* vom Keimstreifrand führen. Da die Initiation der Extremitätenanlage durch die Aktivierung einer *Dll*-Expression um das dorsale Ende des segmentalen *wg*-Streifens erfolgt, hätte amniotisches Dpp unter anderem eine wesentliche Rolle bei der Positionierung der Extremitätenanlagen (Modellvorstellung in Abb. 53). Die später einsetzende ektodermale *dpp*-Expression führt dann zu einer zentral in dieser *Dll*-Domäne gelegenen Koexpressionszone von *dpp* und *wg* (Giorgianni, 2004).

Im Gegensatz zur *Drosophila*-Imaginalscheibe, wo *dpp* und *gbb* weitgehend komplementär exprimiert werden (Khalsa et al., 1998), wird im Amnion von *Tribolium* durch die Koexpression beider BMP vermehrt eine Ligandenspezies mit anderen Eigenschaften sezerniert: Gbb-Dpp-Heterodimere. Befunde aus der Musterbildung der PCV (posterior

crossvein) bei der Entwicklung der Flügeläderung in *Drosophila* belegen die größere Reichweite des Gbb-Dpp-Heterodimeres verglichen mit dem *short range*-Effekt des Dpp-Homodimers bei der Entwicklung der Längsadern (Ralston & Blair, 2005; Shimmi et al., 2005b). Eine frühe Rolle amniotisch gebildeten BMP für die dorsoventrale Musterbildung im Keimstreif wäre daher mit den bekannten molekularen Mechanismen vereinbar.

Das Amnion trägt vermutlich auch in späteren Stadien noch zur dorsoventralen Musterbildung im Keimstreif bei. Da die Stärke der amniotischen *dpp*-Expression mit der Stärke der dorsalen *dpp*-Domäne des Ektoderms vergleichbar ist, sollte das Amnion neben der nur 2-3 Zellen breiten dorsalen *dpp*-Domäne des Ektoderms als starke Dpp-Quelle zu einem dorsoventralen BMP-Gradienten beitragen.

4.3 *Gbb* ist für Amniogenese und dorsoventrale Musterbildung in der Wachstumszone notwendig

In moderaten *gbb*-RNAi-Phänotypen treten als häufigste Defekte partiell dorsalisierte Segmente, sowie invaginierte Abdominalsegmente und eingeschnürte bzw. im Umfang reduzierte Abdominalsegmente auf. Invaginierte Abdominalsegmente können durch eine Reduktion des Amnions erklärt werden, wie sie in *gbb*-RNAi-Embryonen häufig auftritt. Die Amnionreduktion scheint auf eine gestörte Neubildung von Amnionepithel während der Segmentdifferenzierung in der Wachstumszone zurückzugehen. Partielle Dorsalisierung, umfangreduzierte Segmente und Amnionreduktion lassen sich jedoch auch durch einen veränderten Anlagenplan aufgrund gestörter Musterbildung in der Wachstumszone erklären.

Die stärksten *gbb*-RNAi-Phänotypen, die sich in der Kutikula-Analyse finden, stellen segmental aneinander gereihte Kutikulastrukturen dar, die sich keinem bestimmten Tagma zuordnen lassen, an denen sich jedoch meist dorsale Marker identifizieren lassen. Diesen "Seten-Bändern" dürften in jungen Stadien Embryonen mit dramatisch expandierten *dpp*-Expressionen entsprechen. Manche dieser Embryonen entwickeln vermutlich überhaupt keine Kutikulastrukturen.

4.3.1 *Gbb* unterdrückt ektopische *dpp*-Expression in der medialen Säule des Neuroektoderms

Eine große Klasse von *gbb*-RNAi-Larven mit im Umfang reduzierten posterioren Abdominalsegmenten und ektopischen Dorsalmarkern, repräsentiert Embryonen mit ektopischer *dpp*-Expression nahe der Ventralfurche. Damit kommt es in diesen Bereichen zu einer Dorsalisierung ventralen Ektoderms. Dabei kann der in der Regel größere Abstand der Dorsalmarker zur Mittellinie leicht durch die anomal starke Expression von *dpp* in der ektopischen Domäne begründet sein. Es ist anzunehmen, daß diese Phänotypen auch mit solchen Embryonen korrelieren, die nach *wg*-in situ-Hybridisierung eine weitgehende Reduktion der *wg*-Domäne in abdominalen Segmenten zeigen (Abb. 44c-d). Gleichzeitig verschieben sich durch diese zusätzlichen *dpp*-Expressionen die Dpp-Gradienten über die Transversale des Keimstreifs so, daß nicht nur ventrale Schicksale deletiert werden, sondern evtl. auch laterale Schicksale, die durch intermediäre Dpp-Konzentrationen determiniert werden. Dies würde den geringeren Durchmesser der Segmente plausibel erklären. Eine

zusammenhängende ventrale *dpp*-Expression, ist in moderaten *gbb*-RNAi-Phänotypen, von denen man die Ausbildung einer Kutikula noch erwarten kann, ebenfalls auf die posterioren Abdominalsegmente beschränkt und damit in guter Korrelation mit der Kutikulaanalyse.

Die lateralen sackartigen Auswüchse in *gbb*-RNAi-Larven mit verjüngten Abdominalsegmenten (Abb. 34b, f), könnten auf eine Proliferationsreaktion lateralen Ektoderms aufgrund ektopischer *dpp*-Expression im Bereich der Trachealplakoden zurückgehen. Im Wildtyp sind schwache segmentale *dpp*-Expressionen mit der Anlage der Trachealplakoden assoziiert (Abb. 48a, f). Bei Ausfall negativer Regulation durch *gbb* könnte sich diese *dpp*-Domäne verstärken oder expandieren. Anomalitäten an Tracheenöffnungen sind häufig mit solchen Auswüchsen assoziiert.

Mediale ektopische *dpp*-Expressionen beschränken sich häufig auf das Mesektoderm und die unmittelbar angrenzende mediale Säule des Neuroektoderms. Offenbar reprimiert *gbb* die *dpp*-Expression in diesen Geweben, in denen möglicherweise ein ventral exprimierter Faktor die Aktivierung der *dpp*-Transkription erleichtert. Obwohl Mesektoderm und Neuroektoderm die für ektopische *dpp*-Expression anfälligsten Anlagen sind, zeigt das Kontinuum an embryonalen Phänotypen, daß bei stärkerem *gbb*-knock down zusätzlich auch ektopische Expressionen im lateralen Neuroektoderm auftreten. Offenbar ist die Inhibition der *dpp*-Expression durch *gbb* in den meisten Anlagen des Keimstreifs notwendig. Eine *gbb*-Expression in *dpp*-freien Arealen und eine kontextabhängig antagonistische Beziehung zwischen diesen beiden BMP-Liganden ist auch bei der Entwicklung der Flügelimaginalscheibe und den pupalen Flügelanlagen von *Drosophila* bekannt (Bang & Wharton, 2003; Soares & Wharton, 2005). Auch die zeitliche Dynamik der *gbb*-Wildtyp-Expression in *Tribolium*, wobei *gbb* in Mesektoderm und Neuroektoderm am längsten persistiert, deutet auf die negativ regulierende Funktion von *gbb*.

4.3.2 Starke *gbb*-RNAi-Phänotypen liefern Hinweise auf eine Selbstaktivierung der *dpp*-Expression

In starken *gbb*-RNAi-Phänotypen zeigen sich Expansionen der dorsalen *dpp*-Domäne, sowie Expansionen, die von der oben beschriebenen medialen ektopischen *dpp*-Expression ausgehen, entlang der segmentalen Falten. Hier bilden sich auch Inzisionen, sodaß die Segmente nur nahe der Mittellinie miteinander verbunden sind. Solche extrem starken Phänotypen dürften lediglich vereinzelt Kutikulastrukturen ausbilden oder höchstens ein zusammenhängendes Setae-Band. Dieser Phänotyp stellt immerhin etwa ein Zehntel der *gbb*-RNAi-Embryonen.

Dpp-in situ-Hybridisierungen in diesen „Expansionsphänotypen“ der *gbb*-RNAi-Embryonen zeigen klar, daß beim *gbb*-knock down *dpp*-Expressionen eine starke Präferenz haben, sich in solche Bereiche auszudehnen, in denen im Wildtyp die späten *gbb*-Expressionen persistieren. In den Arealen in der Fläche der Hemisegmente, die bereits frühzeitig von *gbb*-Expression freigegeben werden, finden sich weitaus seltener ektopische *dpp*-Expressionen, was auch die Tendenz zur Streifenbildung erklärt.

Die Expansion einer bereits bestehenden *dpp*-Expression in das unmittelbar benachbarte Gewebe und die scharfe „on/off-Grenze“ der ektopischen Domänen weist auf eine Selbstaktivierung der *dpp*-Expression hin. *Gbb* könnte diese positive Rückkopplungsschleife negativ regulieren.

4.3.3 Die dorsale ektodermale *dpp*-Domäne könnte aus einer Autoaktivierung aus dem Amnion resultieren

Die Etablierung einer dorsalen ektodermalen *dpp*-Domäne geschieht zuerst im Gnathum, das an die *dpp*-exprimierenden Amnionzellen um das Serosafenster grenzt, und erfaßt dann sukzessive die thorakalen bzw. durch die Wachstumszone neu gebildeten Segmente. Diese Segmente grenzen unmittelbar an die *dpp*-Expression des Wachstumszonendaches, die anterior der Übergangszone bis zum Keimstreifrand reicht (Abb. 11f).

Damit schließt sich die amniotische *dpp*-Expression auf die gesamte Länge unmittelbar an den Keimstreifrand an und geht dort, wo die dorsale ektodermale *dpp*-Domäne bereits etabliert ist, lückenlos in diese über. Lediglich die Flanken der Wachstumszone bleiben frei von *dpp*-Expression.

Ein plausibler Mechanismus für die Etablierung einer *dpp*-Expression im Ektoderm ist das Übergreifen der amniotischen *dpp*-Domäne auf den Keimstreifrand durch Autoaktivierung. Eine solche positive feedback-Schleife wurde für *dpp* in *Drosophila* gezeigt (Biehs et al., 1996; Yu et al., 1996) und wird dort durch Inhibition durch *sog* und Repression durch *brinker* kontrolliert (Jazwinska et al., 1999b).

In *Tribolium* liefern die mannigfaltigen ektopischen *dpp*-Expressionen in *gbb*-RNAi-Phänotypen Hinweise auf eine solche positive feedback-Kontrolle. Hierbei könnte das von Zellen an der Außengrenze der *dpp*-Domäne sezernierte Dpp die *dpp*-Transkription innerhalb seiner Reichweite initiieren und damit zu einer Expansion der Domäne in den Rand des Ektoderms führen. Eine solche invasive Ausbreitung der *bmp4/swirl*-Domäne ist in *Xenopus laevis* und *Danio rerio* bekannt (Fainsod et al., 1994; Hammerschmidt et al., 1996; Nguyen et

al., 1998b) und wird dort durch die eingrenzende Aktivität von Antagonisten auf unterschiedlicher Ebene kontrolliert. Es könnte sich hierbei um einen über die Vertebraten hinaus phylogenetisch konservierten Mechanismus der dorsoventralen Musterbildung handeln.

Auch das zeitliche und räumliche Zusammenfallen des Rückzugs der *gbb*-Expression (Stadium der Differenzierung des ersten Abdominalsegments) und der Etablierung der dorsalen *dpp*-Domäne kann dahingehend interpretiert werden, daß Gbb aus ektodermaler Quelle die *dpp*-Transkription negativ reguliert. Dies könnte durch Besetzung von BMP-Rezeptoren und evtl. durch differentielle Aktivierung des Signalweges geschehen, möglicherweise jedoch nur in dem Maße, wie es die Autoaktivierung von *dpp* kompensiert und damit gewissermaßen die Ausbreitung der *dpp*-Expression dämpft. Der Rückzug der *gbb*-Expression beginnt im Gnathum, wenn dort ektodermale Zellen *dpp* zu exprimieren beginnen. Die Linie, entlang welcher die *gbb*-vermittelte Inhibition den Autoaktivierungsprozeß gerade noch zuläßt, scheint dort vom amniotischen ins ektodermale Epithel verschoben zu werden.

Gbb-RNAi-Embryonen zeigen häufig in ein und demselben Individuum eine Expansion von *dpp*-Domänen und gleichzeitig in anderen Segmenten, eine Reduktion des Amnions und damit einhergehend, eine schwächere oder sogar eine gänzlich fehlende dorsale *dpp*-Expression. Es kann nicht unterschieden werden, ob *gbb* nur indirekt über die Amnionbildung involviert ist oder direkt an der Aktivierung der dorsalen *dpp*-Transkription.

4.3.4 *Gbb* ist für Bildung bzw. Differenzierung posteriorer Amnionepithels durch die Wachstumszone erforderlich

Die größte Klasse von *gbb*-RNAi-Phänotypen zeigt eine Invagination posteriorer abdominaler Segmente, die durch eine partielle oder vollständige Reduktion des Amnionepithels verursacht werden könnte. Bei Katatrepsis und Rückenschluß des Embryos fusioniert das Amnionepithel mit der Serosa, wobei das im anterioren Amnion exprimierte *zen-2* eine Schlüsselfunktion spielt. Der erste Kontakt zwischen Amnion und Serosa erfolgt im Bereich der *zen-2*-Domäne. Danach wandert die Kontaktlinie nach dorsal und zieht die Epidermis mit sich bis zum vollständigen Rückenschluß (van der Zee et al., 2005). Durch *dpp*-in situ Hybridisierung läßt sich in *Gbb*-RNAi-Embryonen der Verlust dorsaler Schicksale zeigen, dies betrifft das Amnion, und zum Teil auch die dorsale epidermale *dpp*-Domäne. Das Fehlen des abdominalen Amnions in diesen Embryonen, weist im Vergleich mit den Kutikula-Phänotypen auf seine Funktion beim Rückenschluß des Abdomens hin.

gbb-RNAi-Embryonen wachsen häufig ab dem ersten Segment, mit reduziertem Amnion, in den Dotter ein. Zu einem ausreichenden Serosakontakt, der eine Ablösung verhindert, genügt offensichtlich ein sehr schmaler Amnionstreifen von ein bis zwei Zellbreiten, wie er auch im gestreckten Keimstreif des Wildtyps zu finden ist. In einigen Individuen deutet die *twist*-in situ-Hybridisierung auf einen segmentweisen Verlust von Amnion, nur dort bilden die metameren Mesodermblöcke geschlossene Ringe um den ektodermalen Schlauch. Da es Individuen gibt, in denen die nachfolgenden Segmente Amnion tragen und dennoch in den Dotter eingewachsen sind, erscheint es plausibel, daß auch ein Verlust des Amnion-Serosa-Kontaktes über nur 1-2 Segmente zu einem Einwachsen in den Dotter führen kann. Durch den Mechanismus des Rückenschlusses würden alle posterior gelegenen Segmente invertiert und invaginiert, unabhängig davon, ob sie ein Amnion ausbilden oder nicht, sofern der posteriore Amnion-tragende Teil keine Kontakt zu Serosa erlangen kann.

Die proliferationsfördernde Funktion in den Imaginalscheiben bedingt den prominentesten hypomorphen *gbb*-Phänotyp in *Drosophila* (Khalsa et al., 1998). Auch in *Tribolium* legt die Amnionreduktion nach *gbb*-knock down eine Funktion von *gbb* bei Neubildung von Amnionepithel nahe. Da der Ablauf der Amniogenese bei *Tribolium* jedoch nicht geklärt ist, könnte dies sowohl die Kontrolle der Zellproliferation, der Migration bzw. der Zellmorphologie betreffen. Obwohl *gbb* auch in späteren Stadien im Amnion ubiquitär exprimiert ist, zeigt sich eine Unterteilung des Amnions bezüglich der *gbb*-Funktion. Die Wildtypexpression von *zen-2* bestätigt eine solche anteroposteriore Unterteilung, wobei die Grenze über dem Thorax liegt (van der Zee et al., 2005). In *gbb*-RNAi-Phänotypen sind regelmäßig nur Segmente posterior von A3 betroffen. Dies läßt sich möglicherweise dadurch erklären, daß blastodermal angelegte Amnionanlagen durch konvergente Extension zumindest für die Segmente T2 bis A3 Amnionfläche zur Verfügung stellen können oder/und für die Bildung des Amnionepithels über diesen Segmenten zunächst keine *gbb*-Funktion nötig ist. Im überwiegenden Teil der Embryonen und der *gbb*-RNAi-Kutikulae kommt es jedoch nur zu einer partiellen Reduktion des Amnions. In Embryonen in denen auch das Amnion der Wachstumszone bzw. der Segmente A9, A10 reduziert ist, klappt der terminale Teil auf den Keimstreif zurück (Abb. 461-n). Bei direktem Vergleich von *gbb* versus *zen-2*-knock down wird klar, daß *zen-2* eine unmittelbare Funktion bei der Fusion von Serosa und Amnion besitzt und der knock down daher zu vollständigen inside-out-Phänotypen führt (van der Zee et al., 2005).

Gbb hingegen hat möglicherweise lediglich eine Funktion in der Verlängerung des Amnions durch die Wachstumszone, dementsprechend kompromittiert *gbb*-knock down nur posteriore Amnionbereiche.

4.3.5 Ist *gbb* für dorsale Schicksale in der Wachstumszone notwendig?

In *gbb*-RNAi-Embryonen bleibt durch den Verlust äußerst dorsaler, amniotischer Schicksale ein röhrenförmiger Keimstreif mit einer dicken und unpaaren Epidermisanlage zurück. In vielen Fällen kommt es jedoch zusätzlich zu segmentalen Unterbrechungen der epidermalen *dpp*-Domäne, da an diesen Stellen offenbar die Etablierung einer dorsalen *dpp*-Domäne zu unterbleiben scheint (Abb. 45c, e & f).

Am häufigsten werden also amniotische Schicksale deletiert, die den Hochpunkt der BMP-Signalaktivierung repräsentieren, darüberhinaus aber auch dorsale Epidermisanlagen, die in Bereichen intermediärer BMP-Aktivierung liegen. Dies weist auf eine Funktion von *gbb* bei der Etablierung eines BMP-Aktivierungsgradienten in der Wachstumszone hin.

Gbb könnte als Ko-Ligand von *Dpp* fungieren (kovalent verbundenes Heterodimer) und ähnlich wie *Screw* im *Drosophila*-Embryo durch eine höhere Affinität des Heterodimers zu *Sog* die Mobilität der BMP-Liganden fördern. Eine ähnliche Funktion erfüllt *gbb* auch bei der Differenzierung des Flügeladersystems in *Drosophila*. Damit würde es in *Tribolium* zusammen mit *Sog* die Steilheit des dorsoventralen Gradienten bedingen und Anlagen wären nach dorsal zunehmend *gbb*-abhängig. Gleichzeitig ist aus *Drosophila* bekannt, daß sowohl *Scw*-*Dpp*-Heterodimere, wie auch *Gbb*-*Dpp*-Heterodimere die Signaltransduktion effektiver aktivieren als die jeweiligen Homodimere. Ein zu schwaches BMP-Signal in der dorsalen Epidermisanlage würde dann bei stärkerem *gbb*-knock down ein Ausbleiben der *dpp*-Selbstaktivierung verursachen.

Sollte *gbb* sowohl als Ko-Ligand die Musterbildung beeinflussen, wie auch die *dpp*-Expansion inhibieren, würde es möglicherweise Eigenschaften von *scw* und *brk* in einem Faktor vereinen. Dies ist von besonderem Interesse, da die Klonierung eines *Tribolium-brinker*-Orthologs trotz dahingehender Anstrengungen, bisher noch nicht gelungen ist (S. Roth, unveröff. Daten).

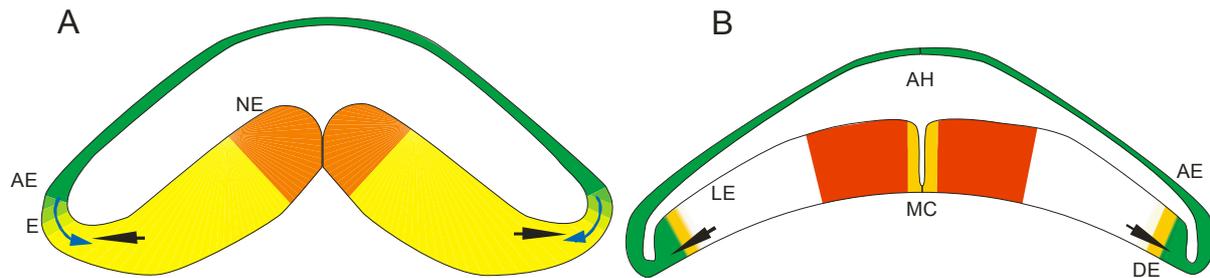


Abb. 51: Expressionsdomänen und Transportvorgänge bei der Etablierung der dorsalen *dpp*-Domäne: **A**, junger Keimstreif vor ektodermaler *dpp*-Expression: das Amnion dient als BMP-Quelle, Ausbreitung der *dpp*-Domäne zum Ektodermrand durch Selbstaktivierung (blaue Pfeile), komplexe BMP-Heterodimere werden in Gegenrichtung transportiert (schwarze Pfeile). **B**, Keimstreif nach Differenzierung von A1, anteriores Segment, Rückzug der *gbb*-Expression auf persistierende Domänen (Rand der *dpp*-Domäne und mediale Säule des Neuroektoderms), Transport komplexer Liganden gegen die Quelle (Pfeile); dorsale *dpp*-Domäne im dorsalen Ektoderm, „nested expression“ von *dpp*- und *gbb*. Die Situationen in A und B unterscheiden sich durch die Lage des Punktes in dem Diffusionsgleichgewicht sind. AE, Amnionepithel; AH, Amnionhöhle; E, Ektoderm; DE, dorsales Ektoderm; LE, laterales Ektoderm; NE Neuroektoderm; MC, mediale Säule des Neuroektoderms und „midline cells“. grün, Koexpression von *dpp* und *gbb*; gelb, *gbb*; orange, Koexpression von *sog* und *gbb*; rot, Expression von *sog* (in A nach Kalscheuer, 2004, in B hypothetisch).

4.3.6 Modell zur dorsoventralen Musterbildung in *Tribolium* entsprechend dem *Drosophila*-Paradigma

Die in dieser Arbeit gewonnenen Daten lassen sich für *Tribolium* wie folgt zusammenfassen: *Dpp* und *gbb* sind für die Musterbildung in dorsalen Anlagen notwendig, während die ventralen Schicksale primär unabhängig von *dpp* angelegt werden. *Gbb* unterliegt nicht der Kontrolle durch *dpp*, inhibiert aber seinerseits kontextabhängig die *dpp*-Expression. *Dpp*-Expressionen neigen potentiell zur Expansion (z.B. bei *gbb*-knock down), was auf eine Selbstaktivierung der *dpp*-Expression durch positive Rückkopplung schließen lässt. *Gbb* ist jedoch zumindest indirekt an der Etablierung der dorsalen *dpp*-Domäne beteiligt. Die amniotische Expression geht ektodermaler Expression zeitlich voraus und breitet sich möglicherweise von dort erst sekundär durch Selbstaktivierung in den ektodermalen Keimstreifrand aus. ebenso wie die *dpp*-Expression des Wachstumszonendaches erst über differenzierenden Segmenten in den Keimstreifrand expandiert. Da im Amnion *dpp* und *gbb* stark exprimiert werden, sezerniert es alle drei Spezies dimerer Liganden.

Die funktionellen Ähnlichkeiten des Scw-Dpp-Sog-Tsg/Tld-Systems im *Drosophila*-Embryo und des Gbb-Dpp-Sog-Cv/Cv-2/Tlr-Systems in der Entwicklung der *Drosophila*-Flügeläderung (Ralston & Blair, 2005; Shimmi et al., 2005a) lassen eine weitere Verbreitung solcher Mechanismen vermuten. Wegen der ähnlichen Einbindung der Ko-Liganden Screw und Gbb in diese Systeme erscheint auch – unter gewissen Vorbehalten – die Übertragung

wesentlicher Aspekte des Scw-Dpp-Systems des *Drosophila*-Embryos auf den *Tribolium*-Keimstreif möglich. Eine posttranslationale und, über den *dpp*-feedback-Mechanismus, auch transkriptionelle Repression von *dpp* durch *sog* in *Tribolium* wurde schon durch Kalscheuer (Kalscheuer, 2004) postuliert. Das hier vorgeschlagene Modell beruht damit im Wesentlichen auf Analogiebetrachtungen zu den Verhältnissen in *Drosophila*, die in der Einleitung ausführlich dargestellt wurden. Insbesondere die unterschiedlichen Transporteigenschaften und Aktivierungseigenschaften homodimerer und heterodimerer Liganden und die Rolle BMP-bindender Proteine sind in *Drosophila* gut untersucht, und als essentiell für die dorsoventrale Musterbildung erkannt worden. Während die nach dorsal transportierten Heterodimere die Amnioserosa determinieren wird in *Drosophila* die BMP-Signaltransduktion im dorsalen Ektoderm vornehmlich durch Scw- und Dpp-Homodimere aktiviert (Dorfman & Shilo, 2001).

In *gbb*-RNAi-Embryonen fehlen in den durch Wachstum gebildeten Segmenten, die äußerst dorsalen Schicksale (Amnion und dorsale Epidermis), also solche, die in der Wachstumszone durch den Hochpunkt der BMP-Signalaktivität determiniert werden. Ein BMP-Transportsystem mit den Eigenschaften des Sog-Tsg/Tld-Systems von *Drosophila* könnte diesen *gbb*-knock down-Phänotyp erklären. Das ventral exprimierte Transportprotein Sog transportiert dabei wegen unterschiedlicher Bindungsaffinitäten BMP-Liganden auch unterschiedlich effizient nach dorsal (Ashe, 2005; Shimmi et al., 2005c). Heterodimere, die die stärkste Signalaktivierung bewirken werden auch am effektivsten transportiert und definieren dorsal den Hochpunkt der Signalaktivität.

Als Folge davon würde am Rand der Koexpressionsdomäne von *dpp* und *gbb* (Rand des Amnion bzw. dorsale Epidermisanlage) und im Neuroektoderm die Heterodimerkonzentration und damit die Aktivierung nach ventral zunehmend geringer. Gleichzeitig liegen die schlechter transportierten Homodimere beider BMP zunehmend als Liganden vor. Von den Homodimeren tragen *dpp*-Homodimere vermutlich am Tiefpunkt noch zur Aktivierung des BMP-Signalweges bei.

Die durch die Expansion von *dpp*-Domänen in *gbb*-RNAi-Phänotypen nahegelegte inhibitorische Funktion von *gbb* (im Unterschied zum schwach agonistisch wirkenden *screw*) wird vermutlich durch ventral sezernierte Gbb-Homodimere vermittelt. Dieser Effekt überlagert sich mit der ventral zunehmenden Sog-Konzentration (van der Zee et al., 2006 in Vorb.).

Die "Expansionsphänotypen" der *gbb*-RNAi-Embryonen weisen auch auf eine Selbstaktivierung der *dpp*-Expression hin. Dieser Mechanismus wurde auch herangezogen um

in *Tribolium*-Wildtyp-Embryonen die kontrollierte Ausbreitung der *dpp*-Domäne vom Amnion in die angrenzende dorsale Epidermisdomäne zu erklären. Die Kontrolle dieser Expansion, geschieht möglicherweise über das Entfernen von stark aktivierenden Dpp-Gbb-Heterodimeren aus randlichen Bereichen. Die Außengrenze der *dpp*-Expression könnte dann dem Punkt entsprechen, in dem die Diffusion von Heterodimeren nach ventral und ihr Rücktransport ins Amnion durch Sog im Gleichgewicht sind. Die Etablierung der "dorsalen *dpp*-Domäne" würde einer Verlagerung dieses Gleichgewichtspunktes ins dorsale Ektoderm entsprechen.

Bei invasiver Ausbreitung der *dpp*-Domänen ins Ektoderm in *gbb*-RNAi-Embryonen versagt dieser Mechanismus, weil *dpp*-Homodimere in abnorm hoher Konzentration vorliegen (Dpp wird nicht als Dpp-Gbb-Heterodimer sezerniert) und zusätzlich schlechter aus Randbereichen der Expression wegtransportiert werden. Weiterhin fehlen inhibitorische Gbb-Homodimere. Unter diesen Bedingungen aktivieren möglicherweise auch Dpp-Homodimere die positive feedback-Kontrolle der Transkription.

Die Etablierung der dorsalen *dpp*-Domäne im *Tribolium*-Keimstreif geht mit dem Rückzug der *gbb*-Expression einher und die dorsalen Domänen von *dpp* und *gbb* liegen zumindest transient geschachtelt vor. Ein schmaler Streifen reiner *gbb*-Expression könnte daher das laterale Ektoderm gewissermaßen von *dpp*-Selbstaktivierung abschirmen. Denkbar scheint eine kompetitive Bindung der *gbb*-Homodimere an die Rezeptoren. Neben *tkv* (van der Zee, in Vorb.) existiert vermutlich auch *sax* in *Tribolium*. Auch in *Drosophila* ist die genaue Beteiligung der Typ-I-Rezeptoren Saxophone und Thickveins an der BMP-Signalübertragung noch unklar. Allgemeine Akzeptanz findet die Vorstellung, daß es sowohl im Dpp/Gbb- wie im Dpp/Scw-System zur Bildung von heterotetrameren Rezeptorkomplexen Tkv-Put-Put-Sax kommt, die synergistisch eine stärkere Signaltransduktion bewirken (put – punt, Typ-II-Rezeptor) (Haerry et al., 1998; Neul & Ferguson, 1998). Darüber hinaus ist belegt, daß ein Tkv-Put-Put-Tkv-Komplex prinzipiell ein Dpp-Signal weiterleiten kann (Neul & Ferguson, 1998), wenn auch weniger effektiv. Unter der Annahme einer qualitativ ähnlichen Wechselwirkung der Rezeptoren wie in *Drosophila* könnte man sich vorstellen, daß die inhibierende Wirkung von Gbb-Homodimeren auf die *dpp*-Selbstaktivierung in *Tribolium* auf der hochaffinen Bindung (Haerry et al., 1998) an Sax beruht (nur niedrigaffin an Tkv). Sax würde dann in Sax-Put-Put-Sax-Komplexen gebunden, die überhaupt nicht oder ineffizient den Signalweg aktivieren und nicht für die Bildung von Sax-Put-Put-Tkv-Komplexen zur Verfügung stehen, die zur starken Aktivierung des Signalweges führen würden. In Anbetracht der Datenlage sind diese Vermutungen sehr spekulativ, erklären aber

die *gbb*-knock down-Effekte in *Tribolium* und stehen auch in Einklang mit Befunden aus Untersuchungen der Flügelimaginalscheibe von *Drosophila* (Bang & Wharton, 2004; Haerry et al., 1998; Ray & Wharton, 2001a). Dabei würden die Zonen reiner *gbb*-Expression als Barrieren fungieren. Die Annahme von „Barrieren“ ist nicht zwingend notwendig, dennoch fällt auf, daß alle *dpp*-Domänen in *Tribolium* von einem „Saum“ reiner *gbb*-Expression umgeben sind. Besonders die geschachtelte Expression der beiden BMP in den unterschiedlichsten Kontexten und Stadien der Embryogenese lassen diese Erklärung plausibel erscheinen.

In dieser Vorstellung wären in der Wildtypsituation vor allem Dpp-Gbb-Heterodimere für die Selbstaktivierung verantwortlich. Da BMP-Dimere, der jeweiligen BMP-Transkriptionsaktivität entsprechend, stöchiometrisch sezerniert werden, könnten bei *gbb*-knock down die nun in viel höherer Konzentration sezernierten Dpp-Homodimere entweder über zahlreiche Tkv-Put-Put-Tkv, oder trotz geringerer Affinität zu Saxophone über Tkv-Put-Put-Sax-Rezeptorkomplexe, die *dpp*-Transkription aktivieren.

4.3.7 Ist das *gbb-dpp*-System Teil eines autonomen Musterbildungssystems in der Wachstumszone?

In den geschachtelten Expressionen der beiden BMP könnte die *gbb*-Expression ebenso *dpp*-unabhängig aktiv bleiben, wie zu früheren Stadien oder wie in den transversalen und ventralen *gbb*-Domänen. Andererseits erscheint es plausibel, daß in den Koexpressionsdomänen *dpp* direkt durch positive Kontrolle die *gbb*-Transkription aufrecht erhält. Zusammen mit der gefundenen positiven Rückkopplung (Autoaktivierung) der *dpp*-Expression und ihrer negativen Regulation durch *gbb* lassen sich die Befunde als Aktivator-Inhibitor-Musterbildungssystem interpretieren (Abb. 52 oben). Sowohl *dpp* wie auch *gbb* werden in der posterioren Wachstumszone offensichtlich als paramediane Streifen exprimiert, die sich vom Boden in das Dach derselben erstrecken (Abb. 13i). Im dem Teil der Wachstumszone, in dem die BMP-Streifen bilateral auftreten sind sie durch die terminale *twist*-Domäne ("Endplatte") bzw. ventral durch die "inner layer" voneinander getrennt. Nimmt man an, daß *twist*-exprimierendes Gewebe und "inner layer" nicht Teile des Musterbildungssystems sind, so lassen sich sowohl die *dpp*- wie auch die *gbb*-Domänen im Querschnitt der Wachstumszone als zwei Expressionsmaxima auffassen (Abb. 10f; Abb. 11a, f, g; Abb. 13c, e): ein Ventrals und ein Dorsales.

Im Keimstreifen besitzt die *dpp*-Expression nur ein breites dorsales Maximum. Damit wird auch die vereinfachte Vorstellung zweier getrennter, „dorsaler *dpp*-Domänen“ den

Verhältnissen im Wildtyp nicht gerecht. Vielmehr handelt es sich um die Ränder einer einzigen zusammenhängenden dorsalen *dpp*-Domäne, die amniotische und ektodermale Anlagen einschließt (Abb. 11a, g; Abb. 12a-d, f). Es sind diese ektodermalen Ränder der *dpp*-Domäne, die in *gbb*-RNAi-Embryonen unter Deletion der dazwischenliegenden amniotischen Schicksale verschmelzen.

In einem vereinfachten Modell hätte das System die Tendenz mehr als ein Aktivitätsmaximum auszubilden, jedoch würde in differenzierenden Segmenten im Wildtyp die breite dorsale Domäne durch laterale Inhibition eine ventrale Expression unterdrücken. Diese laterale Inhibition ist offenbar *gbb*-abhängig. Bei Inhibitor-knock down in *gbb*-RNAi-Embryonen wird die Breite des normalen Aktivierungsgipfels reduziert und die äußerst dorsalen, amniotischen Schicksale werden deletiert, sodaß in *gbb*-RNAi-Embryonen die beiden „dorsalen *dpp*-Domänen“ des Keimstreifs zu einer einzigen, schmalen Domäne verschmelzen (Abb. 45a, e, f). Gleichzeitig scheint dann auch anterior der Wachstumszone ein zweites Aktivierungsmaximum in der Ventralfurche des Keimstreifs als ektopische, mediane *dpp*-Domäne (Abb. 32j; Abb. 41, Abb. 52 Mitte) erhalten zu bleiben.

Die *gbb*-Expression hat auch im Wildtyp-Keimstreif zwei Maxima: dorsal die amniotische *gbb*-Expression mit ihren ektodermalen Rändern (größtenteils Koexpressionzone mit *dpp*) und ventral die mediale Expression (keine *dpp*-Expression, Abb. 52 unten). Treten ektopische *dpp*-Expressionen in Mesektoderm und medialen Neuroektoderm der Wachstumszone auf, so erscheinen sie meist bilateralsymmetrisch. Die *gbb*-Wildtyp-Expression und die bilateralsymmetrisch-mediale Positionierung der ektopischen *dpp*-Domänen in *gbb*-RNAi-Embryonen sprechen eher gegen ein einfaches, autonomes und selbstregulierendes Musterbildungssystem mit ventralem Aktivierungsgipfel.

Dpp-RNAi-Embryonen haben auch in den durch Wachstum gebildeten Segmenten Wildtyp-ähnliche ventrale Anlagen und zeigen, daß die ventrale Musterbildung von Mesoderm, Mesektoderm und Neuroektoderm in der Wachstumszone unabhängig vom *dpp-gbb*-System verläuft. Außerdem zeigen *gbb*-in situ-Hybridisierungen in *dpp*-RNAi-Embryonen in den ventralisierten Keimstreifen wildtypische *gbb*-Domänen und belegen damit, daß dort die *gbb*-Expression primär von *dpp* unabhängig ist.

Die ventrale Expression von *gbb* als Inhibitor, scheint vielmehr durch das primäre ventrale Musterbildungssystem vorgegeben zu werden, das offenbar auch in der Wachstumszone das BMP-System hierarchisch kontrolliert. Nachgeordnete Teilprozesse erfolgen dann möglicherweise durch selbstregulierende Musterbildung, wobei der hypothetische Inhibitor aus mehreren Komponenten bestehen könnte, von denen Gbb nur eine

ist. Um einen Musterbildungsprozess mit lateraler Inhibition zu modellieren, würde die positive Kontrolle einer anderen Inhibitor Komponente durch *dpp* genügen. Gleichzeitig würde ein *gbb*-knock down in einem solchen System ein zweites Aktivatormaximum erzeugen.

In einem solchen komplexen System könnten *sog* und andere Faktoren gleichsinnig zu *gbb* wirken, wobei es auch hier von besonderer Bedeutung ist, daß *short range*- und *long range*-Effekte der Komponenten einander entgegengesetzt sein können, ähnlich wie dies bei *gbb* offenbar der Fall ist.

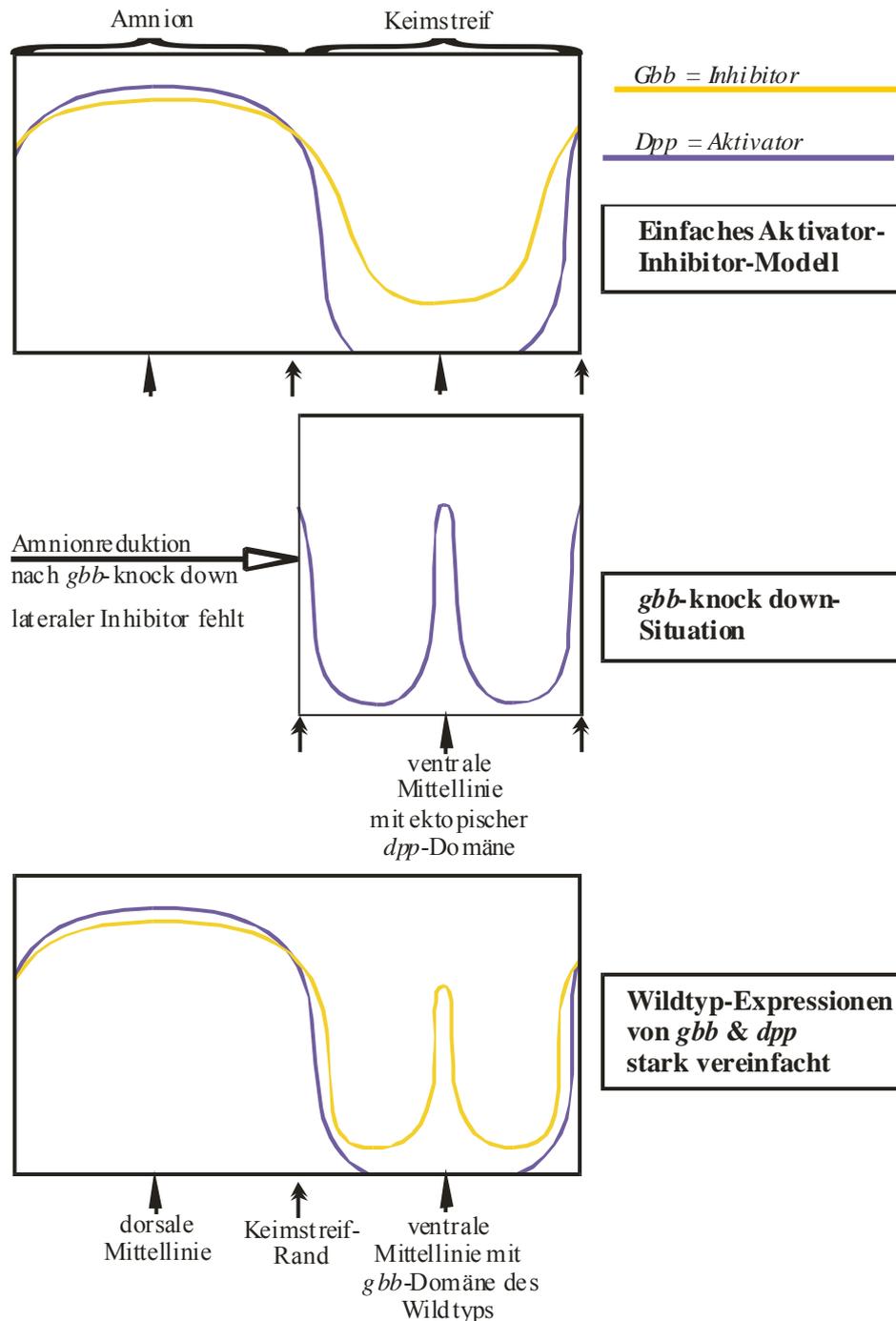


Abb. 52: Einfaches Aktivator-Inhibitor-Modell für die dorsoventrale Musterbildung durch die Wachstumszone (Details im Text) und die *gbb*- und *dpp*-Expressionen im Wildtyp (stark vereinfacht).

4.4 BMP-Funktionen in der Extremitätenentwicklung

4.4.1 Duplikation der proximodistalen Achse der Extremitäten in *gbb*-RNAi-Embryonen

In *gbb*-RNAi-Phänotypen mit distal duplizierten Beinen sind die Extremitäten regelmäßig so entwickelt, daß sich zwischen den Praetarsi zwei zusammenhängende, aber proximodistal korrekt ausgebildete Ventralseiten finden (Abb. 38). Auch die Biegung der Klauen sowie andere Kutikulamarker bestätigen die zumeist ungestörte Dorsoventralpolarität. Podomerteile, proximal des Verzweigungspunktes, zeigen eine gestörte dorsoventrale Musterbildung.

Die in *gbb*-RNAi-Phänotypen beobachtete Duplikation der Dorsalseite unter Aufspaltung der Proximodistalachse geht vermutlich auf ektopische *dpp*-Expressionen, aufgrund fehlender Inhibition durch Gbb zurück. Möglich sind dabei sowohl ektopische *dpp*-Expressionen im Bereich der Beinanlagen, wie auch ektopische *dpp*-Expressionen, die außerhalb der eigentlichen Beinanlage liegen und die dorsoventrale Musterbildung des Ektoderms großräumiger stören. Eine Konstellation mit ektopischer *dpp*-Domäne in der Beinanlage – also nach der Initiation – die so liegt, daß eine zweite Zone enger Nachbarschaft *dpp*- und *wg*-exprimierender Zellen erzeugt wird, ist prinzipiell denkbar.

Beindefekte, wie sie in *gbb*-RNAi-Embryonen gefunden werden, sind jedoch nur dann plausibel zu erklären, wenn mit der ektopischen *dpp*-Expression eine Repression bzw. Verdrängung der *wg*-Domäne angenommen wird, wie sie von ektopischen *dpp*-Expressionen ausgeht, die in der medialen Säule des Neuroektoderms von *gbb*-RNAi-Embryonen auftreten. Obwohl ektopische *dpp*-Domänen sehr unterschiedlicher Anzahl, Position und Größe in *gbb*-RNAi-Embryonen nachgewiesen werden können, werden vollständige ektopische Extremitäten, die Wildtyp-ähnlich an der Körperwand inserieren, nicht gefunden. Auch Verzweigungen in der Coxa konnten nicht gefunden werden. Beides könnte sich aber auch durch eine begrenzte Ausdehnung der Kompetenzzone erklären lassen.

Auffällig ist jedoch, daß sich ausschließlich Duplikationen finden, Triplikationen, auch von Teilen der Extremität, treten nicht auf. Ektopische *dpp*-Domänen können offenbar nicht beliebig durch Annähern oder Überlappen mit der *wg*-Expression innerhalb der *Dll*-Domäne neue Achsen erzeugen. Eine repressive Unterbrechung des *wg*-Streifen mit drei Endpunkten in der *Dll*-Domäne wird möglicherweise ebenfalls durch die begrenzte Ausdehnung der *Dll*-Domäne ausgeschlossen, indem die zugrundeliegenden Musterbildungsprozesse zwei zu nahe

benachbarte, distale Anlagen nicht zulassen bzw. unmittelbar wieder fusionieren lassen. Die Anzahl induzierbarer Achsen könnte aber auch durch die Zweizahl der freien Enden des *wg*-Streifens definiert werden.

Da sich durch *dpp*-in situ-Hybridisierung bereits in jungen Keimstreifen in der Initiationsphase der Extremitätenanlagen ektopische, ventrale *dpp*-Expressionen nachweisen lassen, geht möglicherweise ein Großteil der phänotypischen Veränderungen an Extremitäten auf Störungen in diesem frühen Stadium zurück. Der hypothetische Ablauf der Extremitäten-Initiation im *Tribolium*-Wildtyp und der Vorstellungen zur Entstehung der Extremitäten-Bifurkation in *gbb*-RNAi-Embryonen ist in Abb. 53 gezeigt. Wie bei den Verhältnissen des Wildtyps kann es wohl ausschließlich nach der Initiation zu einer Koexpressionszone von *dpp* und *wg* kommen, die dann die Extremitätenspitze(n) definiert. Offenbar reprimiert ventral exprimiertes Dpp die *wg*-Expression und erzeugt einen kurzen *wg*-Streifen variabler Länge, der an beiden Enden mit Dpp-Signal konfrontiert ist. Oft sind die *wg*-Domänen bis zu fleckenförmigen Expressionen in distaler Position reduziert. Im Extremfall fehlt die *wg*-Domäne. Ein Auswachsen der Anlage dürfte dann völlig unterbleiben.

Die Stärke des ektopischen Dpp-Signals definiert gleichzeitig zwei Größen: Erstens wie lange der *wg*-Streifen ist, und zweitens, wo die Position der niedrigsten Dpp-Konzentrationen zwischen normaler und ektopischer *dpp*-Domäne liegt, daher fällt die Position niedrigster Dpp-Konzentration häufig mit der *wg*-Streifenmitte zusammen. Damit wird die proximodistale Position des Verzweigungspunkts festgelegt und die proximalste Position, die eine Ventralseite besitzt. Alle davon proximal gelegenen Podomerteile sollten vollständig dorsalisiert sein, da sie Schicksale repräsentieren, die außerhalb einer bestimmten Schwellenkonzentration von Wg-Morphogen liegen.

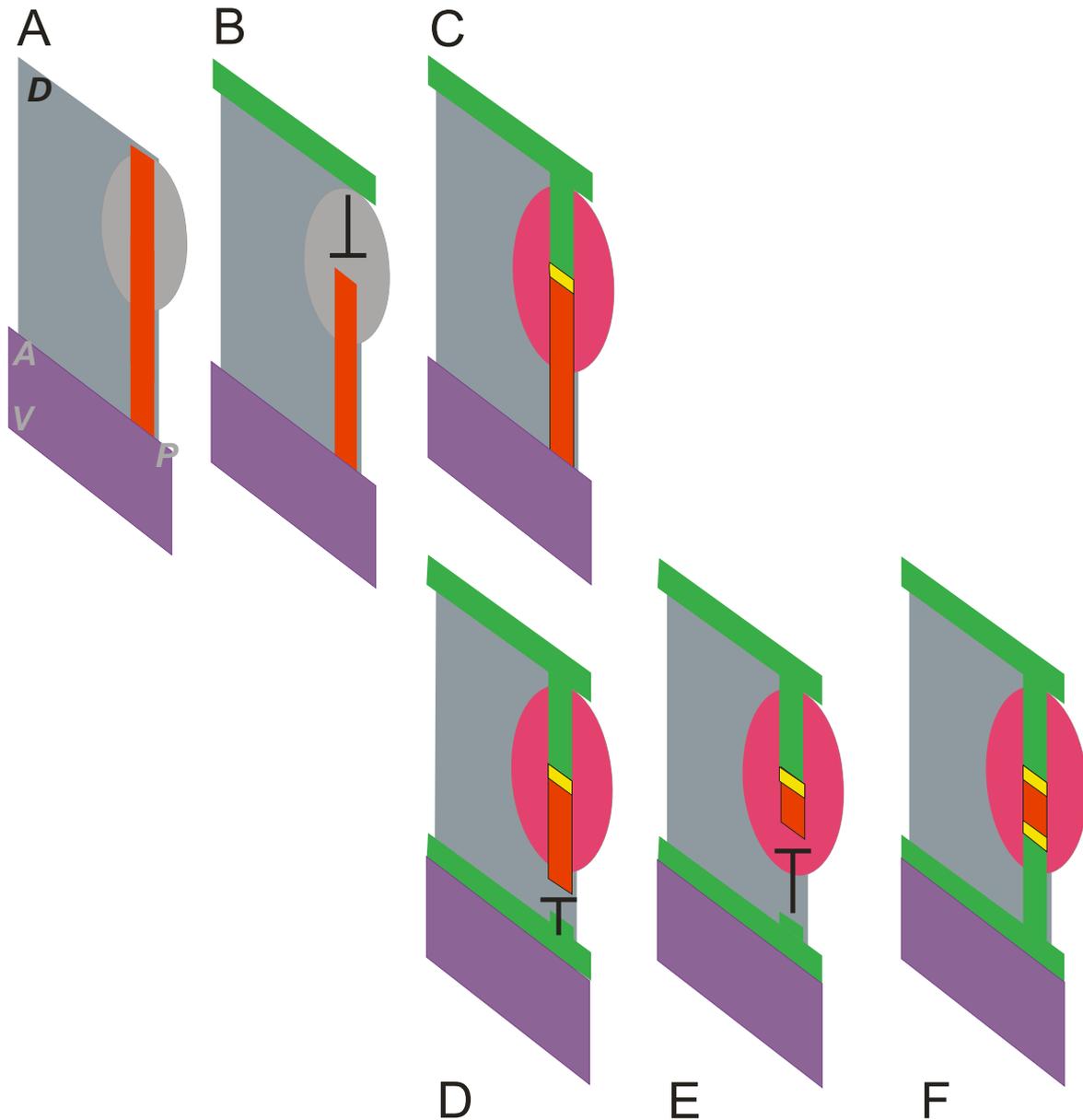


Abb. 53: Extremitäteninitiation und möglicher Verlauf der Bifurkation der PD-Achse in *gbb*-knockdown-Phänotypen (**A-C**, wildtypisch; **D-F**, *gbb*-knock down): **A**, *wg*-Streifen bis zum Ektoderm-Rand. **B**, Rückzug der *wg*-Streifen durch Repression von *wg* durch die amniotische und später ektodermale *dpp*-Expression. **C**, Ausdehnung der *dpp*-Expression entlang der Parasegmentgrenze nach ventral, Koexpression von *wg* und *dpp* in einer permissiven Zone, Expression von *Dll*. **D**, ektopische ventrale *dpp*-Expression reprimiert *wg* von ventral, keine Koexpression außerhalb der permissiven Zone. **E**, *dpp*-Repression drängt das *wg* Streifenende in die permissive Zone, **F**, Ausdehnung der ektopischen *dpp*-Expression entlang der Parasegmentgrenze, neben der normalen zusätzlich eine ektopische Koexpressionsdomäne in der permissiven Zone. rot, *wg*; violett, *sog*; grün, *dpp*; rosa, *Dll*; gelb, Koexpression von *dpp* und *wg*.

4.4.2 Ein BMP-Liganden-Transportsystem der dorsoventralen Musterbildung könnte bei der Etablierung der Proximodistal-Achse der Extremitätenanlagen mitwirken

Der Praetarsusphänotyp stellt den weitaus häufigsten Phänotyp bei *gbb*-RNAi-Larven dar. Er findet sich auch in sonst vollständig wildtypischen Individuen und zeigt lediglich die Verschiebung der Endklaue nach dorsal. Damit liegen distale Schicksale in diesen Phänotypen an der Position des BMP-Expressionsmaximums, während sie im Wildtyp apikal an der Grenze der *wg*-Domäne liegen. Bestimmte *Drosophila-gbb*-Mutanten zeigen ebenfalls einen subtilen Phänotyp mit Deletionen und Fusionen der Tarsalglieder (Wharton et al., 1999).

Das in der Einleitung vorgestellte Modell zur Musterbildung in dreidimensionalen Beinanlagen (nach Prpic et al., 2003) fordert die Existenz eines distalen Morphogens, um mittels Morphogengradienten die Etablierung einer proximodistalen Achse erklären zu können (Abb. 5 und Abb. 54A-F). Nur so läßt sich die Expression von Targetgenen als distale Kappe (Abb. 54F) bzw. proximodistal seriellen Domänen erklären. Tatsächlich wird *dpp* in *Tribolium* distal, aber leicht nach dorsal verschoben exprimiert (Abb. 54D). Auch das *gbb*-Expressionsmaximum liegt distal. Die Divergenz der *dpp*-Expressionen in den Extremitäten bisher untersuchter Taxa steht teilweise im Gegensatz zu den Forderungen dieses Modells. In einigen Arthropoden wie *Gryllus* und *Glomeris* verläuft die *dpp*-Domäne noch während der Bein-Gap-Gen-Expression als Streifen auf der Dorsalseite der Knospe (Abb. 52GNiwa et al., 2000; Prpic, 2004a). Ein Extremfall könnte die transiente ventrale *dpp*-Expression in den Beinanlagen von *Schistocerca* darstellen (Jockusch et al., 2000). *Schistocerca* zeigt ebenfalls eine Diskrepanz zwischen *dpp*-Expression und pMad-Aktivierung in gnathalen und thorakalen Extremitäten (Giorgianni & Patel, 2004).

In diesen Fällen könnte ein BMP-Liganden Transport wesentlich sein, damit der Aktivierungsgradient überhaupt die Eigenschaften eines distalen Morphogens erfüllt (Abb. 54G, H). Die bekannte Funktion von *sog* in Neuroektoderm und ventralem Ektoderm von *Tribolium* (Kalscheuer, 2004) könnte ausreichen, um in den Extremitätenanlagen einen BMP-Shuttle-Mechanismus zu etablieren, wie er hier für die dorsoventrale Musterbildung des Keimstreifs beschrieben wurde. In einem solchen hypothetischen System (Abb. 54) könnte die Wirkung von *sog* auf die Aktivierung des BMP-Signalweges entlang der proximodistalen Extremitätenachse und entlang der DV-Achse des Ektoderms in etwa äquivalent sein. Eine, über die ventrale *sog*-Domäne hinausgehende Expression in der proximalen Extremität wäre nicht erforderlich.

Die Lage des *gbb*-Expressionsmaximums und der *dpp*-Domäne – nach dorsal verschoben, auf der distalen Extremitätenanlage – wäre mit dieser Vorstellung gut vereinbar. Die weitgehende Unabhängigkeit des *sog-long range*-Effektes vom Expressionsort wird durch Befunde aus *Drosophila* gestützt (Wang & Ferguson, 2005). Eine solche Beteiligung der embryonalen *sog*-Expression in der Extremitätenentwicklung ist bei *Drosophila* aufgrund der Heterochronie letzterer ausgeschlossen, weist aber möglicherweise auf eine evolutive Verbindung hin. Auch hier würde Gbb eine zweifache Funktion erfüllen: zum einen den Gradienten des Dpp-Signals als Ko-Ligand in Heterodimeren formen (Abb. 50D & E) und zum anderen als homodimerer, lateraler Inhibitor die *dpp*-Selbstaktivierung beschränken.

Der Sog-vermittelte Transport könnte ähnlich den Verhältnissen im *Drosophila*-Embryo einen steileren Gradienten von BMP-Aktivität über der Extremitätenanlage schaffen und dessen Form an äußerst distaler Position (Hochpunkt der Aktivierung) präzisieren (Abb. 54D-F). Möglicherweise ist dies eine Voraussetzung für die Determination äußerst distaler Schicksale. *Gbb* würde dabei bei der Bildung von Dpp-Gbb-Heterodimeren notwendig sein, die effektiver von Sog transportiert werden. Da es sich in *Tribolium* wegen der fast apikalen *dpp*-Expression nur um eine kleinräumige Umverteilung der Dpp-Gbb-Heterodimere handeln würde, könnte man auch den sehr häufigen, aber subtilen Phänotyp gut erklären. Ähnlich wie bei der dorsoventralen Musterbildung im *Drosophila*-Embryo könnten in einer positiven Rückkopplung durch die höchsten kombinierten Morphogenkonzentrationen Faktoren wie Tld, Tsg oder Cv-2 aktiviert werden (O'Connor et al., 2006). Somit würde die gerichtete Diffusion von Sog (Pfeile in Abb. 54A, D-F) und seine Interaktion mit BMP-Liganden den Morphogengradienten formen und lokale Faktoren würden das Maximum an Transduktionsaktivität präzisieren und stabilisieren.

Die Entkopplung der Ligandenexpression von der lokalen BMP-Signalaktivierung schafft Plastizität und erlaubt die Beteiligung des BMP-Signalweges in anderen Prozessen. So könnten bei *Gryllus* z.B. bevorzugt Dpp-Gbb-Heterodimere die proximodistal-Achse definieren (Abb. 54G nach E), während auf der Dorsalseite der Extremitätenanlage exprimierte und weniger effektiv transportierte Dpp-Homodimere in die Etablierung der Dorsoventralachse der Extremität durch *dpp* involviert sein könnten, indem verbliebene niedrige dorsale Aktivität Targetgene wie *omb/bifid* aktiviert (Abb. 54G nach H).

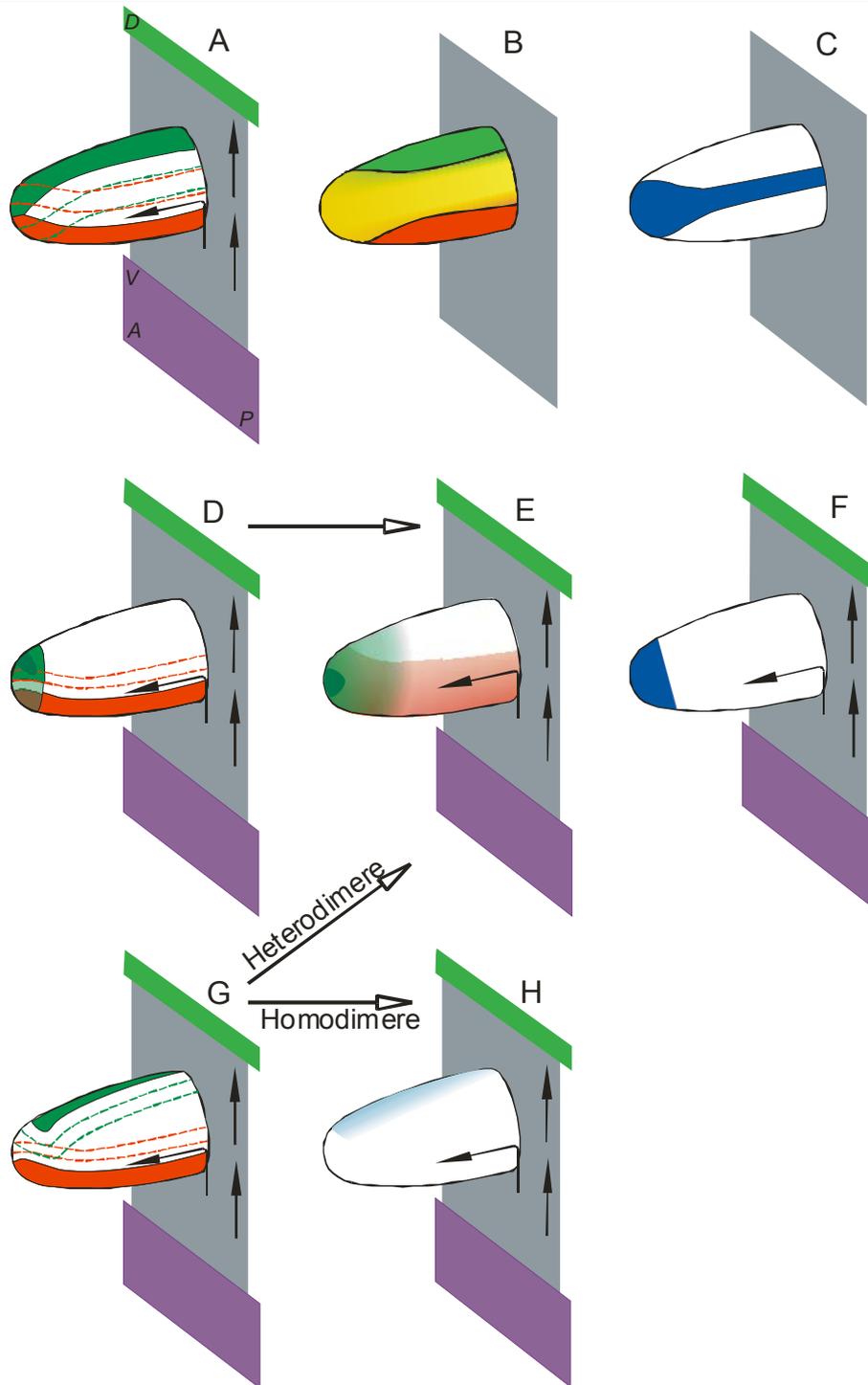


Abb. 54: Auswirkung des Ligandentransports auf die Morphogenverteilung in der Extremitätenknospe: **A,D,G**, Expressionsmuster von *dpp* und *wg*; **A-C**, hypothetische Projektion der Verhältnisse aus *Drosophila* auf eine dreidimensionale Extremitätenanlage (verändert nach Prpic et al., 2003). **A**, *dpp*-Expression als dorsaler, proximodistaler Streifen. **B**, Morphogenverteilung aufgrund freier oder restringierter Diffusion ohne gerichteten Ligandentransport. **C**, theoretisch resultierende Transkription eines distalen Targetgens. **D**, *dpp*-Expression in *Tribolium* mit dorsalem Expressionsmaximum und bis ventral reichender schwächerer Expression in einer distalen Kappe. **E**, hypothetische Verteilung von heterodimeren BMP-Liganden als Kappe mit apikalem Konzentrationsmaximum aufgrund gerichteten Sog-vermittelten Ligandentransports (*long range*-Effekt, Details siehe Text). **F**, resultierende symmetrisch-kappenförmige Expression eines distalen Targetgens (zB. *Tc'Dll*), **G**, Verhältnisse in *Gryllus* (nach Niwa et al., 2000) mit transient dorsaler *dpp*-Domäne. **H**, mögliche Verteilung weniger beweglicher Dpp-Homodimere (*short range*-Effekt, hellblau) durch Diffusion; A, D-H, unkomplexiertes Sog verteilt sich wahrscheinlich auch außerhalb seiner Domäne bis in die Extremität und zur dorsalen *dpp*-Domäne (Pfeile). Violett, *sog*; grün, *dpp*, rot & rosa, *wg*; gelb, Koexistenzzone von Dpp und *wg*; dunkelblau, distales Targetgen.

4.4.3 Proliferative Funktionen der BMP

In *gbb*-RNAi-Phänotypen von *Tribolium* deuten Defekte der Beinanlagen auf eine proliferative Funktion von *gbb* hin. Die Mehrzahl embryonaler Phänotypen zeigen morphologische Veränderungen der Beinanlagen. Neben solchen Individuen mit fehlenden oder reduzierten Beinanlagen (evtl. gestörte Initiation), zeigt der überwiegende Teil kugelförmige bis blasenförmig gestaltete Beinanlagen (Abb. 43f). Bewegt sich die Morphologie bei jüngeren Stadien noch innerhalb der wildtypischen Toleranz, so ist bei älteren Beinanlagen eine phänotypische Veränderung evident: die wildtypisch zylindrische Form ist einer – vereinfacht beschrieben – Kugelform gewichen. Um eine zylindrische Form der flach-kalottenförmigen Beinanlage zu erreichen, muß ein gerichtetes Wachstum entlang der PD-Achse erfolgen. Die blasenförmigen Beinanlagen der *gbb*-RNAi-Embryonen sind möglicherweise auf eine stochastisch orientierte Zellteilung in der Beinknospe zurückzuführen. Sowohl das distale BMP-Signal, wie auch die gradientenförmigen *gbb*-Expression könnten ein geeignetes Signal liefern, um die Teilungsebenen auszurichten. Beide wären bei *gbb*-knock down betroffen. Die blasenförmigen Beinanlagen der *gbb*-RNAi-Embryonen sind möglicherweise auf einen Verlust der Richtungsinformation zurückzuführen, obwohl distale *dpp*-Expressionen vorhanden sind.

Ein prominenter Phänotyp von *gbb*-Hypomorphen oder Null-Heterozygoten in *Drosophila* ist die drastische Größenreduzierung aller Imaginalscheiben, was sich bei der Augenimaginalscheibe auch in einer kleineren Ommatidienzahl manifestiert. Eine proliferative Funktion wird auch durch neuere Befunde bestätigt (Khalsa et al., 1998).

Die *gbb*-Expressionen in den Imaginalscheiben von *Drosophila* erscheinen gleichmäßig über die gesamte Fläche (Khalsa et al., 1998). Daher reguliert wahrscheinlich *gbb* zusammen mit *brinker* (Martin et al., 2004) vor allem die Proliferation in der Peripherie. *Dpp* kontrolliert gradientenabhängig die mediale Region (Rogulja & Irvine, 2005). In der zweidimensionalen Imaginalscheibe erfolgt das Wachstum in Form gleichmäßig über die Scheibe verteilter teilungsaktiver Zellgruppen (Milan et al., 1996). Die Teilungsrichtung ist zufällig, sodaß eine gleichmäßige Vergrößerung der Scheibe erreicht wird..

In *Tribolium* könnte die Proliferationskontrolle durch *gbb* über die gesamte PD-Ausdehnung der Knospe Gradienten-abhängig sein. Der Aktivierungsgradient wäre daher im Gegensatz zum distalen Signal auch proximal noch steil genug. Damit würde *gbb* auch in diesem Prozess ein *brinker*-abhängiges System (wie in den Imaginalscheiben von *Drosophila*) überflüssig machen, wie bereits für die dorsoventrale Musterbildung vorgeschlagen wurde. *Gbb*-Depletion würde dann das Wachstum der gesamten Anlage kompromittieren.

4.5 Hinweise auf die Funktionen von BMP in den Trachealplakoden von *Tribolium castaneum*

Die Tracheenöffnung (Stigma) der jungen *Tribolium*-Larve (L1) besteht aus einem sklerotisierten Ring, der ein einfaches, häutiges Atrium (Vorhof) gegen die Epidermis abgrenzt. Das sackförmige Atrium verengt sich terminal zur röhrenförmigen Trachee.

Bezüglich der Entwicklung der Tracheen und Stigmata können drei *gbb*-RNAi-Phänotypen unterschieden werden: Erstens, Auftreten eines ektopischen Stigmas in unmittelbarer Nähe des Wildtyp-Stigmas. Zweitens, Stigmata mit erweitertem Durchmesser und unvollständiger Abgrenzung gegen die umgebende Kutikula, und drittens, Evagination des Atriums bei Verlust der Verbindung zur Trachee. Letzterer Phänotyp tritt fast ausschließlich in Verbindung mit konischen Aussackungen der lateralen Körperwand auf, an deren Spitze dann das Stigma liegt.

Die Interpretation dieser Phänotypen ist wegen des Fehlens jeglicher Rahmendaten bei *Tribolium* spekulativ und beruht auf Analogiebetrachtungen zu *Drosophila*. Die molekularen Grundlagen der Trachealplakodenentwicklung in *Drosophila* wurden in der Einleitung ausführlich dargelegt. Es sei noch einmal auf die asymmetrische Situation in *Drosophila* hingewiesen, wo der ventrale *dpp*-abhängige Bereich der Plakode unmittelbar an *Dpp*-sezernierende Zellen grenzt, der dorsale aber mehrere Zellreihen von seiner *Dpp*-Quelle entfernt ist (Phase III der *dpp*-Expression, Schwyter et al., 1995). Dementsprechend findet sich in diesem Stadium ventral der Plakode keine *sog*-Expression dorsal davon jedoch schon (Wappner et al., 1997). Dabei ist dorsal exprimiertes *sog* auch Teil dieses funktionellen Systems, wie die trachealen *sog*-Phänotypen belegen.

Der Befund, daß gerade in und um die Trachealplakode von *Drosophila* das BMP-bindendes Protein Crossveinless (*Cv*) exprimiert ist, das bei der Musterbildung der Flügelläderung eindeutig mit der *long range*-Wirkung von *Dpp*-*Gbb*-Heterodimeren verbunden ist, weist auf ein Grundmuster hin. Auch in diesem Prozeß ist *long range*-Signaltransduktion mit einem quarternären Komplex aus *Dpp*-*Gbb*-Heterodimer, *Sog* und *Cv* bzw. funktionell ähnlichen Proteinen möglich (Shimmi et al., 2005b).

4.5.1 Zwei unterschiedliche metamere *dpp*-Expressionen bilden die ventrolaterale *dpp*-Domäne von *Tribolium*

In *Tribolium*-Keimstreifen findet sich eine Reihe alternierender schwacher, flächiger und starker, punktförmiger *dpp*-Expressionen im prospektiven lateralen Ektoderm (Abb. 48a).

Die starken segmentalen Expressionen dieser Reihe liegen im posterioren Teil eines jeden Segmentes, während sich die viel schwächere, ventrolaterale *dpp*-Expression anterior davon nahe der vorderen Segmentgrenze und an vergleichbarer dorsoventraler Position findet (Abb. 48f). Für die starken, punktförmigen *dpp*-Domänen kann eine Koexpression von *gbb* und *dpp* gezeigt werden. Eine eventuell vorhandene Expression von *gbb* in der anterioren, diffusen Domäne könnte unterhalb der Nachweisgrenze liegen. Es ist denkbar, daß die proximalen *dpp/gbb*-Domänen der thorakalen Gliedmaßen mit den stärkeren, punktförmigen Domänen seriell homolog sind und ebenfalls zur lateralen BMP-Domäne des Keimstreifs werden. In diesem Falle wären sie mit der ventrolateralen *dpp*-Domäne von *Drosophila* zu homologisieren (Phase III der *dpp*-Expression, Schwyter et al., 1995), eine Vermutung die auch von Giorgianni and Patel (Giorgianni & Patel, 2004) geäußert wird. Auch in anderen Arthropoden sind an gleicher Stelle punktförmige *dpp*-Domänen lokalisiert (Giorgianni, 2004; Jockusch et al., 2000; Prpic, 2004a; Prpic, 2004b). Jockusch assoziiert die starken thorakalen BMP-Domänen mit Flügelanlagen (Jockusch & Ober, 2004). *Snail* wird in dieser Studie als früher Marker für Flügelschicksale (Fuse et al., 1996) benutzt.

4.5.2 Die schwachen anterioren *dpp*-Domänen könnten eine Funktion bei der Anlage der Trachealplakoden erfüllen

Von den beiden segmentalen *dpp*-Domänen könnten die anterioren, schwachen *dpp*-Domänen an Positionierung und Entwicklung von Trachealplakoden beteiligt sein, was die Funktion von *gbb* bei der Trachealplakodenentwicklung vielleicht am einfachsten erklären würde. In *Tribolium* finden sich an gleicher Position ebenfalls punktförmige Domänen des an der Tracheenentwicklung beteiligten *spalt* (*sal*) (Berghammer, 2003; Franch-Marro & Casanova, 2002). Die Lageverhältnisse sind vergleichbar zu *Drosophila*: die Plakode liegt unmittelbar an bzw. teilweise in der ventrolateralen *dpp*-Domäne, sodaß die dorsale *dpp*-Domäne von der Trachealplakode weit entfernt ist. Darüberhinaus läßt sich auch später *dpp*-Expression in den Trachealplakoden nachweisen (diese Arbeit, Abb. 48g & h). Die Konservierung der beschriebenen Dreiteilung der Plakode in dorsale und ventrale BMP-abhängige und einen zentralen BMP-unabhängigen Bereich vorausgesetzt, könnten auch bei *Tribolium* bei genügend großem Abstand zur BMP-Quelle ventral, ebenso wie dorsal *long range*-Mechanismen nötig sein, die dem Muster der *Drosophila*-posterior crossvein (PCV) folgen.

4.5.3 Ektopische *dpp*-Domänen könnten eine Duplikation der Plakode oder eine gestörte Musterbildung innerhalb der Plakode bewirken

Das Auftreten ektopischer Stigmata scheint bei erster Betrachtung auf die Anlage einer zweiten Trachealplakode in einem Hemisegment mit zumindest partiell duplizierten dorsalen Zellschicksalen zurückzuführen zu sein. Dieser Eindruck wird auch dadurch bestärkt, daß die Morphologie des ektopischen Stigmas und des Wildtypstigmas völlig identisch ist. Ein solcher Defekt wäre damit auf ein verhältnismaßig frühes Ereignis bei der dorsoventralen Musterbildung im lateralen Ektoderm zurückzuführen. In *gbb*-RNAi-Larven lassen sich fließende Übergänge zwischen erweiterten und dorsoventral gestreckten Formen mit Atrium-ähnlichen Bildungen finden. Diese Phänotypen könnten auf eine unterschiedliche Lage des Tiefpunktes der Dpp-Gradienten zurückzuführen zu sein. Andererseits könnte das mehr oder weniger vollständige Unterdrücken der *gbb*-Expression durch RNAi, durch die damit verbundene Aufhebung negativer Kontrolle, auch zu einer lokalen ektopischen *dpp*-Expression im zentralen, EGFR-abhängigen Bereich der Trachealplakode führen.

Beim dritten trachealen Phänotyp mit evaginierten Atrien könnte es sich um sekundäre Effekte nach Abreißen der Trachee handeln. Nahezu alle *gbb*-Phänotypen gehen mit einer gestörten Kutikularisierung einher, die sicherlich auch die Tracheen betrifft. Das Atrium ist im Wildtyp kaum als sackförmiger Vorhof der Trachee zu erkennen, da es kaum eingesenkt ist. In *gbb*-RNAi-Embryonen mit Aussackungen der lateralen Körperwand sind Atrien entweder noch innerlich am Tracheenende oder ausgestülpt als „Säckchen“ gut zu erkennen.

4.6 Mögliche weitere Funktionen von *gbb* in der Embryonalentwicklung von *Tribolium*

4.6.1 *Gbb* in neuralen Anlagen

Nach dem Rückzug der ubiquitären *gbb*-Expression in *Tribolium* persistieren neben der medianen *gbb*-Expression auch transversale *gbb*-Domänen im Kopf (Abb. 14d & e). *Gbb* könnte hier eine von *dpp* autonome Funktion erfüllen. Auch in *Drosophila* wird *gbb* in den Ganglien des Kopfes und des ventralen Nervensystems verbreitet exprimiert (Marques et al., 2003). Die mediane *gbb*-Domäne umfaßt mesektodermale Zellen der Mittellinie (Abb. 31c) und die mediale Säule des Neuroektoderms (Abb. 33a, b; *vnd*-Domäne, *ventral nerve cord*

defective (Wheeler et al., 2005), sodaß *gbb* möglicherweise eine direkte Funktion bei Musterbildung und Erhalt der Kompartimentierung des Neuroektoderms spielen könnte, wie dies für die BMP5/6/7-Orthologe in Neuroektoderm und Mesektoderm der Urochordaten postuliert wird (Miya et al., 1996).

Die Expression von *gbb* ist auch im Nervensystem von *Drosophila* weiter verbreitet als seine bekannte Rolle bei Regulation neuroendokriner Funktionen und der Synaptogenese vermuten läßt (Marques et al., 2003). Auch *wishful thinking (wit)* als *gbb*-Rezeptor wird im gesamten Nervensystem exprimiert und ist nicht auf bestimmte Neuronenpopulationen beschränkt. In Kontexten in denen *dpp* nicht beteiligt ist, zeigt die Detektion von pMad eine ausgedehnte Aktivierung der BMP-Signaltransduktion an (Marques et al., 2003). Diese wahrscheinlich aktivin-unabhängige Aktivierung des Signalweges weist auf eine Beteiligung von *gbb* an unterschiedlichen Entwicklungs- und Differenzierungsprozessen im Nervensystem hin (Keshishian & Kim, 2004; Marques et al., 2003).

4.6.2 *Gbb* in der Entwicklung von Urogomphi, Telson und Proctodaeum

Beide BMP markieren vermutlich schon im Blastoderm die ersten Anlagen von Telson und Proctodaeum, in denen auch andere terminal exprimierte Gene wie *forkhead* und *wg* exprimiert werden (Nagy & Carroll, 1994; Schröder et al., 2000).

In der Normalentwicklung wird die *dpp*-Expression in der posterioren Wand der proctodealen Anlage auf lokale kleine Bereiche beschränkt (Pfeilspitze in Abb. 32f), während *gbb* in der gesamten Anlage exprimiert wird (Abb. 30b-f). Dabei bilden die unter Ausschluß der „inner layer“ einander genäherten *gbb*-exprimierenden Seitenplatten die anteriore, und die *gbb*-exprimierende „Endplatte“ die posteriore Wand der proctodealen Anlage (Abb. 30f). Parallel zum Abdrängen der „inner layer“ zur Dotter-Seite wird die terminale *twist*-Domäne reduziert. Der Befund, daß in *gbb*-RNAi-Phänotypen sehr häufig der Ausschluß der „inner layer“ von der Keimstreifoberfläche arretiert ist (Abb. 32j, Abb. 46a-e, g-i, j-k, o-p), weist entweder auf eine Rolle von *gbb* bei diesem Prozeß hin oder auf eine Störung durch ektopische *dpp*-Expression. Die Integrität und Feinstruktur der posterioren proctodealen Wand bleibt dabei offenbar unberührt. Interpretiert man die „inner layer“ als nicht-*twist*-exprimierendes Mesoderm, so würde dieser Ausschluß-Prozeß gewissermaßen die Gastrulation abschließen. Bemerkenswert ist dabei, daß *gbb* offenbar nur in dieser letzten Phase der Mesoderm- Internalisierung eine Rolle spielt, nicht aber in der Mesoderm-

Internalisierung bei der Differenzierung neuer Segmente. Während des Keimstreifwachstums scheint der Internalisierungsprozeß *gbb*-unabhängig zu verlaufen und bleibt offenbar auch bei nachweisbarer ventraler, ektopischer *dpp*-Expression in *gbb*-RNAi-Embryonen (Abb. 41) weitgehend ungestört.

Mögliche Funktionen in der Entodermentwicklung, wie aus *Drosophila* bekannt, sind in dieser Arbeit nicht untersucht worden.

Telsondefekte sind auch aus *gbb*-Mutanten in *Drosophila* bekannt, beziehen sich dort jedoch vornehmlich auf Defekte der Spiraculi und Stigmatophoren (Wharton et al., 1999). Der sehr häufige *gbb*-RNAi-Phänotyp mit ventralen ektopischen Urogomphi oder ektopischen Dorsalmarkern in den letzten Abdominalsegmenten ist sicherlich eine direkte Folge lokalisierter ektopischer *dpp*-Expression, wie sie durch in situ-Hybridisierung in den meisten Individuen nachweisbar ist. Eine häufige Konstellation ist, daß normale und ektopische Urogomphi durch ein Paar völlig wildtypischer Pygopodien getrennt sind, die terminal abstehen. Dies impliziert, daß A9 dorsalisiert ist und entweder A10 durch Dpp-Aktivität nicht dorsalisiert werden kann oder die Pygopodien nicht Derivate ventralen, sondern lateralen Ektoderms sind.

4.7 Überlegungen zur BMP-Liganden-Wechselwirkung in Insekten

Neul und Ferguson halten die bistabile Regulation von Targetgenen durch Induktion (Funktionen im Mesoderm: Affolter et al., 2001; Panganiban et al., 1990) durch einen einzigen Liganden (Dpp) für die phylogenetisch ursprüngliche Form der Kontrolle durch den BMP-Signalweg (Neul & Ferguson, 1998). Hieraus, so ihre Vermutung, könnte sich eine differentielle Kontrolle (Funktionen im Ektoderm von *Drosophila*) unter Rekrutierung eines zweiten Liganden evoluiert haben. Die Robustheit solcher Zwei-Liganden-Systeme ist zwar in *Drosophila* durch unterschiedlichste Experimente belegt, die mechanistischen Grundlagen jedoch noch immer nicht völlig geklärt (Eldar et al., 2002; Eldar et al., 2004). In *Tribolium* und *Drosophila* sind bezüglich dieser differentiellen Regulation unterschiedliche Varianten von Wechselwirkungen der BMP-Liganden Gbb und Dpp bzw. Screw und Dpp verwirklicht. Es ist denkbar, daß ein phylogenetisch ursprünglicher Grundtypus der Ligandenwechselwirkung existiert, dem die in der Embryogenese von *Tribolium* offenbar am weitesten verbreitete Form der differentiellen BMP-Signaltransduktion am nächsten kommt.

Die bei *Drosophila* zu findenden Varianten lassen sich möglicherweise daraus ableiten. Diese hypothetische Betrachtung faßt Befunde aus *Drosophila* und *Tribolium* zusammen.

4.7.1 Geschachtelte BMP-Domänen mit *gbb* in dualer Funktion

Die geschachtelte Expression von *dpp* und *gbb* könnte eine ursprüngliche Form differentieller BMP-Signaltransduktion darstellen. Diese Variante wird durch die Längsadern des pupalen *Drosophila*-Flügels (Ralston & Blair, 2005; Shimmi et al., 2005b) vertreten und scheint in *Tribolium* weit verbreitet zu sein. *Gbb* wird flächig exprimiert und *dpp* bildet darin eingebettet eine lokale Koexpressionszone. Die dort sezernierten Heterodimere können überwiegend *long range*-Funktionen wahrnehmen. Die *long range*-Effekte von BMP-Liganden werden durch die Transportfaktoren Sog, Tsg, Cv, sowie von Cv-2 und funktionell äquivalenter, auf lokale Bedingungen evolvierter Proteine vermittelt (Conley et al., 2000) und hängen von deren Bindungseigenschaften ab. Die Dpp-Homodimere haben daher vorwiegend *short range*-Funktionen. Außerhalb der Koexpressionszone, in der flächigen *gbb*-Domäne, werden ausschließlich Gbb-Homodimere sezerniert, die möglicherweise die *dpp*-Autoaktivierung unterdrücken oder zusätzlich andere *short range*-Funktionen haben. Damit könnte *gbb* kontextabhängig als BMP-Agonist und BMP-Antagonist fungieren.

4.7.2 Dpp als Morphogen in der Flügelimaginalscheibe

Eine davon abgeleitete Form der differentiellen BMP-Signaltransduktion ist möglicherweise in der Flügelimaginalscheibe von *Drosophila* verwirklicht. In einer flächigen *gbb*-Expression findet sich eine Zone lokaler exklusiver *dpp*-Expression, die Dpp-Homodimere sezerniert. Koexpressionszonen sind äußerst reduziert oder fehlen. Damit spielt die *sog*-Expression an der AP-Grenze (Yu et al., 1996) eine untergeordnete Rolle. Sie hat möglicherweise relikttären Charakter oder ist an BMP-*long range*-Funktionen in anderen Prozessen beteiligt, wie möglicherweise bei der Entwicklung der L5-Ader (Bangi & Wharton, 2006). In den Flügelimaginalscheiben ist ein von der BMP-Quelle her abfallender Gradient realisiert, der dem klassischen Morphogenbegriff näher kommt. Das BMP-Signal muß nahe der Quelle am stärksten sein (*sal*-Domäne) und dennoch eine große Reichweite haben (*omb*-Domäne). Daher kommt es, um die Reichweite des Signals zu erhöhen zur Ausbildung der asymmetrischen Verteilung des hochaffinen Dpp-Rezeptors Tkv (Lecuit & Cohen, 1998) mit niedrigen Konzentrationen nahe der AP-Grenze und hohen in der Peripherie. Hohe Tkv-Konzentrationen ermöglichen eine Aktivierung auch durch niederaffine Gbb-Homodimere in

der Peripherie. Über den Saxophone-Rezeptor kann Gbb unter experimentellen Bedingungen gleichzeitig eine ektopische *dpp*-Selbstaktivierung unterdrücken. Unter physiologischen Bedingungen wird dies jedoch auch durch den Transkriptionsfaktor *brinker* geleistet. In den anderen Imaginalscheiben ist möglicherweise ebenfalls dieser Modus realisiert (Khalsa et al., 1998).

4.7.3 Die dorsoventrale Musterbildung im *Drosophila*-Blastoderm

Eine dritte Variante könnte die erste Phase der dorsoventralen Musterbildung im *Drosophila*-Embryo darstellen. Dabei wird unter Einbeziehung des BMP-Liganden *Screw* ein scharfer Aktivitätsgipfel über der Amnioserosa-Anlage erzeugt. *Screw* fehlt offenbar im Genom von *Anopheles* (Lieber & Luckhart, 2004) und *Tribolium* und könnte daher eine Neuerwerbung höherer Dipteren sein. Ein wesentliches Merkmal ist eine sehr lokale BMP-Aktivierung mit einem Maximum fern des Sekretionsortes der Heterodimere und/oder des Transportproteins Sog. Die Gradientenbildung ist zur Transportrichtung gegenläufig. Die wichtigste Funktion des Sog-Proteins ist die Verhinderung des BMP-Signals an der Quelle und der effiziente Abtransport der Liganden. In der nicht BMP-exprimierenden Peripherie wird im Embryo BMP-Aktivität durch Sog unterdrückt. Da *screw*, im Gegensatz zu *gbb* die *dpp*-Selbstaktivierung nicht unterdrücken kann, wird dies im *Drosophila*-Embryo hauptsächlich durch *brinker* kontrolliert (Jazwinska et al., 1999a). Die zweite *dpp*-Signalphase der dorsoventralen Musterbildung in *Drosophila* kommt ohne Ko-Liganden aus (Dorfman & Shilo, 2001). Dem *Screw/Dpp*-System ähnelt die Musterbildung durch *gbb* und *dpp* bei der Differenzierung der posterior crossvein (PCV) der pupalen Flügelanlage von *Drosophila*.

Es erscheint zunächst paradox, daß ein Morphogen in einen Transportmechanismus eingebunden ist, der dessen Wirkung nahe der Quelle herabsetzt oder verhindert, wie dies im lateralen Ektoderm des *Drosophila*-Embryos der Fall ist. Sog-Mechanismen entkoppeln hier lediglich Expressionsort und Wirkort für eine von mehreren Ligandenspezies. Damit wird nach der Etablierung des Morphogengradienten die exakte Form des Aktivierungsgradienten maßgeblich durch die Expression der Proteine definiert, die die BMP-Liganden transportieren oder aus dem Gradienten rekrutieren. Auf diese Weise kann sekundär die Stabilität des Systems erhöht und die Empfindlichkeit gegenüber Gendosiseffekten und Veränderungen der Transkriptionsregulation der BMP verringert werden.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Dpp ist in *Tribolium* für die dorsoventrale Musterbildung im Blastoderm und in der Wachstumszone des Embryos notwendig. In *dpp*-knock down-Embryonen werden alle dorsalen Schicksale deletiert, sodaß die Keimstreifen ausschließlich aus ventralen Anlagen bestehen und eine ungestörte Mesodermentwicklung zeigen. *Dpp* spezifiziert also dorsale Anlagen, während die Musterbildung in ventralen Anlagen offenbar *dpp*-unabhängig verläuft. Vor und zu Beginn der Blastoderm differenzierung wird die *dpp*-Expression stark durch anteroposteriore Faktoren bestimmt. Erst im Laufe der Blastoderm differenzierung gewinnt das dorsoventrale System an Einfluß. Während in *Drosophila* ventrale Faktoren die *dpp*-Expression negativ regulieren, aktivieren diese offenbar in *Tribolium* die *dpp*-Expression im anterioren Blastoderm. Die anteroventrale *dpp*-Expression des Blastoderms hat eine Funktion bei der Determination der anterioren Amnionanlage die sich zwischen Serosa und Embryo differenziert. Die posterioren Amnionanlagen entstehen aus *pnr*- und *dpp*-exprimierenden dorsalen Schicksalen. Anteriore und posteriore Amnionanlage werden durch die Anatrepsis-Bewegung zum geschlossenen, *dpp*- und *gbb*-exprimierenden Amnionepithel. *Gbb*-RNAi-Embryonen zeigen, daß *gbb* für die Amniogenese in der Wachstumszone notwendig ist.

Die *dpp*-Expression wird in *Drosophila*, und offenbar auch in *Tribolium*, durch positive Rückkopplung aktiviert. *Gbb* kontrolliert diese Rückkopplungsschleife negativ und begrenzt damit die Ausdehnung der *dpp*-Expression.

Die *dpp*-Expression im Amnion ist vermutlich an der dorsoventralen Musterbildung im Keimstreif beteiligt und führt offenbar durch Autoaktivierung zur Etablierung einer dorsalen, epidermalen *dpp*-Domäne. *Gbb* ist für die Bildung dorsaler Anlagen durch die Wachstumszone notwendig und unterdrückt gleichzeitig die *dpp*-Expression in ventralen Anlagen. *Gbb* könnte in einer *long range*-Funktion über ein Ligandentransportsystem an der Aktivierung des BMP-Signalweges mitwirken, jedoch gleichzeitig in einer *short range*-Funktion lokal als BMP-Antagonist wirken. In *Drosophila* werden diese Funktionen durch den BMP-Liganden Screw und den Transkriptionsfaktor Brinker erfüllt.

Achsenduplikation der Extremitäten in *gbb*-RNAi-Embryonen sind vermutlich auf eine Störung der dorsoventralen Musterbildung im Keimstreif zurückzuführen. Distale Defekte der *Tribolium*-Extremität bei *gbb*-knock-down deuten möglicherweise darauf hin, daß Ligandentransportsysteme und *gbb* auch eine Rolle bei der Erzeugung von Morphogengradienten in der Extremitätenentwicklung spielen.

LITERATUR

- Aberle, H., Haghghi, A. P., Fetter, R. D., McCabe, B. D., Magalhaes, T. R., and Goodman, C. S. (2002). wishful thinking encodes a BMP type II receptor that regulates synaptic growth in *Drosophila*. *Neuron* **33**, 545-58.
- Abu-Shaar, M., and Mann, R. S. (1998). Generation of multiple antagonistic domains along the proximodistal axis during *Drosophila* leg development. *Development* **125**, 3821-30.
- Abzhanov, A., and Kaufman, T. C. (2000). Homologs of *Drosophila* appendage genes in the patterning of arthropod limbs. *Dev Biol* **227**, 673-89.
- Affolter, M., Marty, T., Vigano, M. A., and Jazwinska, A. (2001). Nuclear interpretation of Dpp signaling in *Drosophila*. *Embo J* **20**, 3298-305.
- Agnes, F., Suzanne, M., and Noselli, S. (1999). The *Drosophila* JNK pathway controls the morphogenesis of imaginal discs during metamorphosis. *Development* **126**, 5453-62.
- Akiyama-Oda, Y., and Oda, H. (2003). Early patterning of the spider embryo: a cluster of mesenchymal cells at the cumulus produces Dpp signals received by germ disc epithelial cells. *Development* **130**, 1735-47.
- Allan, D. W., St Pierre, S. E., Miguel-Aliaga, I., and Thor, S. (2003). Specification of neuropeptide cell identity by the integration of retrograde BMP signaling and a combinatorial transcription factor code. *Cell* **113**, 73-86.
- Angelini, D. R., and Kaufman, T. C. (2004). Functional analyses in the hemipteran *Oncopeltus fasciatus* reveal conserved and derived aspects of appendage patterning in insects. *Dev Biol* **271**, 306-21.
- Angelini, D. R., and Kaufman, T. C. (2005). Functional analyses in the milkweed bug *Oncopeltus fasciatus* (Hemiptera) support a role for Wnt signaling in body segmentation but not appendage development. *Dev Biol* **283**, 409-23.
- Aono, A., Hazama, M., Notoya, K., Taketomi, S., Yamasaki, H., Tsukuda, R., Sasaki, S., and Fujisawa, Y. (1995). Potent ectopic bone-inducing activity of bone morphogenetic protein-4/7 heterodimer. *Biochem Biophys Res Commun* **210**, 670-7.
- Arora, K., Levine, M. S., and O'Connor, M. B. (1994). The screw gene encodes a ubiquitously expressed member of the TGF-beta family required for specification of dorsal cell fates in the *Drosophila* embryo. *Genes Dev* **8**, 2588-601.

- Arquier, N., Perrin, L., Manfruelli, P., and Semeriva, M. (2001). The *Drosophila* tumor suppressor gene lethal(2)giant larvae is required for the emission of the Decapentaplegic signal. *Development* **128**, 2209-20.
- Ashe, H. L. (2005). BMP signalling: synergy and feedback create a step gradient. *Curr Biol* **15**, R375-7.
- Ashe, H. L., and Levine, M. (1999). Local inhibition and long-range enhancement of Dpp signal transduction by Sog. *Nature* **398**, 427-31.
- Ashe, H. L., Mannervik, M., and Levine, M. (2000). Dpp signaling thresholds in the dorsal ectoderm of the *Drosophila* embryo. *Development* **127**, 3305-12.
- Baines, R. A. (2004). Synaptic strengthening mediated by bone morphogenetic protein-dependent retrograde signaling in the *Drosophila* CNS. *J Neurosci* **24**, 6904-11.
- Bangi, E., and Wharton, K. (2003). A novel means of regulating BMP signaling by a BMP type I receptor, Dros. Res. Conf. 44, Chicago.
- Bangi, E., and Wharton, K. (2004). The BMP type I receptor Saxophone exhibits the ability to both promote and antagonize Gbb signaling., Dros. Res. Conf. 45, Washington.
- Bangi, E., and Wharton, K. (2005). Long range signaling by the BMP ligand Gbb is required for the BMP activity gradient in the *Drosophila* wing disc, Dros. Res. Conf. 46, San Diego.
- Bangi, E., and Wharton, K. (2006). Dpp and Gbb exhibit different effective ranges in the establishment of the BMP activity gradient critical for *Drosophila* wing patterning. *Dev Biol* **295**, 178-93.
- Baron, M., O'Leary, V., Evans, D. A., Hicks, M., and Hudson, K. (2000). Multiple roles of the Dcdc42 GTPase during wing development in *Drosophila melanogaster*. *Mol Gen Genet* **264**, 98-104.
- Basal, A. (2003). Funktionelle Studien zur dorsoventralen Musterbildung in *Tribolium castaneum*. In "Institut für Entwicklungsbiologie". Universität zu Köln, Köln.
- Basler, K., and Struhl, G. (1994). Compartment boundaries and the control of *Drosophila* limb pattern by hedgehog protein. *Nature* **368**, 208-14.
- Beeman, R. W., Stuart, J. J., Haas, M. S., and Denell, R. E. (1989). Genetic analysis of the homeotic gene complex (HOM-C) in the beetle *Tribolium castaneum*. *Dev Biol* **133**, 196-209.
- 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.

- Belenkaya, T. Y., Han, C., Yan, D., Opoka, R. J., Khodoun, M., Liu, H., and Lin, X. (2004). *Drosophila* Dpp morphogen movement is independent of dynamin-mediated endocytosis but regulated by the glypican members of heparan sulfate proteoglycans. *Cell* **119**, 231-44.
- 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. (2003). Keimbahntransformation mit universellem Marker und neue homöotische Gene in *Tribolium castaneum*, Institut für Zoologie, Ludwig-Maximilians-Universität, München.
- Berghammer, A. J., Klingler, M., and Wimmer, E. A. (1999b). A universal marker for transgenic insects. *Nature* **402**, 370-1.
- Berns, N. (2001). Untersuchungen zur Struktur und Funktion des *Tribolium Brachyury*-Orthologs *Tcbyn*. Institut für Zellbiologie, Eberhard-Karls-Universität, Tübingen.
- Biehs, B., Francois, V., and Bier, E. (1996). The *Drosophila* short gastrulation gene prevents Dpp from autoactivating and suppressing neurogenesis in the neuroectoderm. *Genes Dev* **10**, 2922-34.
- Bolinger, R. A., and Boekhoff-Falk, G. (2005). Distal-less functions in subdividing the *Drosophila* thoracic limb primordium. *Dev Dyn* **232**, 801-16.
- Brook, W. J., and Cohen, S. M. (1996). Antagonistic interactions between wingless and decapentaplegic responsible for dorsal-ventral pattern in the *Drosophila* Leg. *Science* **273**, 1373-7.
- Brown, S. J., Mahaffey, J. P., Lorenzen, M. D., Denell, R. E., and Mahaffey, J. W. (1999). Using RNAi to investigate orthologous homeotic gene function during development of distantly related insects. *Evol Dev* **1**, 11-5.
- Bruckner, K., Perez, L., Clausen, H., and Cohen, S. (2000). Glycosyltransferase activity of Fringe modulates Notch-Delta interactions. *Nature* **406**, 411-5.
- Brummel, T., Abdollah, S., Haerry, T. E., Shimell, M. J., Merriam, J., Raftery, L., Wrana, J. L., and O'Connor, M. B. (1999). The *Drosophila* activin receptor baboon signals through dSmad2 and controls cell proliferation but not patterning during larval development. *Genes Dev* **13**, 98-111.
- Brummel, T. J., Twombly, V., Marques, G., Wrana, J. L., Newfeld, S. J., Attisano, L., Massague, J., O'Connor, M. B., and Gelbart, W. M. (1994). Characterization and relationship of Dpp receptors encoded by the saxophone and thick veins genes in *Drosophila*. *Cell* **78**, 251-61.

- Bucher, G., Farzana, L., Brown, S. J., and Klingler, M. (2005). Anterior localization of maternal mRNAs in a short germ insect lacking bicoid. *Evol Dev* **7**, 142-9.
- Bucher, G., and Klingler, M. (2004). Divergent segmentation mechanism in the short germ insect *Tribolium* revealed by giant expression and function. *Development* **131**, 1729-40.
- Bucher, G., Scholten, J., and Klingler, M. (2002). Parental RNAi in *Tribolium* (Coleoptera). *Curr Biol* **12**, R85-6.
- Bunch, T. A., Grinblat, Y., and Goldstein, L. S. (1988). Characterization and use of the *Drosophila* metallothionein promoter in cultured *Drosophila melanogaster* cells. *Nucleic Acids Res* **16**, 1043-61.
- Burke, R., and Basler, K. (1996). Dpp receptors are autonomously required for cell proliferation in the entire developing *Drosophila* wing. *Development* **122**, 2261-9.
- Campbell, G., and Tomlinson, A. (1995). Initiation of the proximodistal axis in insect legs. *Development* **121**, 619-628.
- Casanova, J. (1991). Interaction between torso and dorsal, two elements of different transduction pathways in the *Drosophila* embryo. *Mech Dev* **36**, 41-5.
- Casares, F., and Mann, R. S. (1998). Control of antennal versus leg development in *Drosophila*. *Nature* **392**, 723-6.
- Chen, G., Handel, K., and Roth, S. (2000). The maternal NF-kappaB/dorsal gradient of *Tribolium castaneum*: dynamics of early dorsoventral patterning in a short-germ beetle. *Development* **127**, 5145-56.
- Chen, Y., Riese, M. J., Killinger, M. A., and Hoffmann, F. M. (1998a). A genetic screen for modifiers of *Drosophila* decapentaplegic signaling identifies mutations in punt, Mothers against dpp and the BMP-7 homologue, 60A. *Development* **125**, 1759-68.
- Chen, Y. G., Hata, A., Lo, R. S., Wotton, D., Shi, Y., Pavletich, N., and Massague, J. (1998b). Determinants of specificity in TGF-beta signal transduction. *Genes Dev* **12**, 2144-52.
- Cohen, S. M. (1990). Specification of limb development in the *Drosophila* embryo by positional cues from segmentation genes. *Nature* **343**, 173-7.
- Cohen, S. M., Bronner, G., Kuttner, F., Jurgens, G., and Jackle, H. (1989). Distal-less encodes a homoeodomain protein required for limb development in *Drosophila*. *Nature* **338**, 432-4.
- Conley, C. A., Silburn, R., Singer, M. A., Ralston, A., Rohwer-Nutter, D., Olson, D. J., Gelbart, W., and Blair, S. S. (2000). Crossveinless 2 contains cysteine-rich domains

- and is required for high levels of BMP-like activity during the formation of the cross veins in *Drosophila*. *Development* **127**, 3947-59.
- Constam, D. B., and Robertson, E. J. (1999). Regulation of bone morphogenetic protein activity by pro domains and proprotein convertases. *J Cell Biol* **144**, 139-49.
- Cook, O., Biehs, B., and Bier, E. (2004). *brinker* and *optomotor-blind* act coordinately to initiate development of the L5 wing vein primordium in *Drosophila*. *Development* **131**, 2113-24.
- Couso, J. P., Bate, M., and Martinez-Arias, A. (1993). A wingless-dependent polar coordinate system in *Drosophila* imaginal discs. *Science* **259**, 484-9.
- Cui, Y., Hackenmiller, R., Berg, L., Jean, F., Nakayama, T., Thomas, G., and Christian, J. L. (2001). The activity and signaling range of mature BMP-4 is regulated by sequential cleavage at two sites within the prodomain of the precursor. *Genes Dev* **15**, 2797-802.
- Cui, Y., Jean, F., Thomas, G., and Christian, J. L. (1998). BMP-4 is proteolytically activated by furin and/or PC6 during vertebrate embryonic development. *Embo J* **17**, 4735-43.
- 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.
- Day, S. J., and Lawrence, P. A. (2000). Measuring dimensions: the regulation of size and shape. *Development* **127**, 2977-87.
- de Celis, J. F. (1997). Expression and function of decapentaplegic and thick veins during the differentiation of the veins in the *Drosophila* wing. *Development* **124**, 1007-18.
- De Celis, J. F. (2003). Pattern formation in the *Drosophila* wing: The development of the veins. *Bioessays* **25**, 443-51.
- de Celis, J. F., Barrio, R., and Kafatos, F. C. (1999). Regulation of the spalt/spalt-related gene complex and its function during sensory organ development in the *Drosophila* thorax. *Development* **126**, 2653-62.
- de Celis, J. F., Bray, S., and Garcia-Bellido, A. (1997). Notch signalling regulates veinlet expression and establishes boundaries between veins and interveins in the *Drosophila* wing. *Development* **124**, 1919-28.
- de Celis, J. F., Tyler, D. M., de Celis, J., and Bray, S. J. (1998). Notch signalling mediates segmentation of the *Drosophila* leg. *Development* **125**, 4617-26.
- Dearden, P., Grbic, M., Falciani, F., and Akam, M. (2000). Maternal expression and early zygotic regulation of the *Hox3/zen* gene in the grasshopper *Schistocerca gregaria*. *Evol Dev* **2**, 261-70.

- Dearden, P. K., and Akam, M. (2001). Early embryo patterning in the grasshopper, *Schistocerca gregaria*: wingless, decapentaplegic and caudal expression. *Development* **128**, 3435-44.
- Decotto, E., and Ferguson, E. L. (2001). A positive role for Short gastrulation in modulating BMP signaling during dorsoventral patterning in the *Drosophila* embryo. *Development* **128**, 3831-41.
- Derynck, R., and Zhang, Y. E. (2003). Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. *Nature* **425**, 577-84.
- Diaz-Benjumea, F. J., Cohen, B., and Cohen, S. M. (1994). Cell interaction between compartments establishes the proximal-distal axis of *Drosophila* legs. *Nature* **372**, 175-9.
- Diaz-Benjumea, F. J., and Garcia-Bellido, A. (1990). Behaviour of cells mutant for an EGF receptor homologue of *Drosophila* in genetic mosaics. *Proc Biol Sci* **242**, 36-44.
- Dick, A., Hild, M., Bauer, H., Imai, Y., Maifeld, H., Schier, A. F., Talbot, W. S., Bouwmeester, T., and Hammerschmidt, M. (2000). Essential role of Bmp7 (snailhouse) and its prodomain in dorsoventral patterning of the zebrafish embryo. *Development* **127**, 343-54.
- Doctor, J. S., Jackson, P. D., Rashka, K. E., Visalli, M., and Hoffmann, F. M. (1992). Sequence, biochemical characterization, and developmental expression of a new member of the TGF-beta superfamily in *Drosophila melanogaster*. *Dev Biol* **151**, 491-505.
- Dong, P. D., Chu, J., and Panganiban, G. (2001). Proximodistal domain specification and interactions in developing *Drosophila* appendages. *Development* **128**, 2365-72.
- Dorfman, R., and Shilo, B. Z. (2001). Biphasic activation of the BMP pathway patterns the *Drosophila* embryonic dorsal region. *Development* **128**, 965-72.
- Drysdale, R. A., Crosby, M. A., and Consortium, T. F. (2005). FlyBase: genes and gene models. *Nucleic Acids Research* **33**, D390-D395.
- Eldar, A., Dorfman, R., Weiss, D., Ashe, H., Shilo, B. Z., and Barkai, N. (2002). Robustness of the BMP morphogen gradient in *Drosophila* embryonic patterning. *Nature* **419**, 304-8.
- Eldar, A., Shilo, B. Z., and Barkai, N. (2004). Elucidating mechanisms underlying robustness of morphogen gradients. *Curr Opin Genet Dev* **14**, 435-9.
- Entchev, E. V., and Gonzalez-Gaitan, M. A. (2002). Morphogen gradient formation and vesicular trafficking. *Traffic* **3**, 98-109.

- Entchev, E. V., Schwabedissen, A., and Gonzalez-Gaitan, M. (2000). Gradient formation of the TGF-beta homolog Dpp. *Cell* **103**, 981-91.
- Estella, C., Rieckhof, G., Calleja, M., and Morata, G. (2003). The role of buttonhead and Sp1 in the development of the ventral imaginal discs of *Drosophila*. *Development* **130**, 5929-41.
- Fainsod, A., Steinbeisser, H., and De Robertis, E. M. (1994). On the function of BMP-4 in patterning the marginal zone of the *Xenopus* embryo. *Embo J* **13**, 5015-25.
- 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.
- Francois, V., and Bier, E. (1995). *Xenopus* chordin and *Drosophila* short gastrulation genes encode homologous proteins functioning in dorsal-ventral axis formation. *Cell* **80**, 19-20.
- Francois, V., Solloway, M., O'Neill, J. W., Emery, J., and Bier, E. (1994). Dorsal-ventral patterning of the *Drosophila* embryo depends on a putative negative growth factor encoded by the short gastrulation gene. *Genes Dev* **8**, 2602-16.
- Fujise, M., Takeo, S., Kamimura, K., Matsuo, T., Aigaki, T., Izumi, S., and Nakato, H. (2003). Dally regulates Dpp morphogen gradient formation in the *Drosophila* wing. *Development* **130**, 1515-22.
- Funakoshi, Y., Minami, M., and Tabata, T. (2001). mtv shapes the activity gradient of the Dpp morphogen through regulation of thickveins. *Development* **128**, 67-74.
- Fuse, N., Hirose, S., and Hayashi, S. (1996). Determination of wing cell fate by the escargot and snail genes in *Drosophila*. *Development* **122**, 1059-67.
- Galindo, M. I., Bishop, S. A., and Couso, J. P. (2005). Dynamic EGFR-Ras signalling in *Drosophila* leg development. *Dev Dyn* **233**, 1496-508.
- Galindo, M. I., Bishop, S. A., Greig, S., and Couso, J. P. (2002). Leg patterning driven by proximal-distal interactions and EGFR signaling. *Science* **297**, 256-9.
- Gerhart, J., and Kirschner, M. (1997). Ch. 11: Evolution and evolvability. In "Cells, Embryos and Evolution". Blackwell, Malden.
- Gibson, M. C., Lehman, D. A., and Schubiger, G. (2002). Luminal transmission of decapentaplegic in *Drosophila* imaginal discs. *Dev Cell* **3**, 451-60.
- Gibson, M. C., and Perrimon, N. (2005). Extrusion and death of DPP/BMP-compromised epithelial cells in the developing *Drosophila* wing. *Science* **307**, 1785-9.

- Gibson, M. C., and Schubiger, G. (2000). Peripodial cells regulate proliferation and patterning of *Drosophila* imaginal discs. *Cell* **103**, 343-50.
- Giorgianni, M. (2004). Conservation and Divergence of Appendage Patterning Mechanisms in Insects. Developmental Biology, University of Chicago.
- Giorgianni, M. W., and Patel, N. H. (2004). Patterning of the branched head appendages in *Schistocerca americana* and *Tribolium castaneum*. *Evol Dev* **6**, 402-10.
- Glazer, L., and Shilo, B. Z. (2001). Hedgehog signaling patterns the tracheal branches. *Development* **128**, 1599-606.
- Gonzalez-Crespo, S., Abu-Shaar, M., Torres, M., Martinez, A. C., Mann, R. S., and Morata, G. (1998). Antagonism between extradenticle function and Hedgehog signalling in the developing limb. *Nature* **394**, 196-200.
- Gonzalez-Crespo, S., and Morata, G. (1996). Genetic evidence for the subdivision of the arthropod limb into coxopodite and telopodite. *Development* **122**, 3921-8.
- Gonzalez-Gaitan, M., and Jackle, H. (1999). The range of spalt-activating Dpp signalling is reduced in endocytosis-defective *Drosophila* wing discs. *Mech Dev* **87**, 143-51.
- Gorfinkiel, N., Morata, G., and Guerrero, I. (1997). The homeobox gene *Distal-less* induces ventral appendage development in *Drosophila*. *Genes Dev.* **11**, 2259-2271.
- Goto, S., and Hayashi, S. (1997). Specification of the embryonic limb primordium by graded activity of Decapentaplegic. *Development* **124**, 125-32.
- Gray, A. M., and Mason, A. J. (1990). Requirement for activin A and transforming growth factor--beta 1 pro-regions in homodimer assembly. *Science* **247**, 1328-30.
- Greco, V., Hannus, M., and Eaton, S. (2001). Argosomes: a potential vehicle for the spread of morphogens through epithelia. *Cell* **106**, 633-45.
- Haerry, T. E., Khalsa, O., O'Connor, M. B., and Wharton, K. A. (1998). Synergistic signaling by two BMP ligands through the SAX and TKV receptors controls wing growth and patterning in *Drosophila*. *Development* **125**, 3977-87.
- Hammerschmidt, M., Serbedzija, G. N., and McMahon, A. P. (1996). Genetic analysis of dorsoventral pattern formation in the zebrafish: requirement of a BMP-like ventralizing activity and its dorsal repressor. *Genes Dev* **10**, 2452-61.
- Han, C., Yan, D., Belenkaya, T. Y., and Lin, X. (2005). *Drosophila* glypicans Dally and Dally-like shape the extracellular Wingless morphogen gradient in the wing disc. *Development* **132**, 667-79.

- Handel, K., Basal, A., Fan, X., and Roth, S. (2005). *Tribolium castaneum* twist: gastrulation and mesoderm formation in a short-germ beetle. *Dev Genes Evol* **215**, 13-31.
- 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.
- Hao, I., Green, R. B., Dunaevsky, O., Lengyel, J. A., and Rauskolb, C. (2003). The odd-skipped family of zinc finger genes promotes *Drosophila* leg segmentation. *Dev Biol* **263**, 282-95.
- Harden, N. (2002). Signaling pathways directing the movement and fusion of epithelial sheets: lessons from dorsal closure in *Drosophila*.. *Differentiation* **70**, 181--203.
- Hassel, S., Schmitt, S., Hartung, A., Roth, M., Nohe, A., Petersen, N., Ehrlich, M., Henis, Y. I., Sebald, W., and Knaus, P. (2003). Initiation of Smad-dependent and Smad-independent signaling via distinct BMP-receptor complexes. *J Bone Joint Surg Am* **85-A Suppl 3**, 44-51.
- Hayashi, S., Hirose, S., Metcalfe, T., and Shirras, A. D. (1993). Control of imaginal cell development by the escargot gene of *Drosophila*. *Development* **118**, 105-15.
- Herranz, H., and Morata, G. (2001). The functions of pannier during *Drosophila* embryogenesis. *Development* **128**, 4837-46.
- Holley, S. A., Neul, J. L., Attisano, L., Wrana, J. L., Sasai, Y., O'Connor, M. B., De Robertis, E. M., and Ferguson, E. L. (1996). The *Xenopus* dorsalizing factor noggin ventralizes *Drosophila* embryos by preventing DPP from activating its receptor. *Cell* **86**, 607-17.
- Hsiung, F., Ramirez-Weber, F. A., Iwaki, D. D., and Kornberg, T. B. (2005). Dependence of *Drosophila* wing imaginal disc cytonemes on Decapentaplegic. *Nature* **437**, 560-3.
- Huang, A. M., Rusch, J., and Levine, M. (1997). An anteroposterior Dorsal gradient in the *Drosophila* embryo. *Genes Dev.* **11**, 1963-1973.
- Huang, J. D., Schwyter, D. H., Shirokawa, J. M., and Courey, A. J. (1993). The interplay between multiple enhancer and silencer elements defines the pattern of decapentaplegic expression. *Genes Dev* **7**, 694-704.
- Inoue, Y., Mito, T., Miyawaki, K., Matsushima, K., Shinmyo, Y., Heanue, T. A., Mardon, G., Ohuchi, H., and Noji, S. (2002). Correlation of expression patterns of homothorax, dachshund, and Distal-less with the proximodistal segmentation of the cricket leg bud. *Mech Dev* **113**, 141-8.
- Irish, V. F., and Gelbart, W. M. (1987). The decapentaplegic gene is required for dorsal-ventral patterning of the *Drosophila* embryo. *Genes Dev* **1**, 868-79.

- Irvine, K. D., and Rauskolb, C. (2001). Boundaries in development: formation and function. *Annu Rev Cell Dev Biol* **17**, 189-214.
- Isaac, D. D., and Andrew, D. J. (1996). Tubulogenesis in *Drosophila*: a requirement for the trachealess gene product. *Genes Dev* **10**, 103-17.
- Itoh, S., Thorikay, M., Kowanetz, M., Moustakas, A., Itoh, F., Heldin, C. H., and ten Dijke, P. (2003). Elucidation of Smad requirement in transforming growth factor-beta type I receptor-induced responses. *J Biol Chem* **278**, 3751-61.
- Jacinto, A., Wood, W., Woolner, S., Hiley, C., Turner, L., Wilson, C., Martinez-Arias, A., and Martin, P. (2002). Dynamic analysis of actin cable function during *Drosophila* dorsal closure. *Curr Biol* **12**, 1245-50.
- Jazwinska, A., Kirov, N., Wieschaus, E., Roth, S., and Rushlow, C. (1999a). The *Drosophila* gene brinker reveals a novel mechanism of Dpp target gene regulation. *Cell* **96**, 563-73.
- Jazwinska, A., Rushlow, C., and Roth, S. (1999b). The role of brinker in mediating the graded response to Dpp in early *Drosophila* embryos. *Development* **126**, 3323-34.
- Jockusch, E. L., Nulsen, C., Newfeld, S. J., and Nagy, L. M. (2000). Leg development in flies versus grasshoppers: differences in dpp expression do not lead to differences in the expression of downstream components of the leg patterning pathway. *Development* **127**, 1617-26.
- Jockusch, E. L., and Ober, K. A. (2004). Hypothesis testing in evolutionary developmental biology: a case study from insect wings. *J Hered* **95**, 382-96.
- Jockusch, E. L., Williams, T. A., and Nagy, L. M. (2004). The evolution of patterning of serially homologous appendages in insects. *Dev Genes Evol* **214**, 324-38.
- Kalscheuer, P. (2004). Vergleichende und funktionelle Studien zur Evolution der dorsoventralen Musterbildung bei Insekten. Institut für Entwicklungsbiologie, Universität zu Köln.
- Keshishian, H., and Kim, Y. S. (2004). Orchestrating development and function: retrograde BMP signaling in the *Drosophila* nervous system. *Trends Neurosci* **27**, 143-7.
- Khalsa, O., Yoon, J. W., Torres-Schumann, S., and Wharton, K. A. (1998). TGF-beta/BMP superfamily members, Gbb-60A and Dpp, cooperate to provide pattern information and establish cell identity in the *Drosophila* wing. *Development* **125**, 2723-34.
- Kiehart, D. P., Galbraith, C. G., Edwards, K. A., Rickoll, W. L., and Montague, R. A. (2000). Multiple forces contribute to cell sheet morphogenesis for dorsal closure in *Drosophila*. *J Cell Biol* **149**, 471-90.

- Kirov, N., Childs, S., O'Connor, M., and Rushlow, C. (1994). The *Drosophila* dorsal morphogen represses the *tolloid* gene by interacting with a silencer element. *Mol Cell Biol* **14**, 713-22.
- Klambt, C., Glazer, L., and Shilo, B. Z. (1992). *breathless*, a *Drosophila* FGF receptor homolog, is essential for migration of tracheal and specific midline glial cells. *Genes Dev* **6**, 1668-78.
- Klingler, M. (2004). *Tribolium*. *Curr Biol* **14**, R639-40.
- Koch, A. J., and Meinhardt, H. (1994). Biological pattern formation: from basic mechanisms to complex structures. *Reviews of Modern Physics* **66**, 1481-1507.
- Kruse, K., Pantazis, P., Bollenbach, T., Julicher, F., and Gonzalez-Gaitan, M. (2004). Dpp gradient formation by dynamin-dependent endocytosis: receptor trafficking and the diffusion model. *Development* **131**, 4843-56.
- Kubota, K., Goto, S., Eto, K., and Hayashi, S. (2000). EGF receptor attenuates Dpp signaling and helps to distinguish the wing and leg cell fates in *Drosophila*. *Development* **127**, 3769-76.
- Kubota, K., Goto, S., and Hayashi, S. (2003). The role of Wg signaling in the patterning of embryonic leg primordium in *Drosophila*. *Dev Biol* **257**, 117-26.
- Kurata, S., Go, M. J., Artavanis-Tsakonas, S., and Gehring, W. J. (2000). Notch signaling and the determination of appendage identity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 2117-22.
- Lander, A. D., Nie, Q., and Wan, F. Y. (2002). Do morphogen gradients arise by diffusion? *Dev Cell* **2**, 785-96.
- Lawrence, P. A. (1966a). Development and determination of hairs and bristles in the milkweed bug, *Oncopeltus fasciatus* (Lygaeidae, Hemiptera). *J Cell Sci* **1**, 475-98.
- Lawrence, P. A. (1966b). Gradients in the insect segment: The orientation of hairs in the milkweed bug *Oncopeltus fasciatus*. *J Exp Biol* **44**, 607-20.
- Lawrence, P. A., Crick, F. H., and Munro, M. (1972). A gradient of positional information in an insect, *Rhodnius*. *J Cell Sci* **11**, 815-53.
- Lecuit, T., and Cohen, S. M. (1997). Proximal-distal axis formation in the *Drosophila* leg. *Nature* **388**, 139-45.
- Lecuit, T., and Cohen, S. M. (1998). Dpp receptor levels contribute to shaping the Dpp morphogen gradient in the *Drosophila* wing imaginal disc. *Development* **125**, 4901-7.

- Lee-Hoeflich, S. T., Zhao, X., Mehra, A., and Attisano, L. (2005). The *Drosophila* type II receptor, Wishful thinking, binds BMP and myoglianin to activate multiple TGFbeta family signaling pathways. *FEBS Lett* **579**, 4615-21.
- Letsou, A., Arora, K., Wrana, J. L., Simin, K., Twombly, V., Jamal, J., Staehling-Hampton, K., Hoffmann, F. M., Gelbart, W. M., Massague, J., and et al. (1995). *Drosophila* Dpp signaling is mediated by the punt gene product: a dual ligand-binding type II receptor of the TGF beta receptor family. *Cell* **80**, 899-908.
- Li, Y., Brown, S. J., Hausdorf, B., Tautz, D., Denell, R. E., and Finkelstein, R. (1996). Two orthodenticle-related genes in the short germ-beetle *Tribolium castaneum*. *Development Genes & Evolution* **206**, 35-45.
- Lieber, M. J., and Luckhart, S. (2004). Transforming growth factor-betas and related gene products in mosquito vectors of human malaria parasites: signaling architecture for immunological crosstalk. *Mol Immunol* **41**, 965-77.
- Lilja, T., Qi, D., Stabell, M., and Mannervik, M. (2003). The CBP coactivator functions both upstream and downstream of Dpp/Screw signaling in the early *Drosophila* embryo. *Dev Biol* **262**, 294-302.
- Little, S. C., and Mullins, M. C. (2004). Twisted gastrulation promotes BMP signaling in zebrafish dorsal-ventral axial patterning. *Development* **131**, 5825-35.
- Locke, M. (1959). The cuticular pattern in an insect, *Rhodnius prolixus* Stal. *J exp Biol* **36**, 459-477.
- 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.
- Lunde, K., Biehs, B., Nauber, U., and Bier, E. (1998). The knirps and knirps-related genes organize development of the second wing vein in *Drosophila*. *Development* **125**, 4145-54.
- 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.
- Marcus, J. M. (2001). The development and evolution of crossveins in insect wings. *J Anat* **199**, 211-6.
- Mardon, G., Solomon, N. M., and Rubin, G. M. (1994). dachshund encodes a nuclear protein required for normal eye and leg development in *Drosophila*. *Development* **120**, 3473-86.
- Marques, G., Haerry, T. E., Crotty, M. L., Xue, M., Zhang, B., and O'Connor, M. B. (2003). Retrograde Gbb signaling through the Bmp type 2 receptor wishful thinking regulates systemic FMRFa expression in *Drosophila*. *Development* **130**, 5457-70.

- Marques, G., Musacchio, M., Shimell, M. J., Wunnenberg-Stapleton, K., Cho, K. W., and O'Connor, M. B. (1997). Production of a DPP activity gradient in the early *Drosophila* embryo through the opposing actions of the SOG and TLD proteins. *Cell* **91**, 417-26.
- Martin, F. A., Perez-Garijo, A., Moreno, E., and Morata, G. (2004). The brinker gradient controls wing growth in *Drosophila*. *Development* **131**, 4921-30.
- Martin-Blanco, E., Pastor-Pareja, J. C., and Garcia-Bellido, A. (2000). JNK and decapentaplegic signaling control adhesiveness and cytoskeleton dynamics during thorax closure in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 7888-93.
- Martin-Blanco, E., Roch, F., Noll, E., Baonza, A., Duffy, J. B., and Perrimon, N. (1999). A temporal switch in DER signaling controls the specification and differentiation of veins and interveins in the *Drosophila* wing. *Development* **126**, 5739-47.
- Marty, T., Muller, B., Basler, K., and Affolter, M. (2000). Schnurri mediates Dpp-dependent repression of brinker transcription. *Nat Cell Biol* **2**, 745-9.
- Mason, E. D., Konrad, K. D., Webb, C. D., and Marsh, J. L. (1994). Dorsal midline fate in *Drosophila* embryos requires twisted gastrulation, a gene encoding a secreted protein related to human connective tissue growth factor. *Genes Dev* **8**, 1489-501.
- Massague, J. (1990). The transforming growth factor-beta family. *Annu Rev Cell Biol* **6**, 597-641.
- Maves, L., and Schubiger, G. (1998). A molecular basis for transdetermination in *Drosophila* imaginal discs: interactions between wingless and decapentaplegic signaling. *Development* **125**, 115-24.
- Maxton-Küchenmeister, J., Handel, K., Schmidt-Ott, U., Roth, S., and Jäckle, H. (1999). Toll homologue expression in the beetle *Tribolium* suggests a different mode of dorsoventral patterning than in *Drosophila* embryos. *Mech Dev* **83**, 107-14.
- McCabe, B. D., Marques, G., Haghghi, A. P., Fetter, R. D., Crotty, M. L., Haerry, T. E., Goodman, C. S., and O'Connor, M. B. (2003). The BMP homolog Gbb provides a retrograde signal that regulates synaptic growth at the *Drosophila* neuromuscular junction. *Neuron* **39**, 241-54.
- Meinhardt, H. (2001). Organizer and axes formation as a self-organizing process. *Int J Dev Biol* **45**, 177-88.
- Merkin, J. H., and Sleeman, B. D. (2005). On the spread of morphogens. *J Math Biol* **51**, 1-17.
- Mikulski, C. (2004). Funktionelle Analysen zygotischer dorsoventral Gene in *Tribolium castaneum*. Institut für Entwicklungsbiologie, Universität zu Köln.

- Milan, M., Campuzano, S., and Garcia-Bellido, A. (1996). Cell cycling and patterned cell proliferation in the wing primordium of *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 640-5.
- Millet, C., Lemaire, P., Orsetti, B., Guglielmi, P., and Francois, V. (2001). The human chordin gene encodes several differentially expressed spliced variants with distinct BMP opposing activities. *Mech Dev* **106**, 85-96.
- Mirth, C., and Akam, M. (2002). Joint development in the *Drosophila* leg: cell movements and cell populations. *Dev Biol* **246**, 391-406.
- Misra, S., Hecht, P., Maeda, R., and Anderson, K. V. (1998). Positive and negative regulation of Easter, a member of the serine protease family that controls dorsal-ventral patterning in the *Drosophila* embryo. *Development* **125**, 1261-7.
- Miya, T., Morita, K., Ueno, N., and Satoh, N. (1996). An ascidian homologue of vertebrate BMPs-5-8 is expressed in the midline of the anterior neuroectoderm and in the midline of the ventral epidermis of the embryo. *Mech Dev* **57**, 181-90.
- Morisato, D., and Anderson, K. V. (1994). The spatzle gene encodes a component of the extracellular signaling pathway establishing the dorsal-ventral pattern of the *Drosophila* embryo. *Cell* **76**, 677-88.
- Moser, M., and Campbell, G. (2005). Generating and interpreting the Brinker gradient in the *Drosophila* wing. *Dev Biol*.
- Muller, B., Hartmann, B., Pyrowolakis, G., Affolter, M., and Basler, K. (2003). Conversion of an extracellular Dpp/BMP morphogen gradient into an inverse transcriptional gradient. *Cell* **113**, 221-33.
- Nagy, L. M., and Carroll, S. (1994). Conservation of wingless patterning functions in the short-germ embryos of *Tribolium castaneum*. *Nature* **367**, 460-3.
- Nellen, D., Burke, R., Struhl, G., and Basler, K. (1996). Direct and long-range action of a DPP morphogen gradient. *Cell* **85**, 357-68.
- Neul, J. L., and Ferguson, E. L. (1998). Spatially restricted activation of the SAX receptor by SCW modulates DPP/TKV signaling in *Drosophila* dorsal-ventral patterning. *Cell* **95**, 483-94.
- Nguyen, M., Park, S., Marques, G., and Arora, K. (1998a). Interpretation of a BMP activity gradient in *Drosophila* embryos depends on synergistic signaling by two type I receptors, SAX and TKV. *Cell* **95**, 495-506.
- Nguyen, M., Parker, L., and Arora, K. (2000). Identification of maverick, a novel member of the TGF-beta superfamily in *Drosophila*. *Mech Dev* **95**, 201-6.

- Nguyen, V. H., Schmid, B., Trout, J., Connors, S. A., Ekker, M., and Mullins, M. C. (1998b). Ventral and lateral regions of the zebrafish gastrula, including the neural crest progenitors, are established by a *bmp2b*/swirl pathway of genes. *Dev Biol* **199**, 93-110.
- Nishimatsu, S., and Thomsen, G. H. (1998). Ventral mesoderm induction and patterning by bone morphogenetic protein heterodimers in *Xenopus* embryos. *Mech Dev* **74**, 75-88.
- Niwa, N., Inoue, Y., Nozawa, A., Saito, M., Misumi, Y., Ohuchi, H., Yoshioka, H., and Noji, S. (2000). Correlation of diversity of leg morphology in *Gryllus bimaculatus* (cricket) with divergence in *dpp* expression pattern during leg development. *Development* **127**, 4373-81.
- Nohe, A., Hassel, S., Ehrlich, M., Neubauer, F., Sebald, W., Henis, Y. I., and Knaus, P. (2002). The mode of bone morphogenetic protein (BMP) receptor oligomerization determines different BMP-2 signaling pathways. *J Biol Chem* **277**, 5330-8.
- O'Connor, M. B., Umulis, D., Othmer, H. G., and Blair, S. S. (2006). Shaping BMP morphogen gradients in the *Drosophila* embryo and pupal wing. *Development* **133**, 183-93.
- Padgett, R. W., St Johnston, R. D., and Gelbart, W. M. (1987). A transcript from a *Drosophila* pattern gene predicts a protein homologous to the transforming growth factor-beta family. *Nature* **325**, 81-4.
- Pai, C. Y., Kuo, T. S., Jaw, T. J., Kurant, E., Chen, C. T., Bessarab, D. A., Salzberg, A., and Sun, Y. H. (1998). The Homothorax homeoprotein activates the nuclear localization of another homeoprotein, extradenticle, and suppresses eye development in *Drosophila*. *Genes Dev* **12**, 435-46.
- Pallavi, S. K., and Shashidhara, L. S. (2005). Signaling interactions between squamous and columnar epithelia of the *Drosophila* wing disc. *J Cell Sci* **118**, 3363-70.
- Panganiban, G. E., Reuter, R., Scott, M. P., and Hoffmann, F. M. (1990). A *Drosophila* growth factor homolog, decapentaplegic, regulates homeotic gene expression within and across germ layers during midgut morphogenesis. *Development* **110**, 1041-50.
- Pavlopoulos, A., Berghammer, A. J., Averof, M., and Klingler, M. (2004). Efficient transformation of the beetle *Tribolium castaneum* using the Minos transposable element: quantitative and qualitative analysis of genomic integration events. *Genetics* **167**, 737-46.
- Pilot, F., and Lecuit, T. (2005). Compartmentalized morphogenesis in epithelia: from cell to tissue shape. *Dev Dyn* **232**, 685-94.
- Pincus, M. J., Pletcher, M. T., Missios, S., and Doctor, J. S. The *gbb* gene of the red flour beetle, *Tribolium castaneum*, is a member of the TGF- β superfamily related to BMPs - 6, -7, and -8, Pittsburgh, Manuskript.

- Posakony, L. G., Raftery, L. A., and Gelbart, W. M. (1990). Wing formation in *Drosophila melanogaster* requires decapentaplegic gene function along the anterior-posterior compartment boundary. *Mech Dev* **33**, 69-82.
- Prpic, N. M. (2004a). Homologs of wingless and decapentaplegic display a complex and dynamic expression profile during appendage development in the millipede *Glomeris marginata* (Myriapoda: Diplopoda). *Front Zool* **1**, 6.
- Prpic, N.-M. (2004b). Vergleichende Studien zur Gliedmaßenentwicklung bei Arthropoden. In "Institut für Genetik". Universität zu Köln, Köln.
- Prpic, N. M., Janssen, R., Damen, W. G., and Tautz, D. (2005). Evolution of dorsal-ventral axis formation in arthropod appendages: H15 and optomotor-blind/bifid-type T-box genes in the millipede *Glomeris marginata* (Myriapoda: Diplopoda). *Evol Dev* **7**, 51-7.
- Prpic, N. M., Janssen, R., Wigand, B., Klingler, M., and Damen, W. G. (2003). Gene expression in spider appendages reveals reversal of *exd/hth* spatial specificity, altered leg gap gene dynamics, and suggests divergent distal morphogen signaling. *Dev Biol* **264**, 119-40.
- Prpic, N. M., and Tautz, D. (2003). The expression of the proximodistal axis patterning genes *Distal-less* and *dachshund* in the appendages of *Glomeris marginata* (Myriapoda: Diplopoda) suggests a special role of these genes in patterning the head appendages. *Dev Biol* **260**, 97-112.
- 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.
- Pyrowolakis, G., Hartmann, B., Muller, B., Basler, K., and Affolter, M. (2004). A Simple Molecular Complex Mediates Widespread BMP-Induced Repression during *Drosophila* Development. *Dev Cell* **7**, 229-40.
- Ralston, A., and Blair, S. S. (2005). Long-range Dpp signaling is regulated to restrict BMP signaling to a crossvein competent zone. *Dev Biol* **280**, 187-200.
- Ramain, P., Heitzler, P., Haenlin, M., and Simpson, P. (1993). *pannier*, a negative regulator of *achaete* and *scute* in *Drosophila*, encodes a zinc finger protein with homology to the vertebrate transcription factor GATA-1. *Development* **119**, 1277-91.
- Ramirez-Weber, F. A., and Kornberg, T. B. (1999). Cytonemes: cellular processes that project to the principal signaling center in *Drosophila* imaginal discs. *Cell* **97**, 599-607.
- Rauskolb, C. (2001). The establishment of segmentation in the *Drosophila* leg. *Development* **128**, 4511-21.
- Ray, R. P., Arora, K., Nusslein-Volhard, C., and Gelbart, W. M. (1991). The control of cell fate along the dorsal-ventral axis of the *Drosophila* embryo. *Development* **113**, 35-54.

- Ray, R. P., and Wharton, K. A. (2001a). Context-dependent relationships between the BMPs *gbb* and *dpp* during development of the *Drosophila* wing imaginal disk. *Development* **128**, 3913-25.
- Ray, R. P., and Wharton, K. A. (2001b). Twisted perspective: new insights into extracellular modulation of BMP signaling during development. *Cell* **104**, 801-4.
- Ricos, M. G., Harden, N., Sem, K. P., Lim, L., and Chia, W. (1999). *Dcdc42* acts in TGF-beta signaling during *Drosophila* morphogenesis: distinct roles for the *Drac1/JNK* and *Dcdc42/TGF-beta* cascades in cytoskeletal regulation. *J Cell Sci* **112** (Pt 8), 1225-35.
- Rieckhof, G. E., Casares, F., Ryoo, H. D., Abu-Shaar, M., and Mann, R. S. (1997). Nuclear translocation of extradenticle requires homothorax, which encodes an extradenticle-related homeodomain protein. *Cell* **91**, 171-83.
- Riesgo-Escovar, J. R., and Hafen, E. (1997a). Common and distinct roles of *DFos* and *DJun* during *Drosophila* development. *Science* **278**, 669-72.
- Riesgo-Escovar, J. R., and Hafen, E. (1997b). *Drosophila* Jun kinase regulates expression of decapentaplegic via the ETS-domain protein *Aop* and the AP-1 transcription factor *DJun* during dorsal closure. *Genes Dev* **11**, 1717-27.
- Rogulja, D., and Irvine, K. D. (2005). Regulation of cell proliferation by a morphogen gradient. *Cell* **123**, 449-61.
- Roth, S. (2003). The origin of dorsoventral polarity in *Drosophila*. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **358**, 1317-29; discussion 1329.
- Roth, S., Stein, D., and Nusslein-Volhard, C. (1989). A gradient of nuclear localization of the dorsal protein determines dorsoventral pattern in the *Drosophila* embryo. *Cell* **59**, 1189-202.
- Ruberte, E., Marty, T., Nellen, D., Affolter, M., and Basler, K. (1995). An absolute requirement for both the type II and type I receptors, *punt* and *thick veins*, for *dpp* signaling in vivo. *Cell* **80**, 889-97.
- Rusch, J., and Levine, M. (1994). Regulation of the dorsal morphogen by the Toll and torso signaling pathways: a receptor tyrosine kinase selectively masks transcriptional repression. *Genes Dev* **8**, 1247-57.
- Rushlow, C., Colosimo, P. F., Lin, M. C., Xu, M., and Kirov, N. (2001). Transcriptional regulation of the *Drosophila* gene *zen* by competing Smad and Brinker inputs. *Genes Dev* **15**, 340-51.
- Rushlow, C. A., Han, K., Manley, J. L., and Levine, M. (1989). The graded distribution of the dorsal morphogen is initiated by selective nuclear transport in *Drosophila*. *Cell* **59**, 1165-77.

- Rusten, T. E., Cantera, R., Kafatos, F. C., and Barrio, R. (2002). The role of TGF beta signaling in the formation of the dorsal nervous system is conserved between *Drosophila* and chordates. *Development* **129**, 3575-84.
- Samakovlis, C., Hacohen, N., Manning, G., Sutherland, D. C., Guillemin, K., and Krasnow, M. A. (1996). Development of the *Drosophila* tracheal system occurs by a series of morphologically distinct but genetically coupled branching events. *Development* **122**, 1395-407.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989). "Molecular Cloning." Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.
- Sambrook, J., Russell, D.W. (2001). "Molecular Cloning." Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.
- Sanchez-Salazar, J., Pletcher, M. T., Bennett, R. L., Brown, S. J., Dandamudi, T. J., Denell, R. E., and Doctor, J. S. (1996). The *Tribolium* decapentaplegic gene is similar in sequence, structure and expression to the *Drosophila* dpp gene. *Dev Genes Evol* **206**, 237-246.
- Sanicola, M., Sekelsky, J., Elson, S., and Gelbart, W. M. (1995). Drawing a stripe in *Drosophila* imaginal disks: negative regulation of decapentaplegic and patched expression by engrailed. *Genetics* **139**, 745-56.
- Sasai, Y., Lu, B., Steinbeisser, H., and De Robertis, E. M. (1995). Regulation of neural induction by the Chd and Bmp-4 antagonistic patterning signals in *Xenopus*. *Nature* **376**, 333-6.
- Schmid, B., Furthauer, M., Connors, S. A., Trout, J., Thisse, B., Thisse, C., and Mullins, M. C. (2000). Equivalent genetic roles for *bmp7/snailhouse* and *bmp2b/swirl* in dorsoventral pattern formation. *Development* **127**, 957-67.
- Schoppmeier, M., and Schröder, R. (2005). Maternal Torso-signaling controls body axis elongation in a short germ insect. *Current Biology* **in press**.
- Schröder, R. (2006). *vasa* mRNA accumulates at the posterior pole during blastoderm formation in the flour beetle *Tribolium castaneum*. *Dev Genes Evol* **216**, 277-83.
- Schröder, R. (2003). The genes *orthodenticle* and *hunchback* substitute for *bicoid* in the beetle *Tribolium*. *Nature* **422**, 621-5.
- Schröder, R., Eckert, C., Wolff, C., and Tautz, D. (2000). Conserved and divergent aspects of terminal patterning in the beetle *Tribolium castaneum*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 6591-6.
- Schwyster, D. H., Huang, J. D., Dubnicoff, T., and Courey, A. J. (1995). The decapentaplegic core promoter region plays an integral role in the spatial control of transcription. *Mol Cell Biol* **15**, 3960-8.

- Scuderi, A., and Letsou, A. (2005). Amnioserosa is required for dorsal closure in *Drosophila*. *Dev Dyn* **232**, 791-800.
- Segal, D., and Gelbart, W. M. (1985). Shortvein, a new component of the decapentaplegic gene complex in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **109**, 119-43.
- Serpe, M., Ralston, A., Blair, S. S., and O'Connor, M. B. (2005). Matching catalytic activity to developmental function: tolloid-related processes Sog in order to help specify the posterior crossvein in the *Drosophila* wing. *Development* **132**, 2645-56.
- Shi, Y., and Massague, J. (2003). Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell* **113**, 685-700.
- Shimell, M. J., Ferguson, E. L., Childs, S. R., and O'Connor, M. B. (1991). The *Drosophila* dorsal-ventral patterning gene tolloid is related to human bone morphogenetic protein 1. *Cell* **67**, 469-81.
- Shimmi, O., and O'Connor, M. B. (2003). Physical properties of Tld, Sog, Tsg and Dpp protein interactions are predicted to help create a sharp boundary in Bmp signals during dorsoventral patterning of the *Drosophila* embryo. *Development* **130**, 4673-82.
- Shimmi, O., Ralston, A., Blair, S. S., and O'Connor M, B. (2005a). The crossveinless gene encodes a new member of the Twisted gastrulation family of BMP-binding proteins which, with Short gastrulation, promotes BMP signaling in the crossveins of the *Drosophila* wing. *Dev Biol* **282**, 70-83.
- Shimmi, O., Ralston, A., Blair, S. S., and O'Connor, M. B. (2005b). The crossveinless gene encodes a new member of the Twisted gastrulation family of BMP-binding proteins which, with Short gastrulation, promotes BMP signaling in the crossveins of the *Drosophila* wing. *Dev Biol* **282**, 70-83.
- Shimmi, O., Umulis, D., Othmer, H., and O'Connor, M. B. (2005c). Facilitated transport of a Dpp/Scw heterodimer by Sog/Tsg leads to robust patterning of the *Drosophila* blastoderm embryo. *Cell* **120**, 873-86.
- Simin, K., Bates, E. A., Horner, M. A., and Letsou, A. (1998). Genetic analysis of punt, a type II Dpp receptor that functions throughout the *Drosophila melanogaster* life cycle. *Genetics* **148**, 801-13.
- Simpson, P., Woehl, R., and Usui, K. (1999). The development and evolution of bristle patterns in Diptera. *Development* **126**, 1349-64.
- Singer, M. A., Penton, A., Twombly, V., Hoffmann, F. M., and Gelbart, W. M. (1997). Signaling through both type I DPP receptors is required for anterior-posterior patterning of the entire *Drosophila* wing. *Development* **124**, 79-89.

- Soares, L. D., and Wharton, K. (2003). BMP ligands Gbb and Dpp, required for specification of mechanosensory bristles, influence the range of BMP activity differentially, *Dros Res Conf* 44, Chicago.
- Soares, L. D., and Wharton, K. (2005). A gbb-dependent transcriptional feedback mechanism is required to control Dpp levels during wing patterning, *Dros Res Conf* 46, San Diego.
- Sokoloff, A. (1972). "The Biology of Tribolium with Special Emphasis on Genetic Aspects." Oxford University Press, London.
- Song, X., Wong, M. D., Kawase, E., Xi, R., Ding, B. C., McCarthy, J. J., and Xie, T. (2004). Bmp signals from niche cells directly repress transcription of a differentiation-promoting gene, bag of marbles, in germline stem cells in the Drosophila ovary. *Development* **131**, 1353-64.
- Srinivasan, S., Rashka, K. E., and Bier, E. (2002). Creation of a Sog morphogen gradient in the Drosophila embryo. *Dev Cell* **2**, 91-101.
- St Johnston, R. D., and Gelbart, W. M. (1987). Decapentaplegic transcripts are localized along the dorsal-ventral axis of the Drosophila embryo. *Embo J* **6**, 2785-91.
- St Johnston, R. D., Hoffmann, F. M., Blackman, R. K., Segal, D., Grimaila, R., Padgett, R. W., Irick, H. A., and Gelbart, W. M. (1990). Molecular organization of the decapentaplegic gene in Drosophila melanogaster. *Genes Dev* **4**, 1114-27.
- Steward, R. (1989). Relocalization of the dorsal protein from the cytoplasm to the nucleus correlates with its function. *Cell* **59**, 1179-88.
- Stronach, B. E., and Perrimon, N. (2001). Investigation of leading edge formation at the interface of amnioserosa and dorsal ectoderm in the Drosophila embryo. *Development* **128**, 2905-13.
- Stultz, B. G., Ray, R. P., and Hursh, D. A. (2005). Analysis of the shortvein cis-regulatory region of the decapentaplegic gene of Drosophila melanogaster. *Genesis* **42**, 181-92.
- Sturtevant, M. A., Biehs, B., Marin, E., and Bier, E. (1997). The spalt gene links the A/P compartment boundary to a linear adult structure in the Drosophila wing. *Development* **124**, 21-32.
- Sulston, I. A., and Anderson, K. V. (1996). Embryonic patterning mutants of Tribolium castaneum. *Development* **122**, 805-14.
- Sutherland, D., Samakovlis, C., and Krasnow, M. A. (1996). branchless encodes a Drosophila FGF homolog that controls tracheal cell migration and the pattern of branching. *Cell* **87**, 1091-101.

- Sutherland, D. J., Li, M., Liu, X. Q., Stefancsik, R., and Raftery, L. A. (2003). Stepwise formation of a SMAD activity gradient during dorsal-ventral patterning of the *Drosophila* embryo. *Development* **130**, 5705-16.
- Suzuki, A., Kaneko, E., Maeda, J., and Ueno, N. (1997). Mesoderm induction by BMP-4 and -7 heterodimers. *Biochem Biophys Res Commun* **232**, 153-6.
- Tabata, T., and Takei, Y. (2004). Morphogens, their identification and regulation. *Development* **131**, 703-12.
- Takaesu, N. T., Johnson, A. N., Sultani, O. H., and Newfeld, S. J. (2002). Combinatorial signaling by an unconventional Wg pathway and the Dpp pathway requires Nejire (CBP/p300) to regulate dpp expression in posterior tracheal branches. *Dev Biol* **247**, 225-36.
- Tanimoto, H., Itoh, S., ten Dijke, P., and Tabata, T. (2000). Hedgehog creates a gradient of DPP activity in *Drosophila* wing imaginal discs. *Mol Cell* **5**, 59-71.
- Tautz, D. (1992). Redundancies, development and the flow of information. *Bioessays* **14**, 263-6.
- Tautz, D., Friedrich, M., and Schröder, R. (1994). Insect embryogenesis - what is ancestral and what is derived? *Development Suppl.*, 193.
- Tautz, D., and Pfeifle, C. (1989). A non-radioactive in situ hybridization method for the localization of specific RNAs in *Drosophila* embryos reveals translational control of the segmentation gene hunchback. *Chromosoma* **98**, 81-5.
- Teleman, A. A., and Cohen, S. M. (2000). Dpp gradient formation in the *Drosophila* wing imaginal disc. *Cell* **103**, 971-80.
- Tomoyasu, Y., and Denell, R. E. (2004). Larval RNAi in *Tribolium* (Coleoptera) for analyzing adult development. *Dev Genes Evol* **214**, 575-8.
- Tomoyasu, Y., Nakamura, M., and Ueno, N. (1998). Role of dpp signalling in prepattern formation of the dorsocentral mechanosensory organ in *Drosophila melanogaster*. *Development* **125**, 4215-24.
- Tomoyasu, Y., Ueno, N., and Nakamura, M. (2000). The decapentaplegic morphogen gradient regulates the notal wingless expression through induction of pannier and u-shaped in *Drosophila*. *Mech Dev* **96**, 37-49.
- Torres-Vazquez, J., Park, S., Warrior, R., and Arora, K. (2001). The transcription factor Schnurri plays a dual role in mediating Dpp signaling during embryogenesis. *Development* **128**, 1657-70.

- Torres-Vazquez, J., Warrior, R., and Arora, K. (2000). *schnurri* is required for dpp-dependent patterning of the *Drosophila* wing. *Dev Biol* **227**, 388-402.
- Turing, A. (1952). The Chemical Basis of Morphogenesis. *Phil. Trans. R. Soc. London* **B 237**, 37-72.
- Twombly, V., Blackman, R. K., Jin, H., Graff, J. M., Padgett, R. W., and Gelbart, W. M. (1996). The TGF-beta signaling pathway is essential for *Drosophila* oogenesis. *Development* **122**, 1555-65.
- van der Zee, M., Berns, N., and Roth, S. (2005). Distinct functions of the *Tribolium* *zerknüllt* genes in serosa specification and dorsal closure. *Curr Biol* **15**, 624-36.
- Vilmos, P., Sousa-Neves, R., Lukacsovich, T., and Marsh, J. L. (2005). *crossveinless* defines a new family of Twisted-gastrulation-like modulators of bone morphogenetic protein signalling. *EMBO Rep* **6**, 262-7.
- Vincent, J. P., and Dubois, L. (2002). Morphogen transport along epithelia, an integrated trafficking problem. *Dev Cell* **3**, 615-23.
- Wagner, G. P. (1996). Homologues, natural kinds and the evolution of modularity. *Am. Zool.* **36**, 36-43.
- Wang, Y. C., and Ferguson, E. L. (2005). Spatial bistability of Dpp-receptor interactions during *Drosophila* dorsal-ventral patterning. *Nature* **434**, 229-34.
- Wappner, P., Gabay, L., and Shilo, B. Z. (1997). Interactions between the EGF receptor and DPP pathways establish distinct cell fates in the tracheal placodes. *Development* **124**, 4707-16.
- Wharton, K. A., Cook, J. M., Torres-Schumann, S., de Castro, K., Borod, E., and Phillips, D. A. (1999). Genetic analysis of the bone morphogenetic protein-related gene, *gbb*, identifies multiple requirements during *Drosophila* development. *Genetics* **152**, 629-40.
- Wharton, K. A., Thomsen, G. H., and Gelbart, W. M. (1991). *Drosophila* 60A gene, another transforming growth factor beta family member, is closely related to human bone morphogenetic proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 9214-8.
- Wheeler, S. R., Carrico, M. L., Wilson, B. A., and Skeath, J. B. (2005). The *Tribolium* columnar genes reveal conservation and plasticity in neural precursor patterning along the embryonic dorsal-ventral axis. *Dev Biol* **279**, 491-500.
- Wilder, E. L., and Perrimon, N. (1995). Dual functions of *wingless* in the *Drosophila* leg imaginal disc. *Development* **121**, 477-88.
- Wilkins, A. S. (2002). "The Evolution of Developmental Pathways." Sinauer, Sunderland.

- Wimmer, E. A., Frommer, G., Purnell, B. A., and Jackle, H. (1996). buttonhead and D-Sp1: a novel *Drosophila* gene pair. *Mech Dev* **59**, 53-62.
- Winick, J., Abel, T., Leonard, M. W., Michelson, A. M., Chardon-Loriaux, I., Holmgren, R. A., Maniatis, T., and Engel, J. D. (1993). A GATA family transcription factor is expressed along the embryonic dorsoventral axis in *Drosophila melanogaster*. *Development* **119**, 1055-65.
- Winter, S. E., and Campbell, G. (2004). Repression of Dpp targets in the *Drosophila* wing by Brinker. *Development* **131**, 6071-81.
- Wolff, C., Sommer, R., Schröder, 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.
- Wolpert, L. (1969). Positional information and the spatial pattern of cellular differentiation. *J Theor Biol* **25**, 1-47.
- Wrana, J. L., Tran, H., Attisano, L., Arora, K., Childs, S. R., Massague, J., and O'Connor, M. B. (1994). Two distinct transmembrane serine/threonine kinases from *Drosophila melanogaster* form an activin receptor complex. *Mol Cell Biol* **14**, 944-50.
- Wu, J., and Cohen, S. M. (1999). Proximodistal axis formation in the *Drosophila* leg: subdivision into proximal and distal domains by Homothorax and Distal-less. *Development* **126**, 109-17.
- Xie, J., and Fisher, S. (2005). Twisted gastrulation enhances BMP signaling through chordin dependent and independent mechanisms. *Development* **132**, 383-91.
- Xie, T., and Spradling, A. C. (1998). decapentaplegic is essential for the maintenance and division of germline stem cells in the *Drosophila* ovary. *Cell* **94**, 251-60.
- Young, P. E., Richman, A. M., Ketchum, A. S., and Kiehart, D. P. (1993). Morphogenesis in *Drosophila* requires nonmuscle myosin heavy chain function. *Genes Dev* **7**, 29-41.
- Yu, K., Kang, K. H., Heine, P., Pyati, U., Srinivasan, S., Biehs, B., Kimelman, D., and Bier, E. (2004). Cysteine repeat domains and adjacent sequences determine distinct bone morphogenetic protein modulatory activities of the *Drosophila* Sog protein. *Genetics* **166**, 1323-36.
- Yu, K., Srinivasan, S., Shimmi, O., Biehs, B., Rashka, K. E., Kimelman, D., O'Connor, M. B., and Bier, E. (2000). Processing of the *Drosophila* Sog protein creates a novel BMP inhibitory activity. *Development* **127**, 2143-54.
- Yu, K., Sturtevant, M. A., Biehs, B., Francois, V., Padgett, R. W., Blackman, R. K., and Bier, E. (1996). The *Drosophila* decapentaplegic and short gastrulation genes function antagonistically during adult wing vein development. *Development* **122**, 4033-44.

Zecca, M., Basler, K., and Struhl, G. (1995). Sequential organizing activities of engrailed, hedgehog and decapentaplegic in the Drosophila wing. *Development* **121**, 2265-78.

Zeitlinger, J., and Bohmann, D. (1999). Thorax closure in Drosophila: involvement of Fos and the JNK pathway. *Development* **126**, 3947-56.

Zhu, W., Rawlins, B. A., Boachie-Adjei, O., Myers, E. R., Arimizu, J., Choi, E., Lieberman, J. R., Crystal, R. G., and Hidaka, C. (2004). Combined bone morphogenetic protein-2 and -7 gene transfer enhances osteoblastic differentiation and spine fusion in a rodent model. *J Bone Miner Res* **19**, 2021-32.

ERKLÄRUNG

Ich erkläre hiermit ehrenwörtlich, daß ich die vorliegende Dissertation „Bone Morphogenetic Proteins (BMP) in der Embryonalentwicklung von *Tribolium castaneum*“ selbst verfaßt und dabei keine anderen, als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen verwendet habe.

Ich erkläre weiterhin, daß ich nie versucht habe die vorliegende Dissertation in gleicher oder ähnlicher Form in einem Prüfungsverfahren vorzulegen.

Ich habe früher außer den mit dem Zulassungsantrag urkundlich vorgelegten Graden keine weiteren akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht.

München im August, 2006

Markus Weber

CURRICULUM VITAE

| | |
|---------------------|---|
| Geburtsdatum | 2. November 1968 |
| Geburtsort | Homburg/Saar |
| Staatsangehörigkeit | deutsch |
| Familienstand | verheiratet |
| 1975-1979 | Grundschule Kohlhof |
| 1979-1988 | Gymnasium am Krebsberg, Neunkirchen |
| 1988 | Abitur |
| 1988-1990 | Zivildienst |
| 1990-1995 | Studium der Biologie an der Universität des Saarlandes |
| 1995-1996 | Universidad Central de Venezuela, Facultad de Agronomía, Maracay Estación Biológica de Rancho Grande |
| 1996-1999 | Studium der Biologie an der Universität des Saarlandes Diplomarbeit am Institut für Humangenetik der Universität Würzburg |
| 1999 | Diplom in Biologie |
| 1999-2000 | Max-Planck-Institut für Neurobiologie, Martinsried |
| 2000-2006 | Promotion bei Prof. Dr. Martin Klingler am Institut für Zoologie der Ludwig-Maximilians-Universität, München und Institut für Zoologie der Friedrich-Alexander-Universität, Erlangen |