

# **Vergleichende Studien zur Gliedmaßenentwicklung bei Arthropoden**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Universität zu Köln

vorgelegt von  
Nikola-Michael Prpic  
aus München

Köln, 2004

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Diethard Tautz
2. Berichterstatter: Prof. Dr. Siegfried Roth

Tag der mündlichen Prüfung: 17. Juni 2004

## *Inhaltsverzeichnis*

Danksagung	1
Finanzielle Förderung	2
Abkürzungsverzeichnis	2
Zusammenfassung	6
Summary	7
<b>1. Einleitung</b>	<b>9</b>
<b>2. Material und Methoden</b>	<b>19</b>
2.1 Bakterienstämme und Plasmide	19
2.2 Verwendete Primer	19
2.3 Verwendete Genfragmente	21
2.4 Die Versuchstiere	22
2.5 Molekularbiologische Methoden	22
2.6 Embryologische Methoden	25
2.7 Präparation und Dokumentation	29
2.8 Versuchstierhaltung	30
2.9 Bioinformatik	31
<b>3. Ergebnisse</b>	<b>33</b>
3.1 Untersuchungen zur Musterbildung während der Achsenbildung	33
3.1.1 Gradienten-bildende Morphogene	33
3.1.2 Faktoren des dorso-ventralen Systems	50
3.1.2.1 T-box Gene in <i>Cupiennius</i> und <i>Glomeris</i>	50
3.1.2.2 Ergänzende Untersuchungen in anderen Arten	54

3.1.3 Die Bein-Gap-Gene	76
3.1.3.1 <i>Distal-less</i> und <i>dachshund</i>	76
3.1.3.2 <i>extradenticle</i> und <i>homothorax</i>	96
3.1.4 Die Bein-Segmentierungs-Gene	110
3.1.4.1 Der Notch-Signalweg und seine Effektoren	110
3.1.4.2 Ein neuer Signalweg bei der Beinsegmentierung: EGF-Rezeptor Signaling und <i>seven-up</i>	150
3.2 Untersuchungen zur Beinmorphogenese und –segmentierung	170
3.2.1 Über die Funktion von <i>seven-up</i> und die Rolle des EGF-Rezeptor Signalwegs	170
3.2.2 Zur Rolle des Notch-Signalwegs und seiner möglichen Effektoren	173
<b>4. Diskussion</b>	<b>195</b>
4.1 Zur evolutionären Konservierung der Musterbildungskaskade im Bein	195
4.1.1 Die Ebene der Morphogen-Gradienten	197
4.1.2 Die Bein-Gap-Gene	200
4.1.3 Die Bein-Segmentierungsgene	203
4.1.4 Ausblick	208
4.1.5 Implikationen für die Homologie von Beinsegmenten	211
4.1.6 Appendix: Dorso-ventrale Musterbildung im Bein	213
4.2 Zur Existenz morphogenetischer Zentren	214
4.2.1 Entdeckung von segmental wiederholten Wachstumszonen in den Beinen	214
4.2.2 Evidenzen für evolutionäre Konservierung der Wachstumszonen	217
4.3 Zur Verwendbarkeit der Expressionsdaten für die phylogenetische Forschung	218
4.3.1 Homologe Merkmale für die kladistische Rekonstruktion	219
4.3.2 Hinweise auf analoge Entwicklungen in der Gliedmaßen-evolution	225
4.3.3 Gefahren der Expressionsanalyse	229

4.4 Schlußbemerkungen über die Evolution der Extremitäten der Arthropoden	230
4.4.1 Die Gliedmaßen des Urarthropoden: der „default state appendage“	230
4.4.2 Der Ursprung der Gliedmaßen der Arthropoden	234
<b>5. Literatur</b>	<b>239</b>
Anhänge	261
Anhang 1: Einträge in der GenBank Datenbank	261
Anhang 2: Übrige Sequenzdaten	276
Anhang 3: Tabellarische Auswertungen der RNAi Versuche	290
Erklärung	293
Lebenslauf	294
Vollständiges Publikationsverzeichnis	295



## *Danksagung*

Die Arbeiten zur vorliegenden Dissertation wurden im Labor von Prof. Dr. Diethard Tautz durchgeführt. Ich bin ihm sehr dankbar dafür, daß er mir die Chance gab, das von mir bereits an der Universität in München begonnene Projekt in einem größeren Maßstab in Köln fortzuführen. Bei der Betreuung des Projekts gewährte er mir größtmögliche wissenschaftliche Freiheit. In entscheidenden Fragen konnte ich stets auf seinen Rat und seine Erfahrung bauen.

Die Arbeiten an *Cupiennius* sind in Kooperation mit PD Dr. Wim Damen durchgeführt worden. Auch ihm bin ich zu großem Dank verpflichtet. Besonders möchte ich mich für seine Hilfe in allen Laborfragen bedanken und dafür, daß er mich auch in den Lehrbetrieb mit eingebunden hat, was mir stets großen Spaß gemacht hat. Die Arbeiten an *Tribolium* sind in Kooperation mit Prof. Dr. Martin Klingler durchgeführt worden. Ich danke ihm und den Mitgliedern seiner Arbeitsgruppe für die Gastfreundschaft und Hilfsbereitschaft während der ersten Monate dieser Doktorarbeit in München.

Die Zielsuche der Anfangszeit wäre unmöglich gewesen ohne die Hilfe der nachfolgenden Personen: Arne Nolte, Detlev Arendt, Joachim Wittbrodt, Hans-Dieter Pfannenstiel, Hans-U. Dahms und Bertil Akesson. Herzlichen Dank für die gewährte Gastfreundschaft während meiner Aufenthalte in Oldenburg, Heidelberg und Berlin.

Mein besonderer Dank geht an all die vielen, vielen Kommilitonen des Tautz-Labors. Auch wenn der Platz nicht reicht um jedem einzeln zu danken, so waren die Tips, Hilfestellungen, Ratschläge und besonders der vielfältige Gedankenaustausch sehr wichtig für mich. Habt Dank dafür! Der vollzähligen Besetzung des 6. Stockwerks, Angelika Stollewerk, Diana Kadner, Hilary Dove, Mathias Weller, Michael Schoppmeier, Ralf Janssen, Gregor von Levetzow und Wim Damen, danke ich zusätzlich für die fröhliche Atmosphäre am „Lebensmittelpunkt Labor“. Hilary, Diana und Ralf leisteten außerdem Gesellschaft bei der Myriapodenjagd im Wald, und Michael hat einen Teil des Manuskripts durchgesehen.

Ein großes Dankeschön an Eva Siegmund, Gerti Meyer zu Altenschildesche und Heidi Fußwinkel für die Hilfe bei den bürokratischen Aspekten des Unilebens und an Viktoria Ryvkin, Kathrin Schwertz, Sandra Kühn, Susanne Krächter, Vladimir Simovic, Irene Steinfartz und Karin Otto für technische Assistenz im Laboralltag.

Und schließlich möchte ich meiner Mutter, meinem Vater, meinem Bruder und meinen Freunden danken, besonders Melanie Kimm, dafür, daß sie in den vergangenen vier Jahren eine ständige Stütze für mich waren.

## Finanzielle Förderung

Die Arbeiten zur vorliegenden Dissertation wurden zu erheblichen Teilen aus Fördermitteln der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) finanziert (Förderkennzeichen TA 99/19-1 und TA 99/19-2). Mit Ausnahme der Arbeiten an der Spinne *Cupiennius salei* mußten alle übrigen Arbeiten ohne vorherige Grundlage begonnen werden. Die dadurch bedingte lange Zeit der Fehl- und Rückschläge wäre ohne die finanzielle Unterstützung der DFG im Zeitrahmen einer Doktorarbeit nicht zu überbrücken gewesen. Ich danke den Projektgutachtern und Projektbetreuern für das in mich gesetzte Vertrauen.

## Abkürzungsverzeichnis

### Abkürzungen im Text und in den Abbildungslegenden

$\alpha$ -ph3	Antikörper gegen ph3	<i>Mc</i>	<i>Mysidium columbiae</i>
ac	anteriore Kappe	md	Mandibel
<i>Ag</i>	<i>Anopheles gambiae</i>	mdb	Mandibel
Amp	Ampicillin	<i>Mm</i>	<i>Mus musculus</i>
an	Antenne	mp	Molarplatte
ant	Antenne	mRNA	Boten-RNA
AP	alkaline Phosphatase	mt	Metatarsus
<i>Ar</i>	<i>Athalia rosae</i>	mx	Maxille
<i>At</i>	<i>Achaearanea tepidariorum</i>	NBT	Nitroblautetrazoliumchlorid
ATP	Adenosintriphosphat	NES	nukleäres Exportsignal
av	Analklappen	NLS	nukleäres Importsignal
<i>Ba</i>	<i>Bicyclus anynana</i>	o1-o5	opisthosomales Segment 1-5
BCIP	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-phosphat	oc	Sehzentrum
<i>Bf</i>	<i>Branchiostoma floridae</i>	ol	Externlappen der Mandibel
<i>Bm</i>	<i>Bombyx mori</i>	PBS	phosphatgepufferte Saline
BrdU	5-Bromo-2'-deoxy-uridin	PBST	phosphatgepufferte Saline mit Tween-20



bs	Basis	<i>Pf</i>	<i>Ptychodera flava</i>
BSA	bovines Albumin	ph3	phosphoryliertes Histon3
cDNA	copyDNA	pl	Kammlamelle
<i>Ce</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>	<i>Pm</i>	<i>Petromyzon marinus</i>
ch/Ch	Bei <i>Glomeris</i> : Backenteil der Mandibel Bei <i>Cupiennius</i> : Chelicere	pmx	Postmaxillarsegment
che	Chelicere	PNK	Polynukleotidkinase
co	Koexpression	PNS	peripheres Nervensystem
<i>Cs</i>	<i>Cupiennius salei</i>	pp/Pp	Pedipalpus
cx	Coxa	<i>Ps</i>	<i>Porcellio scaber</i>
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol Dihydrochlorid	pt	Patella
dig, Dig	Digoxigenin	RACE	rapid amplification of cDNA ends
<i>Dm</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>	RNA	Ribonukleinsäure
DNA	Desoxyribonukleinsäure	RNAi	RNA Interferenz
dNTP	Desoxyribonukleotide	RTK	Rezeptor-Tyrosinkinase
<i>Dr</i>	<i>Danio rerio</i>	<i>Sa</i>	<i>Schistocerca americana</i>
dsRNA	Doppelstrang-RNA	sc	Sinneszapfen
dUTP	Desoxyuridintriphosphat	<i>Sg</i>	<i>Schistocerca gregaria</i>
DV	dorsal-ventral	sp	Sinnespalpen
<i>Ef</i>	<i>Ephydatia fluviatilis</i>	<i>Sp</i>	<i>Strongylocentrotus purpuratus</i>
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor	SSC	Natriumzitat-Saline
fa	Klaue	ssRNA	Einzelstrang-RNA
fe	Femur	st	Stomodäum
<i>Gb</i>	<i>Gryllus bimaculatus</i>	<i>St</i>	<i>Steatoda triangulosa</i>
GFP	green fluorescent protein	st0-st6.1	Entwicklungsstadien 0-6.1
<i>Gg</i>	<i>Gallus gallus</i>	T1-T3	Thoraxsegment 1-3
<i>Gm</i>	<i>Glomeris marginata</i>	t1-t8	Rumpfbeinpaar 1-8
gn	Gnathendit	ta	Tarsus
hnE	Stunden nach Eiablage	<i>Ta</i>	<i>Tegenaria atrica</i>
il	Internlappen der Mandibel	TALE	three amino acid loop extension
		<i>Tc</i>	<i>Tribolium castaneum</i>

i/ot	innerer und äußerer Zahn	TdT	terminale Transferase
ip	Zwischenstück	TE	Tris-EDTA
<i>Jc</i>	<i>Junonia coenia</i>	TEA	Triethanolamin
11-14/L1-L4	Laufbeinpaar 1-4	ti	Tibia
<i>La</i>	<i>Lithobius atkinsoni</i>	tl	Telson
lb/Lb	Bei <i>Glomeris</i> , <i>Cupiennius</i> : Labrum	<i>Tl</i>	<i>Triops longicaudatus</i>
	Bei <i>Tribolium</i> : Labium	tr	Trochanter
lbr	Labrum	tRNA	Transfer-RNA
leg	lokomotorisches Bein	TUNEL	terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick-end labeling
li	Lobi interiori	UTR	untranslated region
lr	Labrum	UV	ultraviolett
<i>Lv</i>	<i>Lytechinus variegatus</i>	<i>Xl</i>	<i>Xenopus laevis</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion	ZNS	Zentralnervensystem
PD	proximal-distal		
ped	Pedipalpus		
max	Maxille		

#### Maße, Gewichte und andere Einheiten

bp	Basenpaar	mmol	Millimol
g	Gramm	mM	millimolar
h	Stunde	$\mu\text{g}$	Mikrogramm
hnE	Stunden nach Eiablage	$\mu\text{l}$	Mikroliter
kb	Kilobasenpaare	$\mu\text{mol}$	Mikromol
l	Liter	$\mu\text{M}$	mikromolar
M	molar	N	normal
mg	Milligramm	sec	Sekunde
min	Minute	U	Enzymeinheit (Unit)
ml	Milliliter	$^{\circ}\text{C}$	Grad Celsius

### Kurzbezeichnungen für Gene

<i>Antp</i>	<i>Antennapedia</i>	<i>fj</i>	<i>four-jointed</i>
<i>AP-2</i>	<i>Activator Protein-2</i>	<i>fng</i>	<i>fringe</i>
<i>bab</i>	<i>bric-a-brac</i>	<i>h</i>	<i>hairy</i>
<i>dac</i>	<i>dachshund</i>	<i>hth</i>	<i>homothorax</i>
<i>Dl</i>	<i>Delta</i>	<i>N</i>	<i>Notch</i>
<i>Dll</i>	<i>Distal-less</i>	<i>nub</i>	<i>nubbin</i>
<i>Dll1-4</i>	<i>Delta-like1-4</i>	<i>odd</i>	<i>odd-skipped</i>
<i>dpp</i>	<i>decapentaplegic</i>	<i>omb</i>	<i>optomotor-blind</i>
<i>Egfr</i>	<i>Epidermal growth factor receptor</i>	<i>Ser</i>	<i>Serrate</i>
<i>E(spl)</i>	<i>Enhancer of split</i>	<i>ss</i>	<i>spineless</i>
<i>exd</i>	<i>extradenticle</i>	<i>svp</i>	<i>seven-up</i>
		<i>wg</i>	<i>wingless</i>

## Zusammenfassung

Die Gliedmaßen der Arthropoden (die Arthropodien) sind seit jeher ein wichtiger Merkmalskomplex für die phylogenetische Forschung. Ziel dieser Arbeit war es, die molekularen Mechanismen der Beinentwicklung in mehreren Arthropodenarten vergleichend zu untersuchen. Auf diese Weise sollten konservierte und divergente Aspekte der Beinentwicklung beleuchtet werden und nach Anhaltspunkten gesucht werden, die Aufschlüsse über die Stammesgeschichte der Arthropoden geben können.

In *Drosophila* existiert eine hierarchische, dreischichtige Genkaskade, welche das Beinwachstum und die Beinsegmentierung steuert. Homologe Gene zu allen drei Ebenen dieser Genkaskade wurden aus dem Tausendfüßer *Glomeris marginata* und der Kammspinne *Cupiennius salei* isoliert und untersucht; ergänzende Studien wurden auch mit dem Mehlkäfer *Tribolium castaneum*, der Taufliege *Drosophila melanogaster* und der Hausspinne *Tegenaria atrica* durchgeführt. Es zeigte sich, daß bezüglich aller Genexpressionen Unterschiede zwischen den Arten existieren. Allerdings sprechen die vorliegenden Daten trotzdem für eine Konservierung der Genkaskade innerhalb der Arthropoden. Die Feinjustierung innerhalb der Genkaskade ist aber offensichtlich in den unterschiedlichen Arthropodengruppen jeweils anders geregelt. Auf Grund dieser Tatsache wird dem Gedanken eine Absage erteilt, daß die Beinsegmente verschiedener Beintypen und Arthropodenklassen miteinander direkt oder seriell homologisiert werden können.

Daneben wurde die Morphogenese der Beine von *Cupiennius* näher untersucht. Es zeigte sich, daß in der Nähe der entstehenden Gelenke Wachstumszonen existieren, deren Aktivität offenbar durch den *Notch*- und den *Egfr*-Signalweg, zwei wichtige Signalwege, gesteuert wird. Obwohl zu den Wachstumszonen bislang nur wenig vergleichende Daten vorliegen, deutet manches darauf hin, daß auch diese morphogenetischen Zentren innerhalb der Arthropoden konserviert sind.

Auf der Basis der gewonnenen Daten wird schließlich gezeigt, wie damit neue Homologie- und Stammbaumhypothesen postuliert werden können. Dies zeigt zugleich wie lückenhaft unser Wissen über die Evolution der Gliedmaßen bei Arthropoden noch immer ist. Der Ursprung der Arthropodien und die Beschaffenheit des Urarthropodiums bleiben auch weiterhin offene Fragen der Phylogenetik.

## Summary

The appendages of the arthropods (termed arthropodia) have been and still are an important character complex in phylogenetic research. The aim of this work was to comparatively study the molecular mechanisms of leg development in a variety of arthropod species, in search of conserved and divergent aspects of this process and of clues to the phylogeny of the arthropods.

In *Drosophila* there is a hierarchic, three-level gene cascade guiding leg development and leg segmentation. Homologous genes from all three levels of the cascade have been isolated from and studied in the myriapod *Glomeris marginata* and the ctenid spider *Cupiennius salei*; supplementary studies have been performed on the flour beetle *Tribolium castaneum*, the fruitfly *Drosophila melanogaster*, and the house spider *Tegenaria atrica*. Between all species differences were discovered in the expression profiles of all studied genes. Nevertheless, the present data suggest that the gene cascade is conserved among all arthropods. The fine adjustments within the cascade, however, appear to be regulated differently in the different arthropod groups. Because of this the notion is rejected, that leg segments of different appendage types or arthropod classes can be homologized.

Furthermore leg morphogenesis was studied in more detail in the spider *Cupiennius salei*. This led to the identification of growth zones localized in the vicinity of the developing leg joints. The proliferative activity of the growth zones apparently is controlled by two major signaling pathways, namely the *Notch* and *Egfr* pathways. Although there are only few studies regarding the growth zones there is evidence for these morphogenetic centers to be conserved among the arthropods.

Finally, on the basis of the present results it is demonstrated how the data can be utilized in order to propose novel homology hypotheses and new phylogenies. At the same time these attempts serve to demonstrate the persisting incompleteness of our knowledge on the evolution of arthropod appendages. The origin of the arthropodium and the nature of the first arthropodium (the „ur-arthropodium“) remain open questions in phylogenetic research.



### *1. Einleitung*

Die Gliederfüßer oder Arthropoden sind die arten- und individuenreichste Tiergruppe unseres Planeten. Ihre erstaunliche Formenvielfalt und ihr Anpassungsvermögen haben es ihnen erlaubt in alle Bereiche vorzudringen, in denen tierisches Leben möglich ist. Arthropoden leben im ewigen Eis der Pole, in untermeerischen Höhlen, in der Nachbarschaft vulkanischer Schloten der Tiefsee, im Grundwasser tief unter der Erde und in den trockensten Wüstengebieten. Sie leben in Süß- und Salzwasser, haben das Land und die Luft erobert- und natürlich finden sie sich auch an Orten, die uns Menschen mehr vertraut sind als Tiefseeschlote: in unseren Häusern, unseren Betten und manchmal als Parasiten sogar an oder in uns selbst.

Es überrascht daher kaum, daß die Frage nach dem Ursprung und der Evolution einer so wichtigen Tiergruppe einen nicht unerheblichen Teil der phylogenetischen Forschung in Anspruch nimmt. Man teilt heute die Vielfalt der Arten meist in vier große Gruppen (Klassen) ein: die Spinnentiere (Chelicerata), die Krebstiere (Crustacea), die Tausendfüßer (Myriapoda) und die Insekten (Insecta). Doch schon diese grobe Einteilung ist umstritten und noch heftiger wird um die verwandtschaftlichen Beziehungen der einzelnen Arthropodengruppen gestritten (Averof und Akam, 1995; Budd, 1996a). Dazu kommen noch unzählige Fossilfunde, die keiner heutigen Gruppierung zuzuordnen sind und die somit noch mehr Fragen aufwerfen (Bergström, 1979, 1980; Whittington, 1981; Edgecombe, 1998; Budd, 2002).

Die weithin akzeptierte Anschauung ist, daß die Arthropoden von segmentierten Würmern (also Anneliden) abstammen, oder von anderen segmentierten Tieren wie z.B. Onychophoren (Stummelfüßer). Eine immer wieder geäußerte Idee ist, daß die einzelnen Klassen wie sie oben genannt wurden unabhängig voneinander aus Wurmvorfahren hervorgegangen sind (Polyphyly der Arthropoden und Uniramia-Hypothese; z.B. Manton, 1977; Anderson 1979; Fryer, 1996, 1997). Diese Hypothese stützt sich zum einen auf die Funktionsmorphologie der Kaugliedmaßen (Mandibel) und zum anderen auf den Bau der Laufbeine. Dabei wird davon ausgegangen, daß sich die zweiästigen Beine der Crustaceen aus den ebenfalls zweiästigen Beinen der Anneliden entwickelt haben; die einästigen Beine

der Insekten und Myriapoden sollen aber aus den ebenfalls einästigen Beinen von Onychophoren hervorgegangen sein. Die Mehrzahl der Autoren lehnt diese Idee jedoch ab, mit dem Hinweis auf die Vielzahl an Gemeinsamkeiten der heutigen Arthropoden, die im Falle der Polyphyly alle konvergent entstanden sein müssten. In der klassischen speziellen Zoologie fasst man die Arthropoda als Ganzes und die vier Klassen Chelicerata, Crustacea, Myriapoda und Insecta meist als Monophyla auf (siehe z.B. Weygoldt, 1979; Paulus, 1996). Allerdings muß erwähnt werden, daß die Monophylie sowohl der Myriapoda als auch der Crustacea umstritten ist (z.B. Kraus, 1993, 1997; Dohle, 1974, 1980; Paulus, 2000; Dahms, 2000; Klass und Kristensen, 2001). Myriapoda und Insecta bilden zusammen die Gruppe der Antennata (auch als Tracheata oder Atelocerata bezeichnet). Sie werden gekennzeichnet durch den Verlust der Gliedmaßen am Interkalarsegment (das bei den Myriapoda als Prämandibularsegment bezeichnet wird), wodurch nur ein Paar Antennen vorhanden ist. Des weiteren werden als Kennzeichen der Antennata manchmal der Besitz von Tracheen und ektodermalen Malpighischen Gefäßen genannt. Die Antennata werden mit den Crustacea zu den Mandibulata zusammengefaßt, die sich durch den Besitz von Mandibeln auszeichnen (Snodgrass, 1938); das bedeutet, daß am dritten Kopfsegment (von vorne gezählt) die Gliedmaßen zu Kauwerkzeugen (Mandibeln) umgestaltet sind. Die Frage jedoch ob die Crustacea und die Antennata aus einem gemeinsamen Vorfahr hervorgegangen sind oder ob die Antennata ein Seitenzweig der Crustacea sind (Paraphylie der Crustacea) wird in der klassischen systematischen Zoologie sehr kontrovers diskutiert (siehe Literaturangaben oben). Gegen die Paraphylie werden oft folgende drei Apomorphien für die Crustacea angeführt (Schminke, 1996; Walossek und Müller, 1997): die Coxa aller Gliedmaßen (außer der 1. Antenne) wird aus einem Enditen gebildet; die 1. Antenne ist nicht geißelförmig; zumindest einige Gliedmaßen besitzen einen Außenast (Exopodit). Als Schwestergruppe der Mandibulata bleiben nach dieser Vorstellung die Chelicerata übrig, die somit die ursprünglichste Arthropodengruppe darstellen (Lauterbach, 1980a,b).

Ein konkurrierender Ansatz, der als Schizoramia-Hypothese bezeichnet wird, existiert in der klassischen systematischen Paläontologie. Besonderes Gewicht wird hier auf die Anzahl der Äste der Gliedmaßen gelegt (z.B. Hessler, 1992). Fossile Arten, wie z.B. die Trilobiten besitzen Extremitäten mit mindestens zwei Ästen, von denen der eine der Fortbewegung dient, der andere der Atmung. Solche Beine (Spaltbeine) werden wegen ihres Vorkommens bei fossilen Arten als ursprünglich angesehen. Bei heutigen Arthropoden findet man solche mehrästigen (schizoramosen) Beine noch bei Crustaceen



und primitiven Cheliceraten (*Limulus*); sie werden daher als Schizoramia zusammengefaßt (im englischen Sprachraum auch oft als TCC-Clade bezeichnet, für: Trilobita/Chelicerata/Crustacea; Cisne, 1974) und den Insekten plus Myriapoden gegenübergestellt, welche als Uniramia bezeichnet werden (es muß in diesem Zusammenhang darauf aufmerksam gemacht werden, daß die Uniramia der systematischen Paläontologie durchaus als Schwestergruppe der Schizoramia gelten und somit nicht mit den Uniramia der Funktionsmorphologie (Uniramia-Hypothese, siehe oben) deckungsgleich sind. Die Namensgleichheit ist bedauerlich, da sie immer wieder zu Verwirrung führt). Eine andere Schule innerhalb der Paläontologie sieht in den mehrästigen Beinen das Verschmelzungsprodukt zweier ungeteilter Beine (Emerson und Schram, 1990, 1997; Schram und Emerson, 1991; siehe aber Zrzavy und Stys (1994)). Somit wären die Uniramia die ursprünglichere Gruppe und die Schizoramia abgeleitet. Aber auch die Zugehörigkeit der Insecta zu den Uniramia wird kontrovers diskutiert, nachdem vor allem Kukulova-Peck (1992, 1997) fossile Belege anführt, die Spaltbeine auch bei primitiven (fossilen) Insekten belegen sollen.

Wie der Leser sicher schon bemerkt haben wird, beruhen die meisten der klassischen Versuche die Phylogenie der Arthropoden zu klären auf der Ausgestaltung der Gliedmaßen. Das Gewicht dieses Merkmals spiegelt sich schon im Namen der Tiergruppe wider: die Gliedmaßen (Arthropodien) sind das kennzeichnende Merkmal der Arthropoda. Allerdings zeigt die einführende Diskussion auch, daß die Gliedmaßen wiederholt auch Argumente gegen die Monophylie der Arthropoda geliefert haben. Es wurde daher mehrfach versucht, die einzelnen Elemente der verschiedenartigen Gliedmaßen zueinander in Beziehung zu setzen (zu homologisieren). So könnte belegt werden, daß die Gliedmaßen der Arthropoden homolog sind. Darüber hinaus könnte die Evolution der Gestalt der Extremitäten auch Aufschluß über den Verlauf der Phylogenese ihrer Träger, der Arthropoden selbst geben. Im Verlauf der letzten etwa 150 Jahre sind viele Versuche unternommen worden, die einzelnen Beinsegmente (Podomere) der verschiedenen Arthropoden-Klassen miteinander zu homologisieren (z.B. Börner, 1921; Jeannel, 1925; Snodgrass, 1935; Sharov, 1966; Bitsch, 2001; Wolf und Harzsch, 2002). Des weiteren wurden auch Hypothesen über weitere Teile wie etwa Enditen und Exiten aufgestellt. So sollten zum Beispiel die Flügel der Fluginsekten (Pterygota) nicht wie allgemein angenommen seitliche Auswüchse der Körperpanzerung sein, sondern aus kleinen exitenartigen Anhängen der Coxa hervorgegangen sein, die sich in primitiven, flügellosen Insekten finden (Wigglesworth, 1973). Diese wiederum sollten mit den respirativen Exiten

(Epipoditen) der Crustaceen homolog sein. Jedoch führte keiner dieser Versuche zu unumstrittenen Hypothesen; keine Hypothese konnte generelle Anerkennung finden. Und so kamen daher im Laufe der Jahre immer mehr Variationen und neue Hypothesen dazu.

Man kann sich daher die Begeisterung der Phylogenetiker vorstellen, als Anfang der 1990er Jahre in *Drosophila* eine Anzahl von Entwicklungsgenen identifiziert wurde, die einzelne Beinsegmente oder Segmentgruppen markierten und für ihre Entwicklung vonnöten waren. Auch Gene, die die Flügelentwicklung steuerten wurden isoliert. Somit waren die Hoffnungen groß, die althergebrachten Homologieprobleme mittels genetischer und damit vermeintlich objektiver Marker endlich zu lösen. Anfängliche Resultate ließen hoffen. So wurde die Expression der Flügelgene *apterous* und *nubbin* in den Epipoditen von Crustaceen nachgewiesen, was darauf hindeutete, daß die alte Idee der Homologie der Flügel mit Epipoditen tatsächlich stimmte (Averof und Cohen, 1997). Das Gen *Distal-less* (*Dll*) wurde als Marker für distale Bereiche der Gliedmaßen bekannt (Cohen et al., 1989; Cohen und Jürgens, 1989a,b; Panganiban et al., 1994). Das Fehlen der *Dll*-Expression in der Mandibel der Insekten sprach somit klar gegen die Auffassung, daß die Mandibel distale Bereiche besitzt und versetzte der Uniramia-Hypothese einen schweren Hieb (Popadic et al., 1996). Andererseits unterstützte die *Dll* Expression zusammen mit einem weiteren Gen, *extradenticle* (*exd*), die Hypothese von Snodgrass (1935), die vorsah, daß das ursprüngliche Arthropodenbein aus nur zwei Segmenten bestand (dem Coxopodit und dem Telopodit), die dann im Verlaufe der Evolution sekundär in weitere Segmente unterteilt wurden; die fundamentale Zweiteilung sollte aber nach den Vorstellungen von Snodgrass auch noch in den Beinen der heutigen Arthropoden zu beobachten sein. Genau dies schienen *Dll* und *exd* zu bestätigen: *Dll* ist im gesamten distalen Beinanteil exprimiert, während *exd* komplementär dazu im proximalen Beinanteil exprimiert ist (Gonzalez-Crespo und Morata, 1996). Dies ließ den Schluß zu, daß *Dll* und *exd* die zwei Gene sind, die im Urarthropoden und auch noch heute, jedes Bein in einen proximalen Coxopoditen und einen distalen Telopoditen unterteilen.

Trotz dieser anfänglichen Erfolge regte sich auch gegenüber den Genexpressions-Daten allmählich Skepsis. Bezüglich der Expression von *nubbin* und *apterous* in Flügeln und Epipoditen wurde angemerkt, daß beide Gene nicht ausschließlich im Flügel exprimiert sind. Sie sind also keine wirklichen „Flügelmarker“, sondern sind zum Beispiel auch in Nervengewebe exprimiert (Rincon-Limas et al., 1999; Umesono, 2002). Mit etwas Dreistigkeit könnte man ja nun auch die Epipoditen mit Nerven oder Sinnesorganen homologisieren. Die Expression von *Dll* fehlte zwar in der Mandibel der Insekten, und das

war erwartet, da die Mandibel nach der Mehrheitsmeinung keine distalen Teile besitzen sollte. Doch auch die Mandibel der Myriapoden sollte keine distalen Teile haben (z.B. Lauterbach, 1972), exprimiert aber, wie sich herausstellte, trotzdem *Dll* (Popadic et al., 1996, 1998). Das Fehlen von *Dll* war also nicht zwangsweise mit dem Fehlen der distalen Teile korreliert. Dazu kam noch, daß *Dll* auch in den Enditen und Exiten der Crustaceen-Beine nachgewiesen werden konnte (Panganiban et al., 1995; Williams, 1998), Extremitätenteile also, die zum proximalen Teil des Beines gerechnet werden und mit dem distalen Teil eigentlich nichts zu tun haben. Auch die Unterteilung der Gliedmaßen in Coxopodit und Telopodit durch *Dll* und *exd* geriet in Zweifel, da entdeckt wurde, daß sich die Expressionsdomänen beider Gene in Wirklichkeit etwas überschneiden (Abu-Shaar und Mann, 1998; Wu und Cohen, 1999). Besonders dramatisch ist das in der Antenne von *Drosophila* der Fall, wo beide Gene über weite Strecken koexprimiert sind (Dong et al., 2000). Schließlich zeigte eine größer angelegte vergleichende Studie in mehreren Arthropodenarten (Abzhanov und Kaufman, 2000), daß nahezu jeder genetische Marker für sich genommen zu Homologiehypothesen führt, die mit denen eines anderen Markers nicht kompatibel sind. Am Beispiel des Gens *dachshund* (*dac*) konnten Abzhanov und Kaufman (2000) zeigen, daß die durch dieses Gen markierten Bereiche in Insekten, Crustaceen und Cheliceraten offenbar keine homologen Bereiche sind. Würde man nämlich die jeweils durch *dac* markierten Beinbereiche zueinander in Homologie setzen, dann würde das Ergebnis einerseits den traditionellen morphologischen Auffassungen widersprechen. Es würde andererseits aber auch den Hypothesen widersprechen, die auf Grund der *Dll*-Expression aufgestellt werden können. Damit war klar, daß auch die Mittel der Entwicklungsgenetik nicht zu einfachen Antworten auf hartnäckige Probleme der phylogenetischen Forschung führen würden.

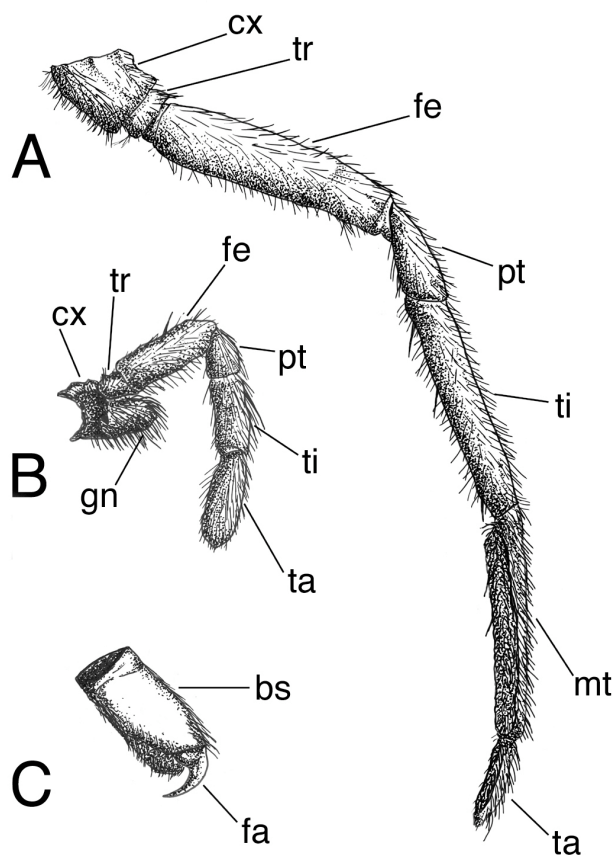
In der Zwischenzeit waren aber auf einem weiteren Gebiet der Phylogenetik Ergebnisse erzielt worden, welche die bisherigen Hypothesen zur Phylogenie der Arthropoden in Frage stellten. Durch Sequenzanalysen ribosomaler DNA und anderer Genfragmente wurden weitgehend akzeptierte Gruppen wie die Mandibulata oder die Antennata nicht unterstützt (Turbeville et al., 1991; Friedrich und Tautz, 1995, 2001; Giribet et al., 1996; Regier und Shultz, 1997; Wheeler, 1997; Zrzavy et al., 1997; Spears und Abele, 1997; Min et al., 1998; Colgan et al., 1998; Garcia-Machado et al., 1999; Giribet und Ribera, 2000; Edgecombe et al., 2000; Hwang et al., 2001; Giribet et al., 2001; Cook et al., 2001; Pisani et al., 2004; Mallatt et al., 2004; Negrisolo et al., 2004). Stattdessen sollten die Insekten und die Crustaceen eng verwandt sein; die

Schwestergruppe dazu ist eine Gruppe aus Chelicerata und Myriapoda oder die Myriapoda alleine. Auch die Insekten selbst erscheinen in manchen Analysen als polyphyletische Gruppierung (Nardi et al., 2003). Ausgelöst durch diese neuen phylogenetischen Hypothesen wurden die traditionellen Sichtweisen überprüft und die Merkmale auf denen sie beruhten wurden neu untersucht. In manchen Fällen finden sich tatsächlich Merkmale, die sich im Lichte der neuen Hypothesen neu deuten lassen; so konnten Hinweise für die enge Verwandtschaft zwischen Crustaceen und Insekten gefunden werden (Whittington, 1996; Whittington und Bacon, 1997; Dohle, 1997; Strausfeld, 1998; Melzer et al., 2000; Deutsch, 2001; Simpson, 2001), so daß für die Gruppierung der Name Tetraconata geprägt wurde (Dohle, 2001; Richter, 2002). Hauptsächliches und namengebendes Merkmal ist der Bau der Ommatidien mit vier Kegelzellen, der bis zu diesem Zeitpunkt in der Form nur von Crustaceen und Insekten bekannt war. Für andere Gruppierungen wie sie sich aus den Sequenzanalysen ergeben, konnten allerdings noch keine überzeugenden Merkmale gefunden werden. Andererseits führte aber das neu entfachte Interesse an vergleichenden Studien auch zur Entdeckung vorher unbekannter Tatsachen. Beispielsweise konnte gezeigt werden, daß die Entwicklung des Nervensystems in Myriapoden und Cheliceraten sehr ähnlich ist (Stollewerk et al. 2001; Dove und Stollewerk, 2003). Untersuchungen an einer bislang für urtümlich gehaltenen Crustaceen-Gruppe lieferten weitere Hinweise für eine nahe Verwandtschaft zwischen Crustacea und Insecta (Fanenbruck et al., 2004). Schließlich führten Nachuntersuchungen an den Augen der Myriapoden *Scutigera* und *Polyxenus* zum Nachweis von vier Kegelzellen bzw. vier Glaskörperzellen (die rudimentären Kegelzellen entsprechen) (Paulus, 2000; Müller et al., 2003); dies würde dafür sprechen, daß auch die Myriapoda zu den Tetraconata gehören. Damit würde die Gruppierung der Tetraconata identisch werden mit den Mandibulata und das alte Taxon wäre wieder hergestellt.

Wie bis hier klar geworden ist, führten die molekularen Analysen und die ihr folgenden morphologischen Nachuntersuchungen zu einem neu geweckten Interesse an der phylogenetischen Erforschung der Evolution der Arthropoda. Die traditionelle zoologische Sichtweise hatte lange Zeit das Feld dominiert und die Aufstellung neuer Hypothesen schwierig gemacht. Die molekularen Analysen haben eine ordentliche Portion Unruhe in das Feld gebracht, was auch zu voreiligen Schlüssen und hastigen Suchen nach morphologischen Merkmalen geführt hat. Das Beispiel mit den vier Kegelzellen der Tetraconata ist hier besonders bezeichnend. Die molekularen Stammbäume weisen geschlossen eine Gruppe Crustacea+Insecta aus, was eine Suche nach morphologischen

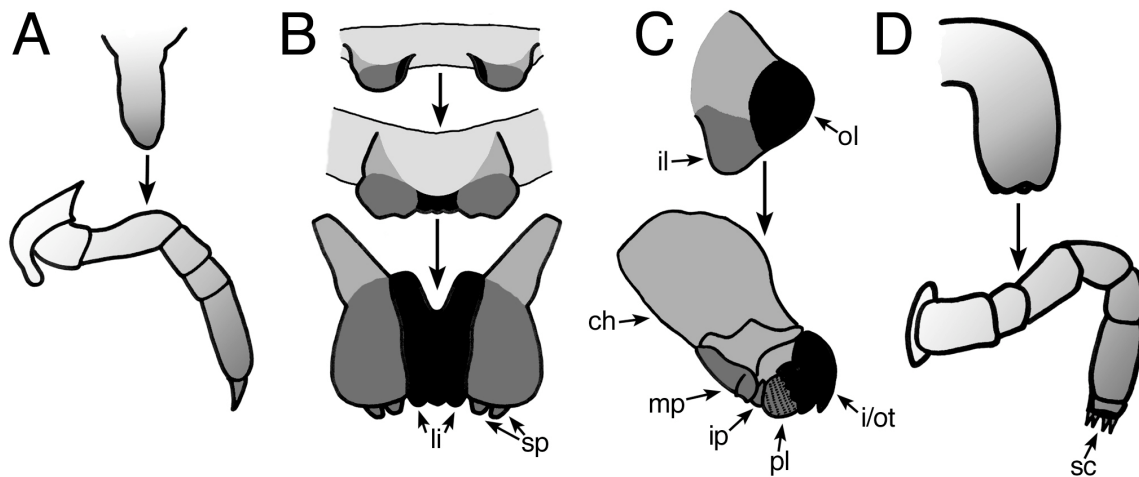
Merkmale auslöste, die diese Gruppe unterstützen können. Die Festlegung der vier Kegelzellen als Synapomorphie der Crustacea+Insecta geschah zu einem Zeitpunkt, als für die Myriapoda nur sehr alte Daten vorlagen. Tatsächlich haben Untersuchungen mit neuen Techniken wie dem Elektronenmikroskop gezeigt, daß entgegen den älteren Darstellungen auch Myriapoden offensichtlich vier Kegelzellen haben (Paulus, 2000; Müller et al., 2003). Dieses Beispiel mag damit illustrieren wie wichtig neue vergleichende Untersuchungen sind um eine sichere Datenbasis für die phylogenetische Forschung stellen zu können.

Ein besonders wichtiger Gegenstand neuer vergleichender Untersuchungen sind natürlich die Gliedmaßen, da sie ja die Grundlage vieler ins Wanken geratener traditioneller Phylogenie-Hypothesen sind. Im Rahmen dieser Dissertation sind daher Studien zur Gliedmaßenentwicklung an Vertretern von zwei der vier heutigen Arthropodenklassen durchgeführt worden. Aus der Klasse der Chelicerata wurde die zentralamerikanische Kammspinne *Cupiennius salei* untersucht.



**Abbildung 1.1**

Die verschiedenen Gliedmaßenentypen des Prosomas der Spinne *Cupiennius salei*. Die Zeichnungen wurden nach einer subadulten, weiblichen Exuvie gemacht. (A) Laufbein. (B) Pedipalpus. (C) Chelicere. Abkürzungen siehe Verzeichnis S. 2-5.



**Abbildung 1.2**

Schematische Darstellung der embryonalen und adulten Gliedmaßen von *Glomeris marginata*. (A) Rumpfbein im Embryonalstadium 6 (oben) und im Adultus (unten). (B) Ventralansicht des Maxillarsegments (hellgrau) mit den sich entwickelnden Maxillen. Im Stadium 4 sind die Maxillen noch getrennt (oben). Im Stadium 6 haben sich die Maxillen angenähert und das Gewebe an der Innenseite, das zur Bildung der Intermaxillarplatte beiträgt (schwarz) ist bereits verschmolzen (Mitte). Im Adultus bilden die Maxillen die Unterlippe (Gnathochilarium; unten). schwarz: Intermaxillarplatte; dunkelgrau: Stipes; mittelgrau: Cardo). (C) Mandibel im Stadium 6 (oben) und im Adultus (unten). (D) Antenne im Stadium 6 (oben) und im Adultus (unten). Sich entsprechende Teile haben den gleichen Grauton. (Abkürzungen siehe Verzeichnis S. 2-5).

Aus der Klasse der Myriapoda wurde der heimische Saftkugler *Glomeris marginata* studiert. Ergänzende Untersuchungen wurden an der Hausspinne *Tegenaria atrica* und den Insekten *Tribolium castaneum* (Mehlkäfer) und *Drosophila melanogaster* (Taufliege) vorgenommen. Zwischen den verschiedenen Arten bestehen wie schon erwähnt Unterschiede in der Extremitäten-Morphologie. Aber auch an einem Individuum einer Art unterscheiden sich die Gliedmaßen, in Abhängigkeit davon an welchem Segment sie sich befinden. Als Beispiele sind hier die verschiedenen Gliedmaßen der zwei untersuchten Arten abgebildet. Die Spinne *Cupiennius salei* besitzt als vorderste Gliedmaßen ein Paar Cheliceren (Abb. 1.1C). Die Cheliceren bestehen aus einem breiten und muskulösen Basalteil und einer beweglichen Klaue distal davon. Mit den Cheliceren greifen die Spinnen ihre Beute und injizieren ihr ein betäubendes Gift, das durch eine Öffnung in der Klauenspitze abgegeben wird. Im nächsten Segment befindet sich ein Paar Pedipalpen. Dies sind kleine, beinähnliche Gliedmaßen, die hauptsächlich als Taster dienen. Sie bestehen aus sechs Segmenten, die als Coxa, Trochanter, Femur, Patella, Tibia und Tarsus bezeichnet werden (Abb. 1.1B). An der Basis tragen sie einen breiten Auswuchs, den sog. Gnathendit. Mit diesem schirmen sie beim Fressvorgang den Mundvorraum seitlich ab, was es ermöglicht im Mundvorraum einen Unterdruck zu

erzeugen, damit das Beutetier ausgesaugt werden kann. Schließlich dient der Pedipalpus bei männlichen *Cupiennius* auch als Begattungsorgan. In den folgenden vier Segmenten befindet sich je ein Paar Laufbeine. Sie bestehen aus sieben Segmenten- Coxa, Trochanter, Femur, Patella, Tibia, Metatarsus und Tarsus- und dienen, wie der Name schon sagt, zur Fortbewegung.

Der Saftkugler *Glomeris marginata* besitzt als vorderste Gliedmaßen ein Paar segmentierte Antennen (Abb. 1.2D). Sie tragen an ihrer Spitze vier sog. Sinneszapfen mit denen die Tiere ständig den Boden vor sich abtasten. Das folgende Segment, das Prämandibularsegment trägt keine Gliedmaßen. Erst das darauf folgende Segment besitzt ein Paar Mandibeln (Abb. 1.2C). Dabei handelt es sich um massive Kauwerkzeuge, die im Adultus mit zahnartigen Auswüchsen und Kamm-ähnlichen Platten versehen sind. Mit ihnen zerfasern die Saftkugler ihre einzige Nahrung: verrottendes Laub. Den Mandibeln folgt ein Paar Maxillen (Abb. 1.2B). Allerdings sind diese im Adultus miteinander verschmolzen und bilden eine Art Unterlippe, die als Gnathochilarium bezeichnet wird. Im Embryo sind die Maxillen jedoch die meiste Zeit noch als getrennte Extremitäten vorhanden, die langsam aufeinander zu wandern und schließlich verschmelzen. Das fertige Gnathochilarium ist der Sitz von weiteren Sinnesorganen, die wahrscheinlich dem schmecken und riechen dienen. Dem Maxillarsegment folgt wiederum ein extremitätenloses Segment, das sog. Postmaxillarsegment, und darauf folgt eine große Anzahl von Segmenten, die alle Laufbeine tragen. Adulte Tiere haben 17 Laufbeinpaare. Diese Zahl wird jedoch erst nach postembryonalen Häutungen erreicht; im Embryo entwickeln sich zunächst nur acht Laufbeinpaare. Jedes Bein besteht aus sieben Segmenten, die als Coxa, Trochanter, Femur, Postfemur, Tibia, Tarsus und Prätarsus bezeichnet werden. Der Vergleich mit den Segmentnamen bei der Spinne offenbart bereits implizierte Homologien, die aber, wie oben schon erwähnt, sehr umstritten sind. Der Leser soll deshalb gleichlautenden Segmentnamen nicht zu viel Bedeutung beimessen.

Die molekularen Grundlagen der Beinentwicklung sind in der Fliege *Drosophila* sehr intensiv erforscht worden. Wie bereits erwähnt sind eine ganze Reihe von Genen identifiziert worden, welche die Morphogenese der Beine in *Drosophila* steuern (z.B. Held, 1995; Couso und Bishop, 1998; Morata und Sanchez-Herrero, 1999). Des weiteren hat es bereits Ansätze gegeben, die homologen Gene dazu in anderen Arthropoden zu untersuchen, um einen Eindruck darüber zu gewinnen, in welchem Maße die molekularen Mechanismen der Beinentwicklung innerhalb der Arthropoden konserviert sind (z.B. Abzhanov und Kaufman, 2000). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten diesen

vorläufigen Daten weitere Daten hinzugefügt werden; einerseits sollte das Spektrum der Gene erweitert werden, und andererseits sollte auch das Spektrum der untersuchten Arthropoden-Arten erweitert werden. Das Entwicklungsprogramm der Beine in *Drosophila* besteht aus einer hierarchischen Genkaskade mit drei Ebenen (Rauskolb und Irvine, 1999; Rauskolb, 2001). Ganz oben stehen Morphogene die ein weitreichendes Koordinatensystem über das sich entwickelnde Bein legen. An diesem Koordinatensystem orientieren sich die Gene auf der zweiten Ebene, die Bein-Gap-Gene; sie teilen das Bein in diskrete Bereiche ein, die dann wiederum der dritten und untersten Ebene, den Bein-Segmentierungsgenen, als Richtschnur dienen. Das Spektrum der Gene sollte nun in der Art erweitert werden, daß aus jeder dieser drei Ebenen Gene ausgewählt und vergleichend untersucht werden; gerade die Ebene der Bein-Segmentierungsgene ist bislang noch kaum vergleichend untersucht worden. Das Spektrum der Arten sollte insbesondere um einen Vertreter der Myriapoden erweitert werden, welche zuvor noch nicht untersucht worden waren (mit Ausnahme des *Distal-less* Gens (Scholtz et al., 1998; Popadic et al., 1998)). Durch den Vergleich aller Daten sollten besonders zwei Aspekte betrachtet werden:

- welche divergenten Merkmale finden sich, und was sagen sie über die Evolution der Vielfalt der Beinmorphologie aus?
- welche konservierten Merkmale finden sich, und was sagen sie über den Ursprung und das Aussehen der Ur-Gliedmaße aus?

Schließlich sollten die erarbeiteten Merkmale aber auch daraufhin überprüft werden, ob sie für die Rekonstruktion von Stammbäumen nach der kladistischen Methode herangezogen werden können.



## 2. Material und Methoden

### 2.1 Bakterienstämme und Plasmide

Zur Klonierung wurden chemisch kompetente *Escherichia coli* TOP 10 (Invitrogen) verwendet. Als Klonierungsvektor diente das Plasmid pPCR-Script Amp SK(+) (Stratagene) in einer Konzentration von etwa 0,1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  in TE Puffer. PCR Fragmente wurden über die EcoRV Schnittstelle eingefügt.

### 2.2 Verwendete Primer

<i>exd-fw1</i>	(YTN AAY TGY CAY MGN ATG AAR CC)
<i>exd-bw1</i>	(TTN CCR AAC CAR TTN SWN ACY TG)
<i>exd-fw2</i>	(GTN YTN TGY GAR ATH AAR GAR AAR AC)
<i>exd-bw2</i>	(GCN ARY TCY TCY TTN GCY TCY TC)
<i>hth-fw1</i>	(GAY AAR GAY GCN ATH TAY GRN CAY CC)
<i>hth-bw1</i>	(YTG RTC DAT CAT NGG YTG NAC DAT)
<i>hth-bw2</i>	(GC RTT DAT RAA CCA RTT RTT NAC YTG)
<i>H15-fw-1</i>	(GAR CAN AAR GAR YTN TGG GAY AA)
<i>H15-bw-1</i>	(TCN CKR AAN CCY TTN GCR AAN GG)
<i>H15-fw-2</i>	(GGN CAN GAR ATG ATH ATH CAN AA)
<i>H15-bw-2</i>	(GCR AAN GGR TTN SWR TCD ATY TT)
<i>omb-fw-1</i>	(GGN ACN GAR ATG GTN ATH ACN AA)
<i>omb-fw-2</i>	(TTY CAY AAR YTN AAR YTN ACN AA)
<i>omb-bw-1</i>	(TTR TTN GTN ARY TTN ARY TTR TG)
<i>omb-bw-2</i>	(TGR TAN GCN GTN ACN GCD ATR AA)
<i>omb-bw-3</i>	(TCN CKR AAN CCY TTN GCR AAN GG)
<i>dpp-fw-1</i>	(GAY GTN GGN TGG GAY GAY TGG)
<i>dpp-bw-1</i>	(CKR CAN CCR CAN CCN CAN AC)
<i>dpp-fw-2</i>	(GGN TAY GAY GCN TAY TAY TG)
<i>CG6634-fw</i>	(AGT TCG TCG TCG CCT GCC)
<i>CG6634-bw-T7</i>	(GTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG CAA AGT CCG TCG)

	CTG AGC C)
<i>Dll-eDP fw</i>	(GGN AAR GGN AAR AAR ATN MG)
<i>Dll-eDP bw</i>	(TTY TGR AAC CAD ATY TTN AC)
<i>Dll-iDP fw</i>	(ATN MGN AAR CCN MGN ACN ATH TA)
<i>Dll-iDP bw</i>	(AAC CAD ATY TTN ACY TGN GTY TG).
<i>Gm-Dll-eGSP</i>	(CGT GAG ACC CAA AGA AGC TGC C)
<i>Dll-DP dlxm1</i>	(AAR WSN GCN TTY ATN GAR HTN CAR CAR C)
<i>Gm-Dll-iGSP</i>	(TTC AGC ACG CTC TGG TAG AGC C)
<i>dac-fw-1</i>	(TGY YTN CCN CAR GCN TTY GAN YTN TT)
<i>dac-bw-1</i>	(ARN AMR TCC ATY TTN ARY TCN GYY TTY TC)
<i>dac-fw-2</i>	(CCN GTN GTN TGY AAY GTN GAR CAR GT)
<i>dac-bw-2</i>	(CKN GCR TTR TCN GCN GCN ACY TT)
<i>svp-fw-1</i>	(TGY AAR RTN TGY GGN GA)
<i>svp-fw-2</i>	(ACI TGY GAR GGI TGY AA)
<i>svp-bw-1</i>	(CAT NCC NAC NAR NWR RCA YTT)
<i>svp-bw-2</i>	(ARI CKR CAI GSY TKR CA)
<i>Egfr-fw</i>	(GTN CAY MGN RAY YTN GCN RCN MG)
<i>Egfr-bw</i>	(GTN ACN CCR WAN SHC CAN ACR TC)
<i>Ser-fw-1</i>	(GTN TGY YTN AAR GAR TAY CA)
<i>Ser-fw-2</i>	(TGY GAR CAN AAY TGG GGN GG)
<i>Ser-bw-1</i>	(TCN AYR CAN GTN GCN CC)
<i>Ser-bw-2</i>	(TTD ATN CKR CAR TCN GGN CC)
<i>Ser-bw-3</i>	(CCC CAR TTN GTN TCR CA)
<i>Ser-bw-4</i>	(CCR CAR WAR TTN ARR TC)
<i>odd-fw</i>	(AAR AAR SAR TTY ATH TGY AAR TWY TGY)
<i>odd-bw</i>	(TGN GTY TTN ARR TTN GMN CKY TGR TTR)
<i>AP-2-fw</i>	(CAR CCN CCN TAY TTK CC)
<i>AP-2-bw1</i>	(GGN SWN CCR AAN CCR TG)
<i>AP-2-bw2</i>	(GGR AAY TCN GTY TCR CA)
<i>pBS-A</i>	(CTA TGA CCA TGA TTA CGC CAA G)
<i>pBS-E</i>	(TAA CGC CAG GGT TTT CCC AGT)
<i>pBS-A-T7</i>	(TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGA ATT AAC CCT CAC TAA AGG G)
<i>M13fwd</i>	(GTA AAA CGA CGG CCA GT)
<i>M13rev</i>	(CAG GAA ACA GCT ATG AC)

### 2.3 Verwendete Genfragmente

Gen	Zugriffsnummer (soweit vorhanden)	Herkunft des Fragments
<i>Cs-dpp</i>	AJ518936	Geschenk von Wim Damen
<i>Gm-dpp</i>	-	vorliegende Arbeit
<i>Cs-wg</i>	AJ315945	Damen, 2002
<i>Gm-wg</i>	AJ616907	Janssen et al., 2004
<i>Cs-omb</i>	AJ518937	Geschenk von Ralf Janssen
<i>Gm-omb</i>	-	vorliegende Arbeit
<i>Cs-H15-1</i>	AJ518938	Geschenk von Ralf Janssen
<i>Cs-H15-2</i>	AJ518939	vorliegende Arbeit
<i>Gm-H15-1</i>	-	Geschenk von Ralf Janssen
<i>Gm-H15-2</i>	-	Geschenk von Ralf Janssen
<i>Ta-H15-1</i>	-	Geschenk von Ralf Janssen
<i>Ta-H15-2</i>	-	Geschenk von Ralf Janssen
<i>Ta-H15-3</i>	-	Geschenk von Ralf Janssen
<i>Cs-Dll</i>	AJ278606	Schoppmeier und Damen, 2001
<i>Gm-Dll</i>	AJ551276	vorliegende Arbeit
<i>Cs-dac</i>	AJ518942	Geschenk von Wim Damen
<i>Gm-dac</i>	AJ551277	vorliegende Arbeit
<i>Cs-exd-1</i>	AJ518943	Prpic, 2000
<i>Cs-exd-2</i>	AJ518944	Prpic, 2000
<i>Cs-hth-1</i>	AJ518945	Geschenk von Wim Damen
<i>Cs-hth-2</i>	AJ518935	Geschenk von Wim Damen
<i>Gm-exd</i>	AJ551278	vorliegende Arbeit
<i>Gm-hth</i>	AJ551279	vorliegende Arbeit
<i>Tc-exd</i>	AJ518940	Geschenk von Wim Damen
<i>Tc-hth</i>	AJ518941	Geschenk von Wim Damen
<i>Cs-N</i>	AJ507288	Stollewerk, 2002
<i>Cs-Dl-1</i>	AJ507289	Stollewerk, 2002
<i>Cs-Dl-2</i>	AJ507290	Stollewerk, 2002
<i>Cs-Ser</i>	-	Geschenk von Wim Damen
<i>Cs-h</i>	AJ252154	Damen et al., 2000
<i>Cs-AP-2</i>	-	vorliegende Arbeit
<i>Cs-nub</i>	AJ420131	Damen et al., 2002
<i>Cs-odd-1</i>	-	vorliegende Arbeit
<i>Cs-odd-2</i>	-	vorliegende Arbeit
<i>Cs-odd-3</i>	-	vorliegende Arbeit
<i>Cs-svp</i>	-	Geschenk von Ralf Janssen
<i>Cs-Egfr</i>	-	vorliegende Arbeit

### 2.4 Die Versuchstiere

Die verwendeten Saftkugler (*Glomeris marginata*) stammten alle aus Laubwäldern in der Umgebung Kölns oder nahe Kranenburg an der deutsch-holländischen Grenze. Die Tiere wurden in den Jahren 2001 bis 2003 jeweils im Frühjahr von etwa Ende März bis etwa Anfang Juni gesammelt und im Labor zur Eiablage gebracht.

Die Arbeiten mit Mehlkäfern (*Tribolium castaneum*) wurden im Jahr 2000 im Labor von Dr. Martin Klingler in München durchgeführt. Die verwendeten Käfer stammten aus der dortigen Zucht und wurden mir freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Es handelte sich dabei um den gängigen Wildtyp-Laborstamm „San Bernardino“. Ergänzende Arbeiten wurden in der Folgezeit in Köln durchgeführt, an Tieren die mir freundlicherweise von Joël Savard, Köln zur Verfügung gestellt wurden. Auch bei diesen Tieren handelte es sich um den „San Bernardino“ Laborstamm.

Bei den verwendeten Taufliegen (*Drosophila melanogaster*) handelte es sich um Wildtyp-Tiere, die ich von Dr. Thomas Klein, Köln erhielt.

Die Hausspinnen (*Tegenaria atrica*) waren Wildfänge aus Köln. Embryos dieser Spinnenart wurden mir von Ralf Janßen, Köln zur Verfügung gestellt. Die Arbeiten an der mittelamerikanischen Kammspinne (*Cupiennius salei*) wurden in Kooperation mit Dr. Wim Damen, Köln durchgeführt. Die Tiere stammten größtenteils aus der Zucht in Köln, teilweise aber auch von Prof. Dr. Seyfarth, Frankfurt am Main.

### 2.5 Molekularbiologische Methoden

Sofern nicht anders angegeben, wurde nach Standardmethoden verfahren (Sambrook et al., 1989; Sambrook und Russell, 2001). Dort finden sich ebenfalls die Anleitungen zur Herstellung aller allgemein gebräuchlicher Puffer und Lösungen.

#### *Gewinnung von RNA und cDNA-Synthese*

Gesamt-RNA der untersuchten Tierarten wurde mittels Trizol Reagent (Invitrogen) aus den zur Verfügung stehenden Entwicklungsstadien isoliert. Dabei wurde nach den Herstellerangaben verfahren. In einigen Fällen war die so gewonnene Gesamt-RNA für

weitere Experimente nicht geeignet und mußte weiter gereinigt werden. Hierzu wurde aus der Gesamt-RNA spezifisch die Poly-A RNA isoliert. Dazu kam die Isolation mittels magnetisch markierter Poly-T Sonden zum Einsatz. Die Durchführung folgte den Angaben des Herstellers des PolyATtract mRNA Isolation Systems III (Promega). Auf Basis der Gesamt- bzw. Poly-A RNA wurde cDNA synthetisiert. Die Durchführung folgte in diesem Fall den Angaben des Herstellers des SuperScript II Systems (Invitrogen). Adaptorligierte cDNA zur Durchführung der RACE PCR wurde mir von Wim Damen und Hilary Dove zur Verfügung gestellt.

### *DNA-Amplifikation mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR)*

Die DNA-Amplifikation erfolgte mittels automatisierter Thermocycler (Eppendorf). Es wurde durchweg nach Standardmethoden verfahren (Sambrook und Russell, 2001). Ein PCR Zyklus umfasste jeweils 1 Minute Schmelzen bei 94°C, 2 Minuten bei geschätzter Annealing-Temperatur, gefolgt von einem geeigneten Zeitraum zur Elongation bei 72°C. Die Temperatur zur Anlagerung der Primer (Annealing) bestimmte sich dabei nach demjenigen Primer des Primerpaares mit der niedrigeren Schmelztemperatur (berechnet nach den Herstellerangaben (metabion) abzüglich 2°C). Lagen die Schmelztemperaturen der Primer sehr weit auseinander, wurden zunächst 3 Zyklen mit der höheren, 6 Zyklen mit der niedrigeren und schließlich 26 Zyklen mit der niedrigeren Schmelztemperatur minus 2 °C durchgeführt („touchdown-PCR“). Fragmente von unter 1kb wurden mit einer Elongationszeit von 2 Minuten amplifiziert, wohingegen für größere Fragmente pro kb 1 Minute dazugefügt wurde. Es wurden 35 Zyklen durchlaufen. RACE PCR wurde mittels des Advantage 2 Kits (Clontech) nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

Ein spezieller Einsatz der PCR war die Herstellung einer geeigneten Vorlage (Template) zur in-vitro Transkription von RNA. Sollte das Template zur Herstellung von Einzelstrang-RNA (ssRNA) dienen, wurden die Primer pBS-A und pBS-E verwendet. Sollte Doppelstrang-RNA (dsRNA) synthetisiert werden kamen die Primer pBS-A-T7 und pBS-E zum Einsatz. So war es möglich ein bereits kloniertes Fragment mitsamt der Promotorsequenzen des Vektors zu amplifizieren, oder, im Fall der dsRNA, das Fragment an beiden Enden mit der T7 Promotorsequenz zu versehen. Bei dieser Anwendung bestand ein Zyklus aus 30 sec 94°C, 45 sec 60°C und 90 sec 72°C. Es wurden 30 Zyklen durchlaufen.

### *Molekulares Klonieren*

Die Enden der in der PCR amplifizierten Fragmente wurden mittels T4 DNA Polymerase und Polynukleotidkinase (PNK) abgestumpft („blunt-end“) und phosphoryliert. Dazu wurde ein 30  $\mu\text{l}$  PCR Ansatz mit 20  $\mu\text{l}$  Wasser, 5  $\mu\text{l}$  dNTPs (jeweils 2 mM; Pharmacia Biotech), 5  $\mu\text{l}$  5x T4 DNA Polymerase Puffer (Roche) und 0,5 U T4 DNA Polymerase (Roche) versetzt und 20 Minuten bei 12 °C inkubiert. Anschließend wurden 5  $\mu\text{l}$  10x PNK Puffer (Roche), 1  $\mu\text{l}$  ATP (10 mM; Roche) und 0,5 U PNK (Roche) zugegeben und 30 Minuten bei 16 °C inkubiert. Der so behandelte Ansatz wurde in einem Agarosegel aufgetrennt, die Kandidatenbanden herausgeschnitten und aus dem Gel eluiert mittels MinElute Gel Extraction Kit (Qiagen). 8  $\mu\text{l}$  des Eluats wurden zusammen mit 1  $\mu\text{l}$  Klonierungsvektor, 2  $\mu\text{l}$  10x Ligationspuffer (Roche), 8  $\mu\text{l}$  Wasser und 1U T4 DNA Ligase (Roche) 10 Stunden bei 12 °C inkubiert. Kompetente *Escherichia coli* wurden mit jeweils 1  $\mu\text{l}$  dieser Ligationsreaktion transformiert und auf selektiven Agarplatten ausgebracht. Positive Kolonien wurden in flüssiges Nährmedium gebracht, über Nacht inkubiert und geerntet. Anschließend wurden die Plasmide isoliert, über Sephadex-Säulchen (Amersham) gereinigt und bei –20 °C gelagert.

### *Enzymatische Sequenzierung*

Die Basensequenzen der klonierten Fragmente wurden mit automatisierten Sequencern (ABI 377 und ABI 3100) bestimmt. Zuvor wurde auf der Basis von etwa 0.05 – 0,1  $\mu\text{g/ml}$  Template in 1  $\mu\text{l}$  Wasser mit 1  $\mu\text{l}$  BigDye (Perkin Elmer), 1  $\mu\text{l}$  BigDye-Puffer (Perkin Elmer), 2  $\mu\text{l}$  M13 oder M13rev Primer (3  $\mu\text{M}$ ) und 5  $\mu\text{l}$  Wasser ein Cycle Sequencing durchgeführt: 30 Zyklen zu je 10 sec 96 °C, 15 sec 40 °C, 4 min 60 °C.

### *In-vitro Transkription*

Ausgehend von etwa 500 ng PCR-Produkt wurde mittels geeigneter RNA Polymerasen markierte Einzelstrang-RNA (ssRNA) oder unmarkierte Doppelstrang-RNA (dsRNA) synthetisiert. Die verwendeten Polymerasen waren abhängig von den vorhandenen Promotoren und von der Leserichtung des einklonierten Fragments; es kamen sowohl T7

als auch T3 und Sp6 RNA Polymerasen (Roche) zum Einsatz. Die transkribierte RNA wurde mit Ammoniumacetat gefällt, in Wasser aufgenommen und bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt. Ein Ansatz zur Herstellung markierter ssRNA:  $6\text{ }\mu\text{l}$  PCR-Produkt in Wasser,  $1\text{ }\mu\text{l}$  10x Transkriptionspuffer (Roche),  $1\text{ }\mu\text{l}$  Labeling Mix (Roche; je nach Wahl Digoxigenin, Fluorescein oder Biotin),  $1\text{ }\mu\text{l}$  RNase Inhibitor (Roche), und  $1\text{ }\mu\text{l}$  RNA Polymerase. Ein Ansatz zur Herstellung unmarkierter dsRNA:  $22\text{ }\mu\text{l}$  PCR-Produkt in Wasser (muß an beiden Enden die T7 Promotorsequenz enthalten), je  $3\text{ }\mu\text{l}$  10x Transkriptionspuffer und NTPs (Roche; 10 mM),  $0,5\text{ }\mu\text{l}$  RNase Inhibitor, und  $1,5\text{ }\mu\text{l}$  T7 RNA Polymerase.

### 2.6 Embryologische Methoden

#### *Gewinnung und Fixierung von Embryos*

Die Eier von *Glomeris marginata* wurden mittels Federstahlpinzetten aus den Kulturschalen gesammelt. Die Erdhüllen, die von den Muttertieren um die Eier gelegt werden, wurden von Hand entfernt. Anschließend wurden die Eier in Wasser gewaschen, dechorionisiert (2 min in 50% DanKlorix (Colgate/Palmolive)), abermals gründlich gewaschen und schließlich in 1 ml Heptan und  $100\text{ }\mu\text{l}$  Formaldehyd (37%) für etwa 4 h fixiert. Danach wurden die Embryonen mehrfach in Methanol gewaschen. Die Vitellinmembranen mußten von Hand (mittels Dumont 5 Pinzetten) entfernt werden. Die Embryos wurden anschließend bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  in Methanol aufbewahrt.

Embryos von *Tribolium castaneum* und *Drosophila melanogaster* wurden nach Standardverfahren gewonnen und fixiert. Die Embryonen von *Cupiennius salei* werden von den Muttertieren in einem Seidenkokon am Körper mit sich geführt. Nach Betäubung des Muttertieres mit Kohlendioxid kann der Kokon abgenommen und die Eier daraus entnommen werden. Nach dem Entfernen des Chorions (4 min in 50% DanKlorix) wurden die Embryonen über Nacht in 10 ml Heptan und  $200\text{ }\mu\text{l}$  Formaldehyd (37%) fixiert, mehrfach in Methanol gewaschen und bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert. Wie bei *Glomeris* mußte auch hier die Vitellinmembran manuell entfernt werden.

### *In-situ Hybridisierungen an vollständigen Embryos*

Whole-mount in situ Hybridisierungen an Embryos von *Drosophila*, *Tribolium* und *Cupiennius* erfolgten nach den für die jeweilige Art etablierten Protokollen (Tautz und Pfeifle, 1989; Klingler und Gergen, 1993; Wolff et al., 1998; Damen und Tautz, 1998, 1999). Die in situ Hybridisierungen an Imaginalscheiben aus Larven von *Drosophila* wurde ebenfalls nach Standardprotokollen durchgeführt (Blair, 2000).

*Glomeris marginata* Embryonen wurden schrittweise in PBST rehydriert, 20 min in 4% Formaldehyd refixiert, mehrfach in PBST gewaschen, schrittweise in destilliertes Wasser überführt und etwa 20 min in 1ml 0,1M TEA-Puffer pH=8,0 (Sigma) und 2,5  $\mu$ l Acetanhydrid inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen in PBST wurden die Embryos in HybB pH=6,5 (50% Formamid, 5xSSC pH=5,2, 0,1% Tween-20 in Wasser) für 3 Stunden bei 65 °C vorhybridisiert und anschließend in 50  $\mu$ l Hyb-A pH=6,5 (50% Formamid, 5xSSC pH=5,2, 200  $\mu$ g/ml DNA (aus Lachshoden; Sigma), 5 $\mu$ g/ml tRNA (type XXI, *E.coli* W; Sigma), 50 $\mu$ g/ml Heparin (vom Schwein; Sigma), 0,1% Tween-20 in Wasser) und der jeweiligen RNA Sonde über Nacht bei 65 °C inkubiert. Die Embryos wurden dann schrittweise zunächst bei 65 °C in 2x SSC pH=5 überführt und in 0,2x SSC pH=5 gewaschen, bevor sie schrittweise bei Raumtemperatur in PBST überführt wurden. Danach folgten ein Blocken mit PBST und 2% Schafserum (Sigma) für 2 Stunden und die Antikörperbehandlung (antiDig (Roche); 1:2000) über Nacht bei 4 °C. Nach der Antikörperbehandlung wurden die Embryos mehrfach in PBST für etwa 4 h gewaschen und schließlich der NBT/BCIP (Roche) Reaktion unterzogen.

Doppelfärbungen in *Cupiennius salei* wurden nach Prpic et al. (2001) durchgeführt. Allerdings ist das NEP-118 Blast-AP Kit (NEN/DuPont) nicht mehr erhältlich und mußte durch das NEL76A Renaissance BLAST Chromogenic Kit (NEN/Perkin-Elmer) ersetzt werden, das gegenüber dem ursprünglichen Produkt einige Veränderungen bezüglich der Komponenten aufweist. Es ist im Rahmen dieser Doktorarbeit leider nicht gelungen die Methode mit dem neuen Kit so weit zu etablieren, daß vergleichbare Ergebnisse hätten erzielt werden können. Reproduzierbare und auswertbare Ergebnisse konnten nur mit den Genen *Cs-Dll* und *Cs-dac* erzielt werden. Die genannten Gene sind diejenigen mit dem intensivsten Farbniederschlag bei der in situ Hybridisierung. Bei allen anderen Genen trat das bereits bekannte Problem auf, daß die im Zweitnachweis dargestellte Genexpression zu einem extrem schwachen oder gar keinem Farbniederschlag führte (siehe Prpic, 2000).



### *Interferenz durch doppelsträngige RNA (RNAi)*

Die durch in vitro Transkription gewonnene doppelsträngige RNA (dsRNA) wurde nach den Angaben bei Schoppmeier und Damen (2001) in Embryos von *Cupiennius salei* injiziert. Um die beschriebenen, starken Deformationen bei der Injektion von Notch dsRNA (siehe Stollewerk et al., 2003) zu vermeiden, wurden die Embryos in den im Folgenden beschriebenen Experimenten etwa 12 Stunden später als nach der Standardmethode üblich injiziert. Injektionen zu diesem späteren Zeitpunkt hatten keinen Einfluß auf die Segmentierung. Als Negativkontrolle wurde in allen Fällen lediglich Wasser injiziert, da die sonst übliche Injektion von GFP dsRNA zu Gliedmaßendefekten führen kann und somit für die Kontrolle der Experimente nicht geeignet war.

### *Zellbiologische Methoden*

#### DAPI

Zur Darstellung der Zellkerne wurden fixierte *Cupiennius*-Embryos in PBST rehydriert und für 1 h in PBST und 1 µg/ml DAPI (Roche) unter Lichtabschluß inkubiert. Danach wurde mehrere Stunden in PBST gewaschen, der letzte Waschschrift über Nacht. Das in den Zellkernen zurückgebliebene DAPI konnte dann mittels UV-Strahlung sichtbar gemacht werden.

#### BrdU

Der Nachweis von Zellteilungsaktivität durch Einbau spezieller Nukleotide (BrdU) wurde mittels des BrdU Labeling Kits (Roche) durchgeführt. Die BrdU Labeling Reagenz (Roche) mußte dazu wie oben für dsRNA genannt in Embryonen von *Cupiennius salei* injiziert werden. Die behandelten Embryonen wurden anschließend 14 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert, fixiert und in Methanol überführt. Nach 1-stündiger Kältebehandlung (-20 °C) wurden die Embryos in PBS-Triton rehydriert, 1 Stunde mit 2 N HCl behandelt und mehrfach in PBS-Triton und anschließend in Incubation Buffer (Roche) gewaschen. Die Embryonen wurden dann 1 Stunde in 1:10 Anti-BrdU-Solution (Roche) und Incubation Buffer inkubiert und mehrfach in PBS-Triton gewaschen; der letzte Waschschrift erfolgte über Nacht. Der sekundäre Antikörper (anti-Maus-AP; Roche) wurde

in einer 1:10 Verdünnung eingesetzt. Nach Entfernen des sekundären Antikörpers durch häufiges Waschen mit PBS-Triton wurde die Farbreaktion (NBT/BCIP) durchgeführt.

### TUNEL

Zum Nachweis fragmentierter DNA in sterbenden und abgestorbenen Zellen kam die TUNEL Methode zum Einsatz. Fixierte *Cupiennius*-Embryonen wurden rehydriert, 4 min mit Proteinase K (Roche; 3,5  $\mu$ l einer 1:10 Verdünnung auf 1 ml PBST) behandelt und mehrfach in PBST gewaschen und in 4% Formaldehyd refixiert (20 min). Nach mehrfachem Waschen in PBST wurden die Embryonen dann 20 min in 0,1% Natriumborhydrat inkubiert und anschließend mehrfach in TdT Puffer (140 mM Kakodylsäure, 1 mM Kobaltchlorid, 30 mM Tris-HCl pH=7,2, in Wasser) gewaschen. Die Transferase-Reaktion wurde in TdT Puffer mit 20  $\mu$ M dig-dUTP (Roche) und 0,3 U/ $\mu$ l TdT (Sigma) für 2 h bei 37 °C durchgeführt. Anschließend wurde mehrfach in TdT Puffer und danach in TBST gewaschen, 20 min bei 70 °C in TBST inkubiert, mehrfach in PBST gewaschen und für 1 h in PBST mit 10 mg/ml BSA (Sigma) und 2% Schafserum (Sigma) geblockt. Der antiDig-AP-Antikörper (Roche; 1:2000) wurde anschließend zugegeben und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Im Anschluß wurde mehrfach für insgesamt mindestens 4 h in PBST gewaschen und schließlich die NBT/BCIP Reaktion durchgeführt. In der Negativkontrolle wurde die Zugabe der TdT ausgelassen; in der Positivkontrolle wurden die Embryos in 0,06 U DNase I (Roche) pro  $\mu$ l DNase-Puffer (40 mM Tris-HCl pH=7,5, 6 mM Magnesiumchlorid, 0,1 mM Dithiothreitol, in Wasser) für 30 min. bei 37 °C vorbehandelt.

### Antikörperfärbungen

Fixierte *Cupiennius*-Embryos wurden schrittweise in PBST rehydriert und 30 min in PBST mit 10% BSA und 2% Ziegenserum geblockt. Anschließend wurde der jeweilige Antikörper zugegeben (Kaninchen-anti-ph3 (Biozym) 1:500; Maus-anti-ERK (Sigma) 1:20) und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Überschüssige Antikörper wurden durch mindestens 4-stündiges Waschen in PBST mit mehrfachem Pufferwechsel entfernt. Danach wurde der sekundäre Antikörper zugegeben (Ziege-anti-Kaninchen-AP (Dianova) bzw. Ziege-anti-Maus-AP (Dianova)) (jeweils 1:100) und 2 h inkubiert. Anschließend folgten mehrere Waschschrte, wobei der letzte über Nacht bei 4 °C durchgeführt wurde, und die NBT/BCIP Reaktion.

### 2.7 Präparation und Dokumentation

#### *Präparate*

Vollständige Embryonen von *Glomeris marginata*, *Tegenaria atrica* und *Cupiennius salei* wurden in Glasblockschälchen in PBST überführt und mit einer feinen Präpariernadel in die gewünschte Lage gebracht. Einzelne Gliedmaßen der genannten drei Arten und von *Tribolium castaneum* wurden mittels feinsten Wolfram-Minutien in 100% Glycerin präpariert, auf Objektträger verbracht und mit Deckglassplittern abgedeckt.

Vollständige Embryonen von *Tribolium* wurden zur Präparation in 100% Glycerin überführt. Anschließend wurde der Dotter mittels Augenwimpern vorsichtig abgebürstet und entfernt. Die so präparierten Keimstreifen wurden auf Objektträgern ausgebreitet und mit Deckglassplittern abgedeckt. Embryonen von *Drosophila melanogaster* wurden unbehandelt in Glycerin auf Objektträger gebracht und mit Deckgläschen (mit Wachsfüßchen) abgedeckt. Die Präparation von Imaginalscheiben erfolgte in PBST. Gut genährte Wanderlarven wurden in PBST überführt und mit Pinzetten zerteilt, so daß im vorderen Teil die wichtigsten Imaginalscheiben verblieben. Diese Hälfte wurde dann über die Pinzettenspitze umgestülpt und in 4% Formaldehyd fixiert. Nach durchlaufener in situ Hybridisierung wurden die Beinimaginalscheiben vom Fettkörper und den Tracheenresten befreit, in 100% Glycerin auf Objektträger überführt und mit Deckglassplittern abgedeckt.

#### *Mikroskopie und Fotografie*

Vollständige Embryonen von *Glomeris marginata*, *Tegenaria atrica* und *Cupiennius salei* wurden unter einem Binokular (Leica) untersucht und fotografiert. Alle übrigen Arten und die Gliedmaßen der genannten drei Arten lagen als Mikroskopie-Präparate vor und wurden unter einem Axioplan-2 Stereomikroskop (Zeiss) untersucht und fotografiert. Die Fotos wurden als TIFF Dateien gespeichert und mit dem Bildverarbeitungsprogramm Photoshop 5.5 (Adobe) bearbeitet. Das Programm diente zur Korrektur von Farbstichen, Helligkeit und Kontrast und zur Retuschierung von Bildhintergründen und wurde außerdem zum Compositing von Einzelbildern zu Bildtafeln verwendet.

### 2.8 Versuchstierhaltung

#### Der Saftkugler *Glomeris marginata*

Adulte Saftkugler wurden in großen Petrischalen gehalten (etwa 50 Individuen pro Schale), die mit Erde vom Fundort beschickt waren. Die Schalen wurden feucht gehalten und täglich mit verrottendem Buchenlaub versorgt (der Nahrung von *Glomeris marginata*). Unter diesen Bedingungen paarten sich die Tiere im Labor und die Weibchen legten zahlreiche Eier. Nach Beendigung der Fortpflanzungszeit wurden die gesammelten Tiere wieder am Fundort ausgesetzt.

#### Die Kammspinne *Cupiennius salei*

Die verwendeten Spinnen stammten aus der Zucht von Wim Damen, Köln. Die Tiere wurden unter kontrollierten Klimabedingungen (60-80% Luftfeuchte, 25-30 °C Raumtemperatur) in großen Einmachgläsern gehalten deren Boden mit Blumenerde bedeckt war. Die Spinnen wurden regelmäßig mit Wasser und lebenden Hausgrillen (*Acheta domesticus*) versorgt.

#### Der Mehlkäfer *Tribolium castaneum*

Der Großteil der Arbeiten wurde im Labor von Martin Klingler, München durchgeführt, wobei auf die dortigen Ressourcen zurückgegriffen werden konnte. Ergänzende Arbeiten wurden in Köln durchgeführt. Die Käfer wurden dazu in Plastikboxen mit Vollkornmehl und Hefe bei 25 °C gehalten und von Zeit zu Zeit abgesiebt um alte Larvenhäute und tote Käfer zu entfernen. Zur Eiablage wurden die Tiere in weißes Mehl überführt.

#### Die Taufliege *Drosophila melanogaster*

Die Fliegen stammten aus der Zucht von Dr. Thomas Klein, Köln. Sie wurden in Plastikröhrchen gehalten, deren Boden mit Standard-Nährbrei bedeckt war und die mit Schaumstoff-Pfropfen verschlossen waren. Wanderlarven wurden direkt aus dem Nährbrei entnommen. Zur Gewinnung von Embryonen wurden die Fliegen auf Apfelsaft-Agarplatten zur Eiablage gebracht.

### 2.9 Bioinformatik

#### *Alignments*

Pairwise-Alignments von Aminosäuresequenzen für Ähnlichkeitsanalysen wurden auf der Basis der BLOSUM 62 Matrix (Henikoff und Henikoff, 1992) mit dem BLAST Programm (Altschul et al., 1997) durchgeführt (gap opening penalty = 11; gap extension penalty = 1). Die Multiple-Sequences Alignments, welche die Basis für die phylogenetischen Analysen bildeten, wurden mit dem Programm CLUSTAL\_X (Thompson et al., 1997) auf der Grundlage der GONNET Matrix durchgeführt (Gonnet et al., 1992; gap opening penalty = 10; gap extension penalty = 0,2).

#### *Stammbäume*

Zur Untersuchung der Multiple-Sequences Alignments wurden Maximum Likelihood Analysen nach der Quartet Puzzling Methode (Strimmer und von Haeseler, 1996) durchgeführt. Es wurde das Programm-Paket PAUP 4.0b10 (Swofford, 2002) verwendet. Die jeweils verwendeten Einstellungen sind bei den einzelnen Stammbäumen im Ergebnisteil angegeben (siehe dort).



### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Untersuchungen zur Musterbildung während der Achsenbildung

##### 3.1.1 Gradienten-bildende Morphogene

Das Genprodukt des *decapentaplegic* (*dpp*) Gens aus *Drosophila* gehört zur Familie der TGF-beta Proteine (z.B. Raftery und Sutherland, 1999). Im Genom von *Drosophila* finden sich aus dieser Gengruppe noch zwei weitere Gene: *screw* (*scw*) und *glass bottom boat* (*gbb*). Auch im Genom der Maus und anderer Deuterostomia finden sich mehrere Vertreter dieser Genfamilie. Die Klärung der Orthologie der im Rahmen dieser Dissertation bearbeiteten Gene der TGF-beta Familie mit dem *dpp* Gen aus *Drosophila* ist daher notwendig, um eine Verwechslung mit anderen Genen der Familie auszuschließen. Die phylogenetische Analyse (Abb. 3.1) ergibt zwei klar geschiedene Gruppen (reliability value = 82): die eine enthält die *dpp* Gene aus verschiedenen Arthropoden zusammen mit *BMP2* und *BMP4* aus Deuterostomen. Die andere Gruppe enthält alle übrigen TGF-beta Gene. Somit kann als sicher gelten, daß die aus *Glomeris* und *Cupiennius* isolierten Fragmente zu *dpp* aus *Drosophila* ortholog sind. Innerhalb der Gruppe aus *dpp*, *BMP2* und *BMP4* zeigt die phylogenetische Analyse allerdings kein statistisch signifikantes Verzweigungsmuster; viele Kanten sind nicht oder nur mäßig unterstützt (reliability values unter 50 bzw. unter 80).

Das Genprodukt des *wingless* (*wg*) Gens aus *Drosophila* gehört zur Familie der Wnt-Proteine (z.B. Siegfried und Perrimon, 1994). Auch hier enthält das Genom von *Drosophila* noch weitere Gene dieser Familie; insgesamt sind es sieben Mitglieder (Llimargas und Lawrence, 2001). Auch aus anderen Tierarten, wie z.B. der Maus, sind jeweils mehrere *Wnt*-Gene bekannt. Die Evolution dieser Gene und damit die Orthologie der verschiedenen Familienmitglieder ist von mehreren Arbeitsgruppen bearbeitet worden (Jockusch und Ober, 2000; Schubert et al., 2000; Prud'homme et al., 2002). Dabei hat sich herausgestellt, daß die phylogenetische Analyse dieser Genfamilie sehr schwierig ist und

viele Orthologiehypothesen unsicher oder zweifelhaft sind. Eine Gruppierung allerdings gilt als relativ gesichert. Es handelt sich dabei um die *Wnt1* Unterfamilie, zu der *wingless* aus *Drosophila* und *Wnt1* aus der Maus gehören. Auf Grund der Schwierigkeiten die Orthologie der *Wnt*-Gene zu klären, war es natürlich wichtig, plausibel machen zu können, daß es sich bei den aus *Glomeris* und *Cupiennius* isolierten *Wnt*-Fragmenten tatsächlich um Mitglieder der *Wnt1* Unterfamilie handelt. Die phylogenetische Analyse aller *Wnt*-Gene im Genom von *Drosophila* und einiger weiterer *Wnt*-Gene aus anderen Arthropodenarten zeigt, wie erwartet, sehr viele statistisch nicht signifikant unterstützte Kanten (Abb. 3.2). Die fraglichen Fragmente aus *Cupiennius* und *Glomeris* bilden zusammen mit *wingless*-Orthologa aus anderen Arthropoden eine Gruppe, die allerdings weder intern, noch gegenüber den übrigen *Wnt*-Genen signifikant aufgelöst ist. Allerdings bilden die *Wnt1*-Gene zusammen mit den *Wnt10*-Genen eine statistisch signifikant (reliability value = 56) unterstützte Gruppierung, innerhalb derer die *Wnt10*-Gene zusätzlich deutlich abgesetzt sind (reliability value = 83). Somit dürfen die Fragmente aus *Glomeris* und *Cupiennius* wohl als *wingless*-Orthologa gelten.

### *Die Expression von decapentaplegic in Cupiennius salei*

In Stadien kurz vor dem Erscheinen der Extremitätenknospen (zur Übersicht über die Embryonalentwicklung von *C. salei* siehe Seitz (1966)) ist *Cs-dpp* in segmental wiederholten Streifen exprimiert, jeweils einer pro prosomalem Hemisegment (Abb. 3.3A). Die Streifen liegen etwa in der Mitte der Hemisegmente und weisen eine deutliche und scharfe posteriore Grenze auf, die mit großer Wahrscheinlichkeit an die Parasegmentgrenze stößt. Die frühen Extremitätenknospen bestehen nahezu vollständig aus *Cs-dpp* exprimierenden Zellen vom äußeren seitlichen Ende der *Cs-dpp* Streifen (Abb. 3.3B). Während des weiteren Wachstums der Knospen bleibt die Expression jedoch dann zunehmend auf die distale Spitze der Extremitäten beschränkt (Abb. 3.3C,D). Diese Expression ist nicht auf dorsale Anteile der Spitze beschränkt sondern füllt die gesamte Extremitätenspitze aus (Abb. 3.4A,B,F,G,K,L). In späteren Stadien erscheinen in den Beinen und Pedipalpen Ringe von *Cs-dpp* Expression während die Expression an der Spitze an Stärke abnimmt (Abb. 3.3E; 3.4H-J,M-O). Ähnliche Ringe sind für die Extremitäten von Mehlkäfern, Heuschrecken und Grillen beschrieben worden (Niwa et al., 2000; Jockusch et al., 2000). Die Expressionsringe von *Cs-dpp* stehen möglicherweise mit



der Bildung der Gelenke in Verbindung, wie bereits von Jockusch et al. (2000) für Heuschrecken vorgeschlagen wurde. Allerdings fallen die Expressionsringe von *Cs-dpp* nicht mit den Einschnürungen der zukünftigen Gelenke zusammen (siehe Abb. 3.4J und O).

In *Drosophila* zeigt sich vor und während der Entstehung der Primordien der Imaginalscheiben ein lateraler, longitudinal verlaufender Expressionsstreifen, der direkt mit der Initiierung der Bein- und Flügelentwicklung in Verbindung gebracht worden ist (Cohen et al., 1993; Goto und Hayashi, 1997; Kubota et al., 2000). In *Cupiennius* konnte ein vergleichbarer Streifen nicht nachgewiesen werden. Erst sehr spät in der Embryonalentwicklung zeigt sich in *Cupiennius* eine laterale, longitudinale Expression, die allerdings das sich entwickelnde Herz anzeigt und nicht mit der Extremitätenentwicklung in Verbindung steht (nicht gezeigt).

### *Die Expression von wingless in Cupiennius salei*

Die Expression von *Cs-wg* während der Ausbildung der Segmente ist bereits beschrieben worden (Damen, 2002). An dieser Stelle soll das Hauptaugenmerk daher auf der Expression während der Beinentwicklung liegen. Ähnlich wie *Cs-dpp* ist *Cs-wg* kurz vor der Bildung der Extremitätenknospen in segmentalen Streifen exprimiert (Abb. 3.3F). Während die Streifen bei *Cs-dpp* relativ schmal und klar umrissen sind, erscheinen sie bei *Cs-wg* breiter und verwaschen- mit Ausnahme der posterioren Grenze, die wohl wie bei *Cs-dpp* an die Parasegmentgrenze stößt. Sobald die Extremitäten gebildet werden, zeigen sie eine Expression von *Cs-wg* im anterior-ventralen Anteil (Abb. 3.3G,H; 3.5A,C,E). Im Gegensatz zu den Verhältnissen bei *Drosophila* (Struhl und Basler, 1993) reicht die Expression entlang der ventralen Seite nicht bis in die Extremitätenspitze. Mit fortschreitendem Alter erstreckt sich die Expression immer weiter nach distal, reicht aber nie bis ganz an die Extremitätenspitze (Abb. 3.5B,D,F). In den Cheliceren scheint die Expression entlang der Mitte zu verlaufen (Abb. 3.5B). Tatsächlich spiegelt das aber nur die leichte Drehung der Cheliceren während der Ontogenese wider, so daß sie in der Seitenperspektive die ventrale Seite präsentieren.

### *Die Expression von decapentaplegic in Glomeris marginata*

Von allen Genen die bis dato in *Glomeris* untersucht worden sind, ist *Gm-dpp* das mit Abstand am schwächsten exprimierte Gen. Ein spezifisches Signal in der in situ Hybridisierung zeigt sich erst nach etwa 6 Stunden, wohingegen der Regelfall bei anderen Genen etwa 15 bis 30 Minuten beträgt. Die lange Färbezeit bedingt auch die starke Hintergrundfärbung, die in den Präparaten zu sehen ist (Abb. 3.6; 3.7). In jüngeren Entwicklungsstadien zeigt sich ein spezifischer Farbniederschlag in den sich bildenden Extremitätenknospen und entlang des äußeren, also dorsalen Randes des Neuroektoderms (Abb. 3.6A, Pfeil). Es ist bekannt, daß das Neuroektoderm jedes Hemisegments in ein dorsales, ein mediales und ein ventrales Drittel zerfällt (Dove, 2003). Möglicherweise ist *Gm-dpp* an der Ausbildung des dorsalen Drittels beteiligt. Auch eine Rolle bei der Entwicklung des ventralen Drittels ist möglich, denn *Gm-dpp* ist kurzfristig auch dort entlang der ventralen Mittellinie exprimiert (Abb. 3.6B, Pfeile). Ein weiterer Expressionsort im Zentralnervensystem befindet sich im Bereich der Sehzentren (Abb. 3.6C-E, Pfeile). *Gm-dpp* ist ab dem Stadium 4 (zur Stadien-Einteilung siehe Dohle (1964); Janssen et al., (2004)) auch entlang des äußeren Randes des Keimstreifs exprimiert, dort wo sich das Herz bilden wird (Abb. 3.6D,E, Pfeilköpfe). Später zeigen sich dorsal segmental wiederholte, großflächige Expressionsorte, die wohl auch mit der Bildung des Herzens in Verbindung stehen (Abb. 3.6F, Pfeilköpfe). Schließlich findet sich eine Expression von *Gm-dpp* im Stomodäum und im Proktodäum.

In den Extremitätenknospen findet sich schon zum Zeitpunkt ihrer Bildung eine schwache Expression (Abb. 3.6A,B). Später zeigen die verschiedenen Extremitätentypen recht unterschiedliche Expressionsmuster. In den Rumpfbeinen ist die stärkste Expression an der Spitze festzustellen. In frühen Stadien füllt die Expression nahezu die gesamte Spitze aus, wobei allerdings die Grenze zum ventralen, expressionsfreien Teil recht scharf ist (Abb. 3.7A). Entlang der dorsalen Seite der Beine ist ebenfalls eine Expression von *Gm-dpp* zu sehen, die aber deutlich schwächer ist als diejenige in der Spitze. In älteren Beinen (Stadium 5) ist die Expression in der Spitze sehr deutlich auf den dorsalen Anteil beschränkt (Abb. 3.7E). Die Expression entlang der dorsalen Seite der Beine bleibt bestehen, wird aber diffuser. Schließlich verschwindet ab Stadium 6 die Expression von *Gm-dpp* in den Beinen fast vollständig (Abb. 3.7I). Die dorsale Expression ist kaum mehr nachzuweisen und die Expression an der Spitze ist nur noch in wenigen Zellen etwas deutlicher zu sehen.

In der Maxille zeigen sich sehr früh eine dorsale und eine ventrale Expressionsdomäne (Abb. 3.7B). Die ventrale Domäne befindet sich an der internen Basis der Maxille in dem Teil, der einen Beitrag zur Intermaxillarplatte leistet. Diese Domäne nimmt an Expressionsstärke beständig ab (Abb. 3.7F) und ist etwa ab Stadium 6 völlig verschwunden (Abb. 3.7J). Die dorsale Domäne zieht sich entlang des äußeren Randes der Cardo und reicht schwach auch in den Stipes hinein. Auch diese Expressionsdomäne nimmt an Expressionsstärke stetig ab und ist im Stadium 6.1 nur noch sehr schwach nachzuweisen. In der Mandibel findet sich in jüngeren Stadien zunächst nur eine dorsale Expressionsdomäne von *Gm-dpp* entlang der gesamten äußeren Seite der Extremität (Abb. 3.7C). Später beschränkt sich diese Expression auf die äußere Seite des basalen Teils der Mandibel mit einer deutlichen Grenze zum Externlappen (Abb. 3.7G). Im Externlappen entwickelt sich noch etwas später eine neue Expressionsdomäne (Abb. 3.7K, Sternchen). Im Internlappen läßt sich ab Stadium 5 eine deutliche Expressionsdomäne nachweisen, die sich an der inneren Seite des Internlappens befindet (Abb. 3.7G,K, Pfeil). Die Antenne schließlich zeigt das dynamischste Expressionsprofil von *Gm-dpp*. In jüngeren Stadien gibt es eine deutliche dorsale Expression, die auch in der Antennenspitze auf dorsale Zellen beschränkt bleibt (Abb. 3.7D). Daneben zeigt sich eine fleckförmige ventrale Expression und eine weitere Domäne am Übergang zwischen Antennenbasis und Neuroektoderm des Antennalsegments. Die beiden letztgenannten Domänen verschwinden kurz darauf. Im Stadium 5 ist von der ventralen Domäne nichts und von der basalen Domäne kaum mehr etwas zu sehen (Abb. 3.7H). Dafür exprimiert nun offenbar die gesamte dorsale Hälfte der Antenne *Gm-dpp*. Schließlich finden sich im Stadium 6.1 folgende Expressionsdomänen: eine kleine Gruppe von Zellen an der Antennenspitze, ein Ring von Zellen im distalen Drittel, die sehr schwach *Gm-dpp* exprimieren und eine punktförmige proximale Domäne (Abb. 3.7L).

### *Die Expression von wingless in Glomeris marginata*

Die verschiedenen Aspekte der *Gm-wg* Expression während der Entwicklung der Segmente, des Nervensystems und des Verdauungssystems sind bereits beschrieben worden (Janssen et al., 2004). Hier soll das Hauptaugenmerk deshalb auf der Expression von *Gm-wg* während der Gliedmaßenentwicklung liegen. Vor Beginn der Extremitätenentwicklung findet sich in jedem Hemisegment etwa in dessen Mitte ein

Expressionsstreifen, der über das Neuroektoderm und das zukünftige Beingewebe hinwegzieht. Vergleiche mit der Expression von *engrailed* (*Gm-en*) zeigen, daß die Expression von *Gm-wg* tatsächlich die Parasegmentgrenze beachtet und somit in Zellen des anterioren Kompartiments lokalisiert ist (Janssen et al., 2004). Die Extremitätenknospen bilden sich aus dem Gewebe am äußeren Ende der *Gm-wg* Streifen. Präparate von Hemisegmenten des Stadiums 3 zeigen für alle vier Gliedmaßentypen, daß sich die *Gm-wg* Expression in einem mehr oder weniger durchgängigen Streifen über Zellen des Neuroektoderms hinweg bis in die Extremitätenknospen erstreckt (Abb. 3.8A-D). Das Ausmaß mit dem sich die Expression in die Knospen erstreckt ist für die Extremitätentypen unterschiedlich. In der Antennenknospe ist die Expression schon frühzeitig auf die ventrale Hälfte beschränkt (Abb. 3.8D). In der Maxille und in der Mandibel sind größere Bereiche einbezogen, etwa zwei Drittel der Knospen (Abb. 3.8B,C). In den Knospen der Rumpfbeine schließlich reicht die *Gm-wg* Expression am weitesten. Nahezu die gesamte Knospe exprimiert das Gen (Abb. 3.8A).

In den Rumpfbeinen ist die Expression von *Gm-wg* im weiteren Verlauf der Embryonalentwicklung auf die Ventralseite beschränkt (Abb. 3.8E,I,M,Q). Sie ist durchgängig von der Basis der Beine bis zur Spitze, erscheint aber ungleichmäßig in ihrer Stärke: nahe der Basis und im distalen Teil der Beine ist die Expression sehr stark, während dazwischen ein Bereich deutlich schwächerer Expression liegt. Etwas ähnliches kann man in der Antenne beobachten (Abb. 3.8H,L,P,T). Auch hier ist die Expression auf die Ventralseite beschränkt und im distalen Teil der Antenne sehr deutlich stärker als weiter proximal. Allerdings findet sich in der Antenne proximal kein Bereich stärkerer Expression, wie es ihn in den Rumpfbeinen gibt.

In der Maxille kann man ein sehr dynamisches Expressionsprofil von *Gm-wg* beobachten. Etwa ab Stadium 4 ist das Gen entlang der ventralen Kante des Stipes und des Bereichs, der zur Bildung der Intermaxillarplatte beiträgt exprimiert (Abb. 3.8F). Man kann deutlich drei nicht vollständig getrennte Expressionsdomänen erkennen. Die innere Domäne (in der Intermaxillarplattenanlage) ist stets diffuser als die zwei anderen Bereiche und zerfällt ab Stadium 5 in zwei separate Expressionsorte (Abb. 3.8J,N). Die beiden äußeren Domänen im Stipes bleiben deutlich getrennt und erinnern sehr an das Expressionsmuster von *Gm-Dll* (siehe weiter unten). Allerdings sind die Expressionsmuster der beiden Gene zumindest teilweise komplementär. Es wurden keine Doppelfärbungen durchgeführt, doch anhand der morphologischen Landmarken (die beginnende Einschnürung zwischen Cardo und Stipes und das langsame Hervortreten der

Sinnespalpenanlagen des Stipes) wird klar, daß die Muster von *Gm-wg* und *Gm-Dll* nicht zur Deckung gebracht werden können. Tatsächlich spart die *Gm-wg* Expression im Stadium 6.1 die Anlagen der Sinnespalpen und Lobi interiori aus und umrahmt diese förmlich (Abb. 3.8R), während *Gm-Dll* in den besagten Primordien exprimiert ist (siehe unten). In der Mandibel schließlich findet ebenfalls eine Zersplitterung der anfänglich einheitlichen Expression statt. Im Externlappen bleibt die Expression von *Gm-wg* stets stärker und ist durch einen Bereich schwächerer Expression von der Domäne im Internlappen getrennt (Abb. 3.8G,K,O,S). Im Internlappen spaltet sich die Expression auf (Abb. 3.8K), zieht sich von der Spitze des Internlappens zurück (Abb. 3.8O) und wird schließlich schwächer (Abb. 3.8S).

### **Abbildung 3.1**

Phylogenetische Analyse von *Cs-dpp*, *Gm-dpp* und anderen TGF-beta-Proteinen. Dargestellt ist das ungewurzelte majority-rule Konsensusphylogramm, das aus 1000 Zwischenbäumen errechnet wurde, die mit der Quartet Puzzling Methode nach Strimmer und von Haeseler (1996) erzeugt wurden. Die Zahlen an den Kanten geben die sog. reliability values an. Abkürzungen: siehe Abkürzungsverzeichnis S. 2-5.

### **Abbildung 3.2**

Phylogenetische Analyse der *Wnt*-Proteine aus *Drosophila* und anderen Arthropoden. Dargestellt ist das ungewurzelte majority-rule Konsensusphylogramm, das aus 1000 Zwischenbäumen errechnet wurde, die mit der Quartet Puzzling Methode nach Strimmer und von Haeseler (1996) erzeugt wurden. Die Zahlen an den Kanten geben die sog. reliability values an. Abkürzungen: siehe Abkürzungsverzeichnis S. 2-5.



### Abbildung 3.3

Expression von *Cs-dpp* (A-E) und *Cs-wg* (F-H) in *Cupiennius salei* Embryos. (A) Embryo bei ungefähr 90 hnE. *Cs-dpp* ist in segmentalen Streifen exprimiert. Die Ausdehnung des 1. Laufbeinsegments ist durch die Klammer angezeigt. Der Pfeil deutet auf die vermutliche Lage der Parasegmentgrenze. (B) Embryo bei ca. 110 hnE. *Cs-dpp* Expression beschränkt sich auf die Extremitätenknospen. (C) Embryo bei ca. 120 hnE. *Cs-dpp* ist auf die distalen Teile der Knospen beschränkt. (D) Kurz vor Beginn der Umrollung ist *Cs-dpp* auf die Spitze der Extremitäten beschränkt. (E) Nach dem Rückenschluß ist *Cs-dpp* in Ringen im Bein exprimiert. Die longitudinale Schwärzung (Sternchen) ist ein bekanntes in situ Hybridisierungs-Artefakt in späten Embryonalstadien. (F) Embryo etwa bei 90 hnE. *Cs-wg* ist in breiten, segmentalen Streifen exprimiert. Klammer und Pfeil: siehe A. (G,H) Frühes bzw. mittleres Umrollungsstadium. *Cs-wg* ist in einem anterior-ventralen Streifen in allen Gliedmaßen exprimiert. Anterior ist links in allen Abbildungen. Abkürzungen: Die Ziffern 1-5 kennzeichnen die opisthosomalen Segmente; weitere Abkürzungen: siehe Abkürzungsverzeichnis S. 2-5.

### Abbildung 3.4

Expression von *Cs-dpp* in den Gliedmaßen. (A-E) Chelicere, (F-J) Pedipalpus, (K-O) Laufbein bei jeweils 145, 155, 175, 200 und 230 hnE (spaltenweise von links nach rechts). Das Sternchen in allen Teilabbildungen zeigt die distale Expression an. Die Pfeile deuten auf sukzessive entstehende Expressionsringe. Abkürzungen: siehe Abkürzungsverzeichnis S. 2-5.



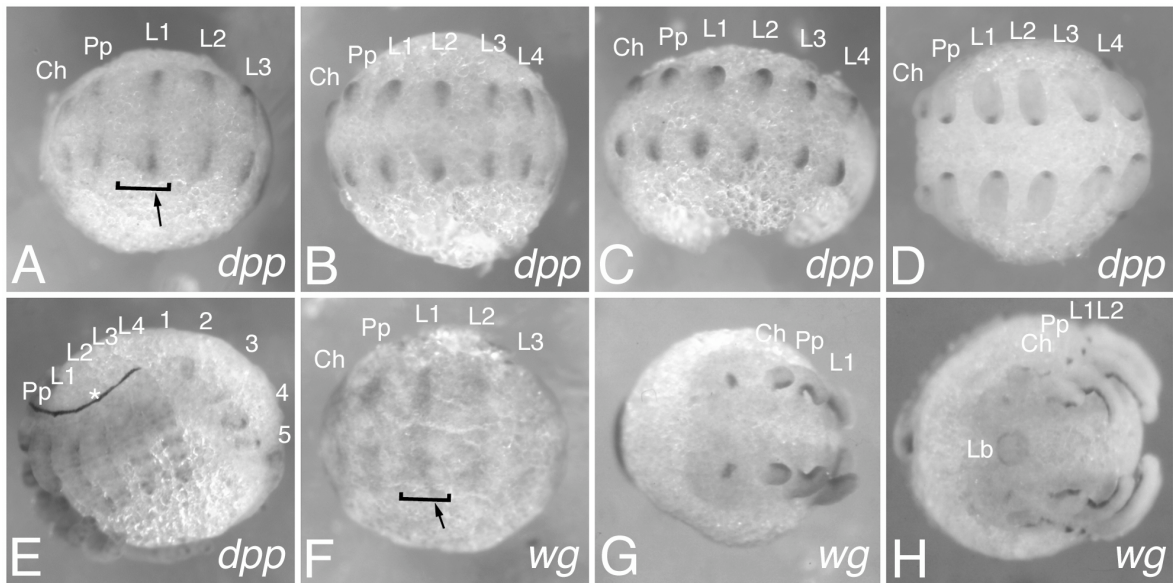


Abb. 3.3

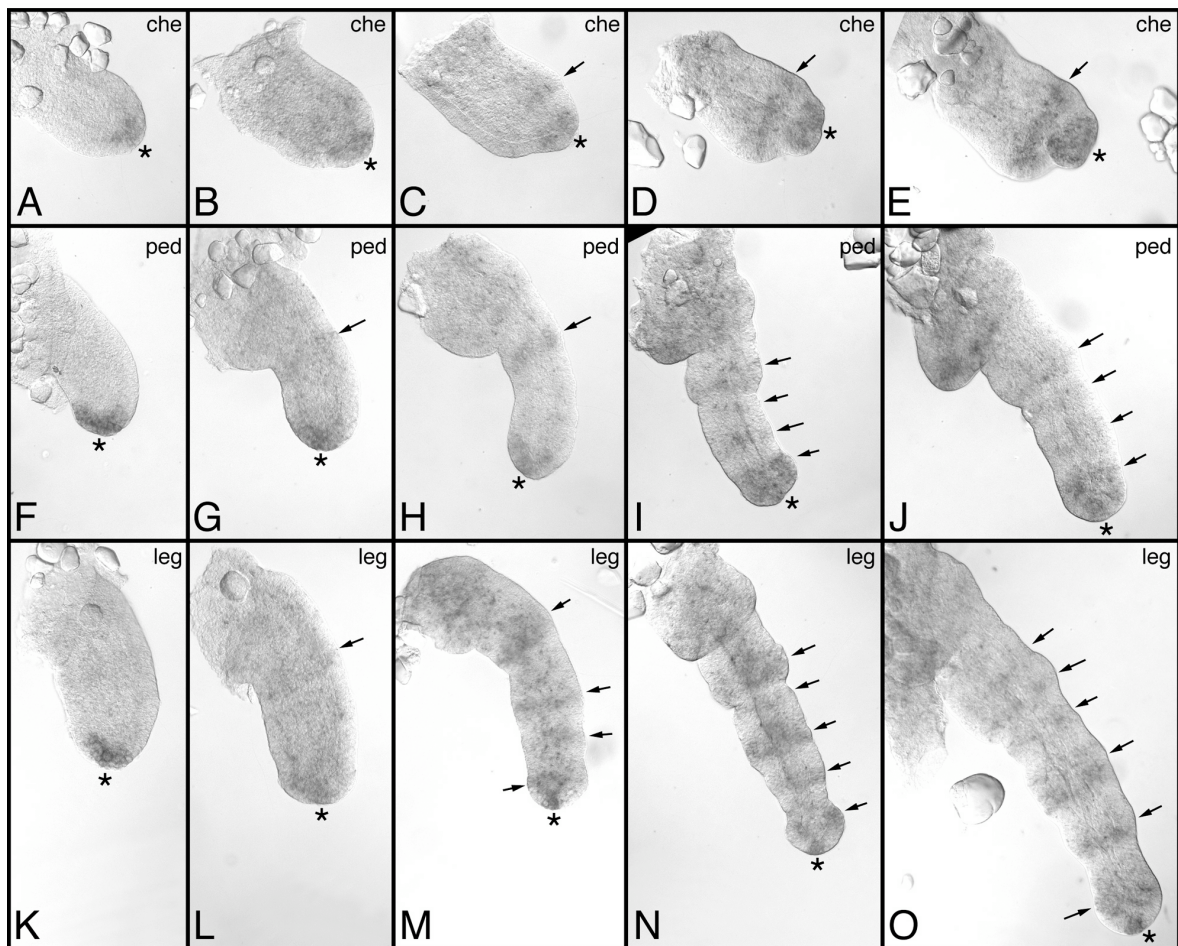


Abb. 3.4

### **Abbildung 3.5**

Expression von *Cs-wg* in den Gliedmaßen. (A,B) Chelicere, (C,D) Pedipalpus, (E,F) Laufbein bei jeweils 145 und 230 hnE (spaltenweise von links nach rechts). *Cs-wg* Expression ist in allen Gliedmaßen in einem ventralen anterioren Streifen exprimiert. Die Chelicere dreht sich während der Ontogenese, so daß sie in späten Stadien nach lateral die Ventralseite präsentiert. Dadurch scheint in Abb. 3.5B der *Cs-wg* Streifen mittig zu verlaufen. Abkürzungen: siehe Abkürzungsverzeichnis S. 2-5.

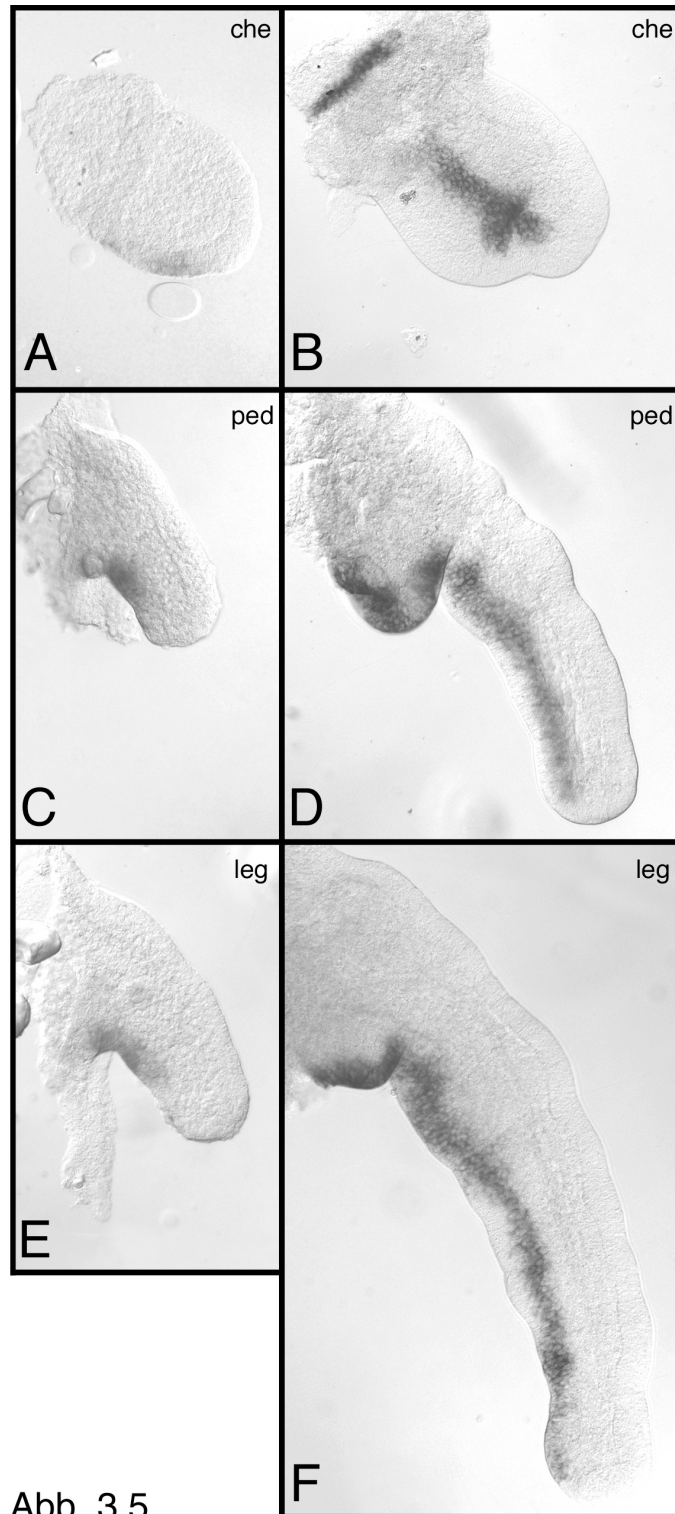


Abb. 3.5

### Abbildung 3.6

Expression von *Gm-dpp* in *Glomeris* Embryos. (A) Stadium 2. Der Pfeil deutet auf Expression im dorsalen Teil des Neuroektoderms. (B) Stadium 3. Die Pfeile deuten auf Expression im dorsalen und ventralen (mittigen) Teil des Neuroektoderms. (C) Stadium 3, Kopfansicht. Der Pfeil deutet auf Expression im Gehirn. (D) Stadium 4. Pfeil: Expression im Augenlappen; Sternchen: Expression im Antennalneuromer; Pfeilköpfe: Expression im Herz. (E) Stadium 5. Pfeil: Expression im Augenlappen; Pfeilköpfe: Expression im Herz. (F) Stadium 6.1. Die Pfeilköpfe deuten auf Expression im dorsalen Anteil des Keimstreifs, die wahrscheinlich mit der Bildung des Herzens in Verbindung steht. A-E sind Ventralansichten. F ist eine Lateralansicht. Abkürzungen: siehe Abkürzungsverzeichnis S. 2-5.

### Abbildung 3.7

Expression von *Gm-dpp* in den Gliedmaßen. (A,E,I) Rumpfbeine; (B,F,J) Maxille; (C,G,K) Mandibel; (D,H,L) Antenne. Die Pfeile in A,E,I,D,H,L deuten auf die distale Expressionsdomäne in den Rumpfbeinen und der Antenne und deren Grenze zum ventralen Teil der Extremität, wo *Gm-dpp* nicht exprimiert wird. Die Pfeile in B,F,G,K deuten auf eine ventrale Expressionsdomäne in den Mundwerkzeugen. Die Pfeilköpfe in allen Teilabbildungen zeigen auf eine schwächere dorsale Expression. Das Sternchen in K zeigt eine Expressionsdomäne im Externlappen an. Das Sternchen in D liegt neben der neuralen Expression an der Antennenbasis. Das Sternchen in L deutet auf eine proximale Expressionsdomäne in der Antennenbasis. Das Quadrat in D zeigt eine ventrale Expressionsdomäne in der Antenne an. Das Quadrat in L liegt neben dem schwachen Expressionsring in der Antenne. Abkürzungen: siehe Abkürzungsverzeichnis S. 2-5.  
Berichtigung: statt st6 lies st6.1 in Abb. 3.7I-L.

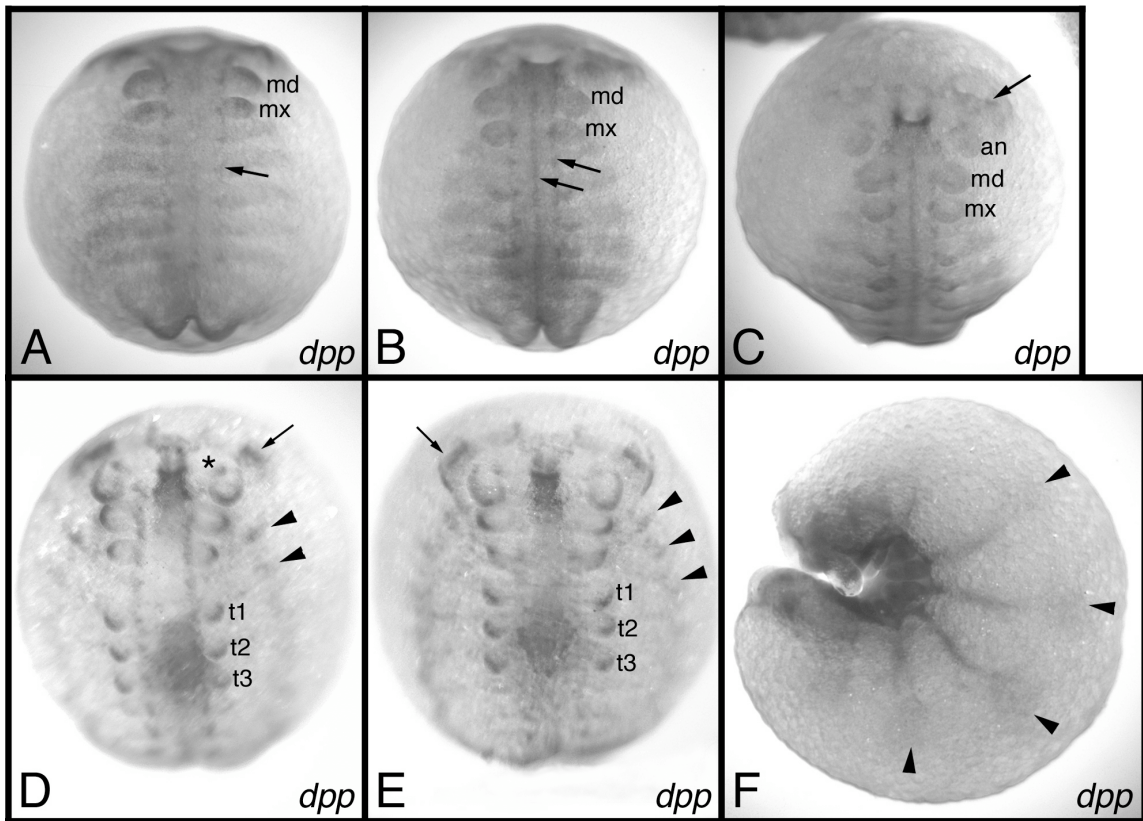


Abb. 3.6

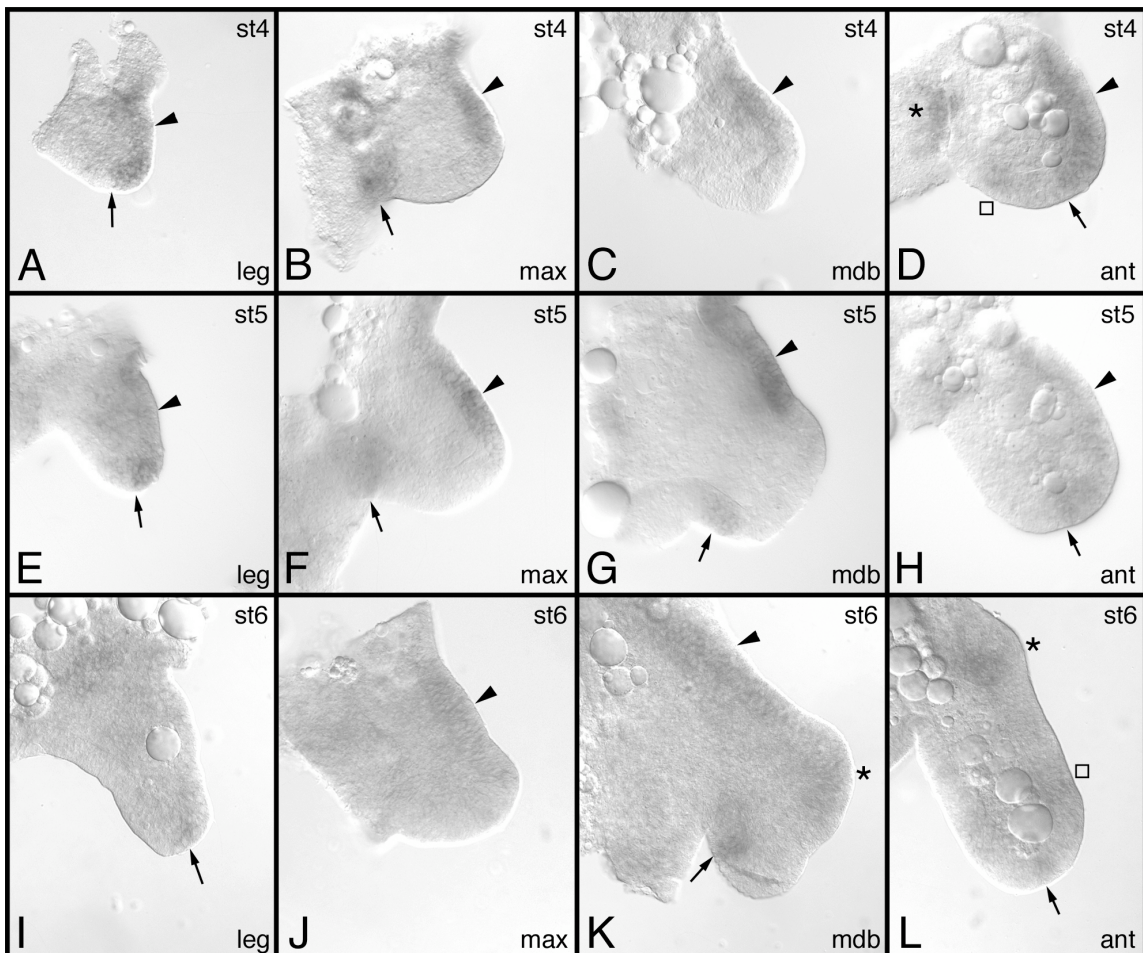


Abb. 3.7

### Abbildung 3.8

Expression von *Gm-wg* in den Gliedmaßen. (A,E,I,M,Q) Entwicklung des Rumpfbeins. (B,F,J,N,R) Entwicklung der Maxille. (C,G,K,O,S) Entwicklung der Mandibel. (D,H,L,P,T) Entwicklung der Antenne. Die Pfeilköpfe in A-D und die Pfeile in E,I,M,Q und H,L,P,T deuten auf den Übergang vom ventralen zum dorsalen Teil der Gliedmaßen. Die Pfeile in A-D deuten auf die Expression im Neuroektoderm des jeweiligen Segments. Die Pfeile in F,J,N,R zeigen die Expression in der Umgebung der Sinnesorgane der Maxille an. Die Quadrate und Sternchen in G,K,O,S deuten auf die Expression von *Gm-wg* im Intern- bzw. Externlappen der Mandibel. Abkürzungen: siehe Abkürzungsverzeichnis S. 2-5.

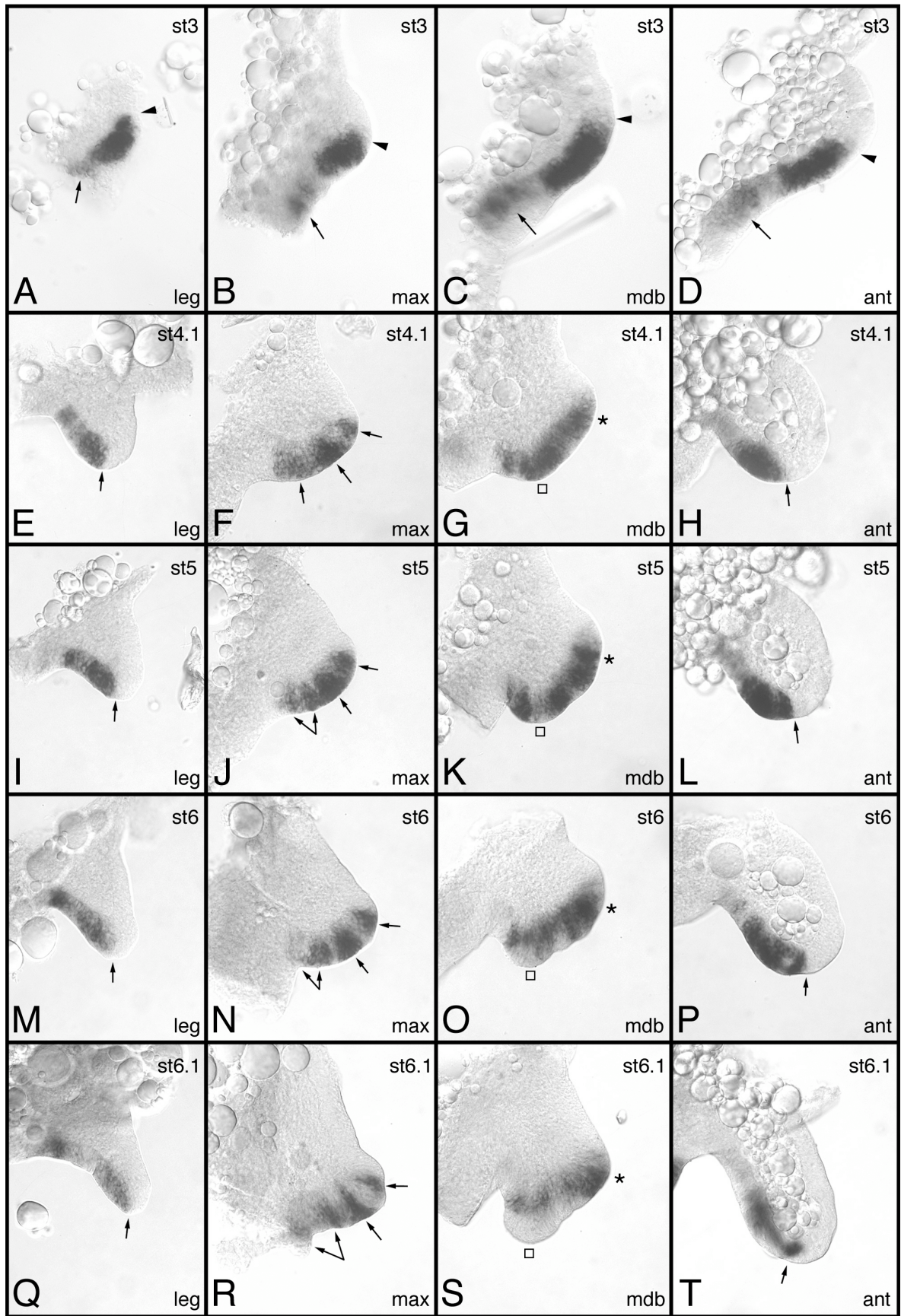


Abb. 3.8

### 3.1.2 Faktoren des dorso-ventralen Systems

In *Drosophila* aktivieren *wg* und *dpp* zwei Faktoren, *H15* und *omb*, die mit der Ausbildung der dorso-ventralen Achse der Beine in Verbindung gebracht werden (Brook und Cohen, 1996; Maves und Schubiger, 1998). Beide Gene gehören zur Familie der T-box Gene, benannt nach der konservierten funktionalen Domäne, die sie enthalten (z.B. Wilson und Conlon, 2002). Diese Genfamilie ist im Genom von *Drosophila* mit insgesamt acht Mitgliedern vertreten und auch in *Glomeris*, *Cupiennius* und einer anderen Spinnenart, *Tegenaria atrica*, konnten mehrere Vertreter isoliert werden. Eine phylogenetische Analyse sollte daher Klarheit über die Orthologie der klonierten Fragmente mit den *Drosophila*-Genen bringen. Aus *Cupiennius* und *Glomeris* wurden jeweils zwei verschiedene Fragmente isoliert, die große Ähnlichkeit zu *H15* aus *Drosophila* aufweisen. Auch in *Drosophila* existiert ein zweites *H15*-ähnliches Gen (*CG6634*). Die phylogenetische Analyse legt allerdings nahe, daß es sich bei den paarweise auftretenden *H15*-artigen Genen um unabhängige Duplikationen handelt, da die Gene nach Arten getrennt im Phylogramm erscheinen (Abb. 3.9). Aus *Tegenaria* wurden drei verschiedene *H15*-artige Gene isoliert. Sie wurden auf Grund ihrer Expressionsmuster (siehe weiter unten) in ihrer Numerierung an die aus *Cupiennius* isolierten Gene angeglichen. In der phylogenetischen Analyse bestätigte sich diese Zuweisung (Abb. 3.9). Das weist zum einen darauf hin, daß spätestens der gemeinsame Vorfahr der Lycosaeformia (Trichter-, Raub-, Wolfs- und Kammspinnen) mindestens zwei *H15* Paraloga besessen haben muß. Zum anderen wird nahegelegt, daß ein Orthologon zu *Ta-H15-3* in *Cupiennius* existieren muß, bislang jedoch nicht isoliert werden konnte. Die Expressionsanalyse (siehe unten) bekräftigt diese Vermutung. Die übrigen isolierten T-box-Fragmente weisen eine große Ähnlichkeit zu *omb* aus *Drosophila* auf. Die phylogenetische Analyse bestätigt diese Zuweisung mit statistisch signifikanter Unterstützung (reliability value = 81; Abb. 3.9).

#### 3.1.2.1 T-box Gene in *Cupiennius* und *Glomeris*

*Die Expression von optomotor-blind in Cupiennius salei*

*Cs-omb* ist dorsal im äußeren Ektoderm aller Gliedmaßen exprimiert und zusätzlich auch dorsal und ventral im darunterliegenden, mesodermalen Gewebe (Abb. 3.11). In den



Pedipalpen und Laufbeinen ist die stärkste Expression im äußeren Ektoderm ganz distal und ganz proximal zu finden (Abb. 3.11D-F; G-J). Dazwischen ist *Cs-omb* in einem von distal nach proximal an Stärke abnehmenden Gradienten exprimiert. Bemerkenswerterweise ist *Cs-omb* deutlich auf die dorsale Seite der Extremitätenspitzen beschränkt, wohingegen *Cs-dpp* in der gesamten Spitze exprimiert wird. In älteren Stadien erscheinen im Innern von Pedipalpen und Laufbeinen im Bereich des Femurs und der Tibia Bereiche sehr intensiver Expression, die offenbar mit dort entstehenden Sinnesorganen (Propriorezeptoren?) zu tun hat (Abb. 3.11F,J).

Abgesehen von der Expression in den Gliedmaßen umfaßt das Expressionsmuster von *Cs-omb* auch eine Expression im Labrum (Abb. 3.10A), segmental wiederholte Punkte im Opisthosoma (Abb. 3.10C) und zwei großflächige Expressionsdomänen in den Kopflappen (Abb. 3.10A,B). Diese stehen wohl mit der Bildung der Sehzentren im Gehirn und der Augen in Verbindung, ähnlich wie es aus *Drosophila* bekannt ist (Poeck et al., 1993).

### *Die Expression von H15 in Cupiennius salei*

In *Cupiennius* konnten bisher zwei *H15*-artige Gene isoliert werden. Die Expression beider Gene, *Cs-H15-1* und *Cs-H15-2*, in den Pedipalpen und Laufbeinen beschränkt sich auf relativ kleine proximale Domänen auf der Ventralseite (Abb. 3.12E-H; I-M). Die Expressionsdomänen beider Gene sind sich sehr ähnlich, aber nicht völlig gleich. *Cs-H15-1* ist in einer etwas großflächigeren Domäne exprimiert als *Cs-H15-2*. Außerdem erscheint die Expression von *Cs-H15-2* viel später als die von *Cs-H15-1*. Während *Cs-H15-1* schon in jüngeren Stadien exprimiert ist, konnte die Expression von *Cs-H15-2* in den Beinen erst in mittleren Inversionsstadien nachgewiesen werden. *Cs-H15-1* zeigt zwei weitere Expressionsdomänen in den Beinen und Pedipalpen: ein proximaler Fleck dorsal im Gewebe unterhalb der Epidermis und ein distaler Fleck in der ventralen Epidermis nahe der Beinspitze (Abb. 3.12F,G; J-L). Diese beiden Expressionsdomänen haben höchstwahrscheinlich mit der dorso-ventralen Musterbildung im Bein nichts zu tun, sondern zeigen wohl Nervengewebe (proximaler Fleck) oder tarsale Sinnesorgane (distaler Fleck) an. Diese beiden Domänen fehlen im Expressionsmuster von *Cs-H15-2*. In den Cheliceren sind beide Gene nur schwach exprimiert und auf ein kleines ventrales Gebiet beschränkt (Abb. 3.12A-D). *Cs-H15-2* ist die meiste Zeit während der

Embryonalentwicklung in der Chelicere überhaupt nicht nachzuweisen; nur gegen Ende der Entwicklung findet man eine sehr schwache Expressionsdomäne (Abb. 3.12D).

Abgesehen von der Expression in den Gliedmaßen konnte die Expression beider *H15*-Gene aus *Cupiennius* auch in anderen Organen nachgewiesen werden. Expression findet sich im Labrum (Abb. 3.10D,G), im Opisthosoma in einem segmental wiederholten Muster (Abb. 3.10F,I), im Herzen (Abb. 3.10D,I) und in wenigen Zellen im Gehirn (Abb. 3.10D). Auch in diesen Organen zeigen die zwei Gene sehr ähnliche aber nicht ganz identische Muster. Dieser Aspekt der *H15*-Gene in *Cupiennius* wurde im Rahmen dieser Dissertation jedoch nicht näher untersucht.

### *Die Expression von optomotor-blind in Glomeris marginata*

Über alle untersuchten Entwicklungsstadien hinweg fällt eine segmentale Expression des Gens *Gm-omb* auf. In jüngeren Stadien befindet sich diese Expression nur an den Stellen, an denen sich die Extremitäten entwickeln werden (Abb. 3.13A). Auch im Postmaxillarsegment ist kurzfristig eine schwache Expression nachweisbar, nicht aber im Prämandibularsegment. Sobald sich dorsale Gewebeanteile am Keimstreif entwickeln, läßt sich auch hier eine segmentale Expression feststellen (Abb. 3.13B-D); diese Expression fällt schließlich mit den Grenzen zwischen den Tergiten zusammen (Abb. 3.13E). In den herauswachsenden Gliedmaßen beschränkt sich die Expression von *Gm-omb* auf die dorsale Seite der Extremitäten. In den Rumpfbeinen läßt sich gut erkennen, daß sich die Expression entlang der gesamten PD-Achse erstreckt, bis hinein in die Beinspitze, wo sie jedoch niemals auf ventrale Bereiche übergreift (Abb. 3.14A,E). Proximal ist eine Verbreiterung der Expressionsdomäne zu beobachten, doch auch hier bleiben ganz ventrale Bereiche stets frei von *Gm-omb* Expression. In der Maxille zieht sich die Expression entlang des äußeren (dorsalen) Randes des Cardo (Abb. 3.14B,F). In den Stipes greift die Expression nicht über. Ein ähnliches Muster zeigt sich in der Mandibel. Dort findet sich eine starke Expression entlang des äußeren Randes des Basalteils (Abb. 3.14C,G); auch in der Mandibel erstreckt sich die Expression nicht in weitere Teile (Externlappen und Internlappen). In der Antenne zeigt sich ein etwas komplexeres Muster. Wie in den Rumpfbeinen ist *Gm-omb* in der dorsalen Hälfte exprimiert, und die Grenze zum ventralen, expressionsfreien Bereich ist noch schärfer als in den Beinen (Abb. 3.14D,H). Zusätzlich zeigt sich aber eine nach ventral ausstrahlende, interne Expression (Abb. 3.14H), die

möglicherweise mit der Innervierung von Sinnesorganen in der Antenne in Verbindung steht.

Abgesehen von der Expression in den Gliedmaßen und in den Segmenten selbst, ist *Gm-omb* auch im Zentralnervensystem exprimiert. Starke und großflächige Expression zeigt sich in allen untersuchten Entwicklungsstadien in den Augenlappen (Abb. 3.13A-E). Etwa ab Stadium 4 erscheint ventral eine segmental wiederholte Expression: einzelne, wie Perlen an einer Schnur aufgereihte Zellen ziehen von einer Seite des Keimstreifs über die ventrale Mittellinie hinweg auf die andere Keimstreifseite (Abb. 3.13D, Pfeilköpfe). Diese Expression steht wohl mit der Kommissurbildung im sich entwickelnden Bauchmark in Zusammenhang. Abschließend soll noch die Expression im sich bildenden Verdauungssystem erwähnt werden: starke Expression ist im Stomodäum zu sehen (Abb. 3.13A-D) und auch in den das Proktodäum säumenden Analklappen findet sich eine schwächere Expression (Abb. 3.13C-E).

### *Die Expression von H15 in Glomeris marginata*

Beide Gene, *Gm-H15-1* und *Gm-H15-2*, sind in einem segmental wiederholten Muster im Keimstreif exprimiert (Abb. 3.15A-G). Die Expressionsstärke von *Gm-H15-2* scheint allerdings insgesamt wesentlich schwächer zu sein, als die von *Gm-H15-1*, mit zwei Ausnahmen, der Expression in der Maxille und in der Antenne (siehe unten). Neben der segmentalen Expression sind beide Gene im Gehirn exprimiert, wobei *Gm-H15-2* allerdings nur in wenigen Zellen des Antennallappens nachweisbar ist. Im Gegensatz dazu ist *Gm-H15-1* großflächiger im Gehirn exprimiert (Abb. 3.15C). Des Weiteren ist *Gm-H15-1* im Herzen exprimiert (Abb. 3.15B,C), ein Aspekt, der im Muster von *Gm-H15-2* fehlt (Abb. 3.15E-G).

In den Rumpfbeinen zeigen die zwei *H15*-Gene unterschiedliche Expressionsmuster. *Gm-H15-1* ist zunächst in einer ventralen Domäne exprimiert. Diese Domäne reicht jedoch weder bis an das proximale Ende, noch bis in die Spitze der Beine (Abb. 3.16A). Das bleibt während der Embryonalentwicklung erhalten (Abb. 3.16E,I). Ab Stadium 5 kommt in der Spitze eine streifenförmige Domäne hinzu (Abb. 3.16E,I, Pfeil). Diese streifenförmige Domäne findet sich in schwächerer Ausprägung auch im Expressionsmuster von *Gm-H15-2* (Abb. 3.16Q,U), allerdings fehlt die ventrale Expression (Abb. 3.16M,Q,U). In der Maxille zeigen beide Gene ein sehr ähnliches

Expressionsmuster. Im Stadium 4 sind beide Gene in den Primordien der Sinnespalpen des Stipes exprimiert (Abb. 3.16B,N). *Gm-H15-1* zeigt darüber hinaus bereits beginnende Expression in den Primordien der Lobi interiori. In den folgenden Stadien sind beide Gene in den Sinnespalpen und Lobi interiori exprimiert (Abb. 3.16F,J,R,V). In der Mandibel fehlt jegliche Expression der beiden *H15*-Gene (Abb. 3.16C,G,O,S). Lediglich in späteren Stadien zieht die segmentale Expression im Keimstreif, die an der Basis der Extremitäten entlangläuft und auch in den Präparaten in Abb. 3.16 zu sehen ist, in die Mandibelbasis hinein (Abb. 3.16K,W). In der Antenne schließlich sind *Gm-H15-1* und *Gm-H15-2* in den Anlagen der vier Sinneszapfen exprimiert (Abb. 3.16D,H,L,P,T,X). Die Expression von *Gm-H15-1* ist von Beginn an sehr stark. *Gm-H15-2* dagegen ist zunächst nur relativ schwach exprimiert (Abb. 3.16P), nimmt dann aber an Stärke zu (Abb. 3.16T) und ist schließlich sehr stark exprimiert (Abb. 3.16X). Die Expression in den Sinneszapfen der Antenne ist die mit Abstand stärkste Expressionsdomäne im Muster der im übrigen durchweg schwachen *Gm-H15-2* Expression.

### 3.1.2.2 Ergänzende Untersuchungen in anderen Arten

#### *Die Expression von CG6634 in Drosophila melanogaster*

Zwischen der Expression der *H15* Homologa in *Drosophila* und *Cupiennius* bestehen auffällige Unterschiede. Allerdings findet sich im Genom von *Drosophila* ein weiteres *H15*-ähnliches Gen mit der Celera Genomics Nummer *CG6634*, das sich ebenfalls auf dem linken Arm von Chromosom 2 befindet und nur etwa 45 kb von *H15* entfernt ist (Flybase Consortium, 2003). Es besteht somit die Möglichkeit, daß die aus *Cupiennius* isolierten *H15*-Gene in ihrer Expression nicht *H15* aus *Drosophila* ähneln, sondern dessen Paralogon *CG6634*. Da das Expressionsmuster von *CG6634* zum Zeitpunkt der Durchführung der hier beschriebenen Experimente noch nicht bekannt war, bestimmte ich dessen Expression in Embryos und Larven von *Drosophila melanogaster*. Das Expressionsmuster scheint mit dem von *H15* (Brook und Cohen, 1996; Griffin et al., 2000) völlig identisch zu sein. Im Embryo ist *CG6634* im sich entwickelnden Herzen und im Nervensystem exprimiert (Abb. 3.17A,B,E,F). Desweiteren ist *CG6634* zeitweise in einem Streifenmuster exprimiert, das stark an die Segmentpolaritätsgene erinnert (Abb. 3.17C,D). In der Larve findet sich Expression in den ventralen thorakalen Imaginalscheiben. Die Expression in den

Beinscheiben des dritten Larvenstadiums umfaßt wie beim Gen *H15* einen breiten, ventralen Sektor (Abb.3.17G). Auch die zwei peripheren (proximalen) Expressionspunkte im anterioren bzw. posterioren Kompartiment, wie sie für das *H15* Muster beschrieben wurden (Abu-Shaar und Mann, 1998), sind vorhanden. Die übrigen Imaginalscheiben wurden nicht näher untersucht. Nach Abschluß der hier beschriebenen Experimente wurde das embryonale Expressionsmuster von *CG6634* auch im Rahmen des Berkeley *Drosophila* Genome Projekts bestimmt (Tomancak et al., 2002). Die dort erzielten Ergebnisse stimmen mit den hier vorgestellten Resultaten überein. Die identischen Expressionsmuster und die große Nähe im Genom legen nahe, daß *H15* und *CG6634* derselben Kontrolle unterliegen und durch eine vergleichsweise junge Duplikation (innerhalb der Abstammungsgemeinschaft der Dipteren) aus einem gemeinsamen Vorläufer entstanden sind. Somit unterstützen die Expressionsdaten die phylogenetische Analyse der Aminosäuresequenzen (siehe oben), die bereits darauf hindeutete, daß die verdoppelten *H15*-ähnlichen Gene in *Cupiennius* und *Drosophila* auf unabhängige Duplikationsereignisse zurückgehen. Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß die Expression der beiden *H15*-artigen Gene aus *Cupiennius* weder mit der von *H15*, noch mit derjenigen von *CG6634* übereinstimmt.

### *Die Expression von H15 in Tegenaria atrica*

In *Tegenaria* konnten drei verschiedene *H15*-artige Gene identifiziert werden. *Ta-H15-1* ähnelt in seiner Expression sehr *Cs-H15-1*. Im Embryo findet sich eine Expression im Herzen und im Opisthosoma in einem segmentalen Muster (Abb. 3.18A,B). In den Gliedmaßen ist es in einer kleinen ventral-proximalen Domäne exprimiert und zeigt in den Laufbeinen und (zum Teil) in den Pedipalpen zusätzliche Expressionsorte im proximalen Mesoderm und ventral an der Spitze der Beine (Abb. 3.19A-C). Dieses Muster stimmt sehr gut mit dem Muster von *Cs-H15-1* überein. Das Gen *Ta-H15-2* zeigte in den für die in-situ Hybridisierung zur Verfügung stehenden Stadien kein Expressionsmuster (Daten nicht gezeigt). Dieses Gen zeigt in der phylogenetischen Analyse eine Verwandtschaft zum Gen *Cs-H15-2*, welches ein zeitlich sehr eingeschränktes Expressionsprofil hat und nur in sehr alten Embryonalstadien exprimiert ist (siehe oben). Sollte ähnliches auch auf *Ta-H15-2* zutreffen, könnte damit das Fehlen einer Expression erklärt werden, da von *Tegenaria* keine älteren Stadien für die in-situ Hybridisierung zur Verfügung gestanden haben. Das

Gen *Ta-H15-3* schließlich ist nur in den Extremitäten exprimiert (Abb. 3.18C,D) und unterscheidet sich damit von allen anderen *H15*-artigen Genen aus *Drosophila*, *Cupiennius* und *Glomeris*. Allerdings ist *Ta-H15-3* in den Extremitäten in einer breiten ventralen Domäne exprimiert (Abb. 3.19D-F), was sich deutlich von den Genen in *Cupiennius* unterscheidet und andererseits stark an das Expressionsmuster von *H15* und *CG6634* in *Drosophila* erinnert.



### **Abbildung 3.9**

Phylogenetische Analyse von T-box-Proteinen aus *Drosophila* und anderen Arthropoden. Dargestellt ist das ungewurzelte majority-rule Konsensusphylogramm, das aus 1000 Zwischenbäumen errechnet wurde, die mit der Quartet Puzzling Methode nach Strimmer und von Haeseler (1996) erzeugt wurden. Die Zahlen an den Kanten geben die sog. reliability values an. Abkürzungen: siehe Abkürzungsverzeichnis S. 2-5.



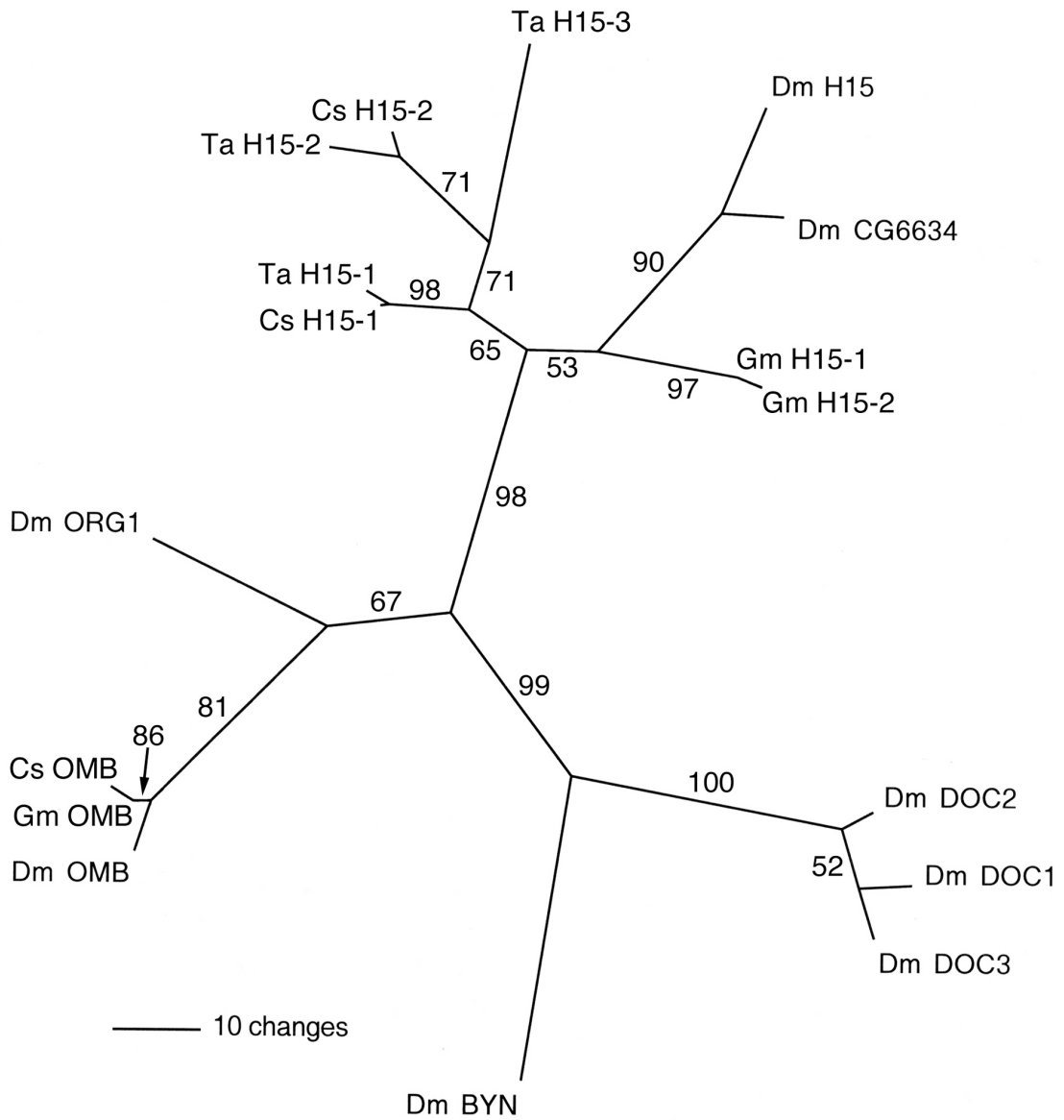


Abb. 3.9

### **Abbildung 3.10**

Expression von T-box-Genen in *Cupiennius salei*. (A-C) Expression von *Cs-omb*. (D-F) Expression von *Cs-H15-1*. (G-I) Expression von *Cs-H15-2*. Alle Embryos sind mittlere Umrollungsstadien. *Cs-omb* ist u.a. in den Augenlappen (Pfeilköpfe in A) exprimiert. Die Pfeilköpfe in D,F und I zeigen auf Expression im Herzen. Die Pfeile in D deuten auf Expression im Gehirn. Links ist anterior in allen Abbildungen. Abkürzungen: Die Ziffern 1-5 kennzeichnen die opisthosomalen Segmente 1-5. Weitere Abkürzungen: siehe Abkürzungsverzeichnis S. 2-5.

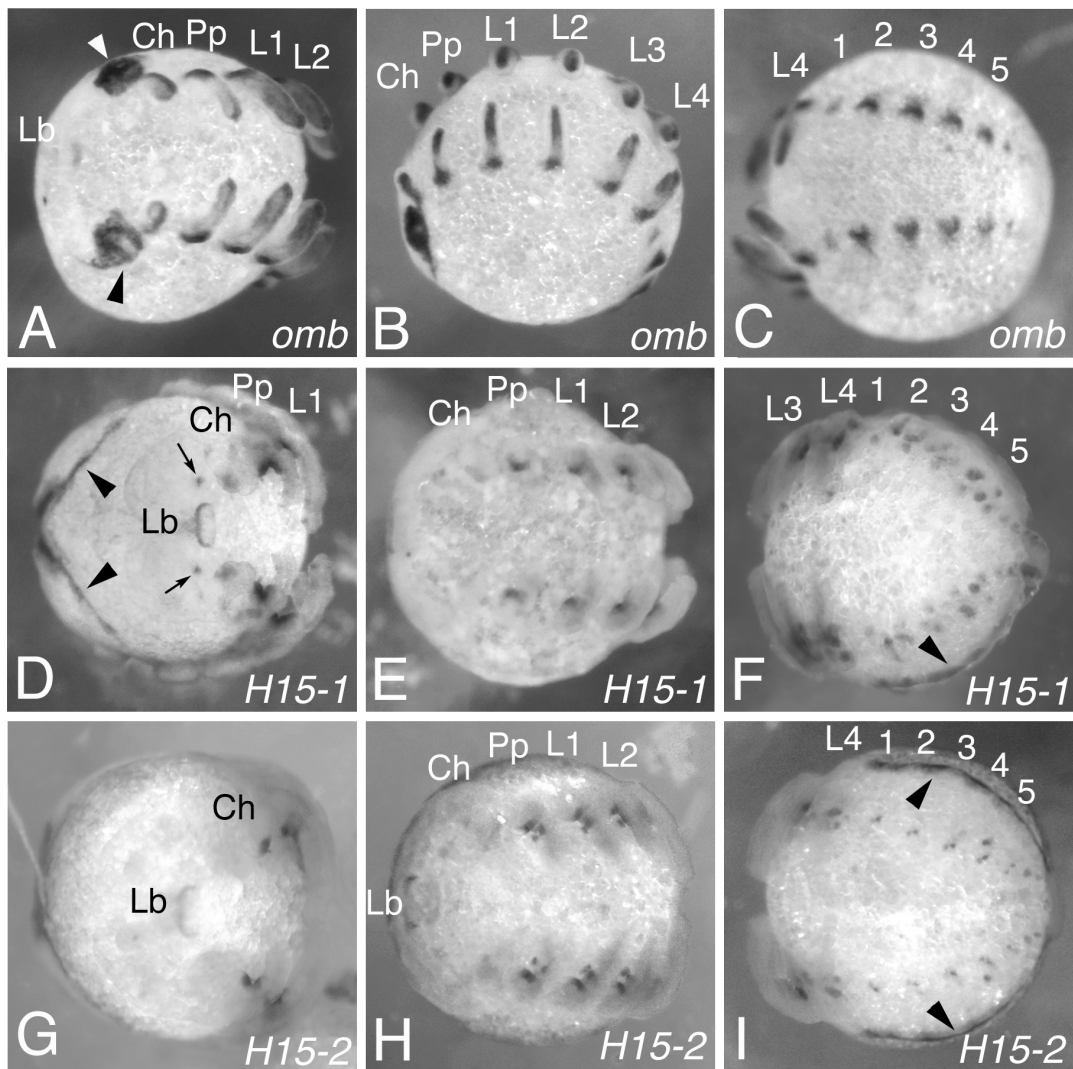


Abb. 3.10

### **Abbildung 3.11**

Expression von *Cs-omb* in den Gliedmaßen von *Cupiennius salei*. (A-C) Chelicere und (D-F) Pedipalpus bei jeweils etwa 145, 165 und 230 hnE (spaltenweise von links nach rechts). (G-J) Laufbein bei etwa 145, 150, 165 und 230 hnE (spaltenweise von links nach rechts). Die Pfeile in allen Abbildungen deuten auf den Übergang von ventralem Gewebe (ohne Expression) zu dorsalem Gewebe (mit Expression). Besonders bei etwa 150 hnE ist die Trennung zwischen dorsaler und ventraler Seite deutlich und scharf (H). Die Pfeilköpfe deuten auf eine stärkere dorsal-proximale Expressionsdomäne in Pedipalpen und Beinen. Abkürzungen: siehe Abkürzungsverzeichnis S. 2-5.

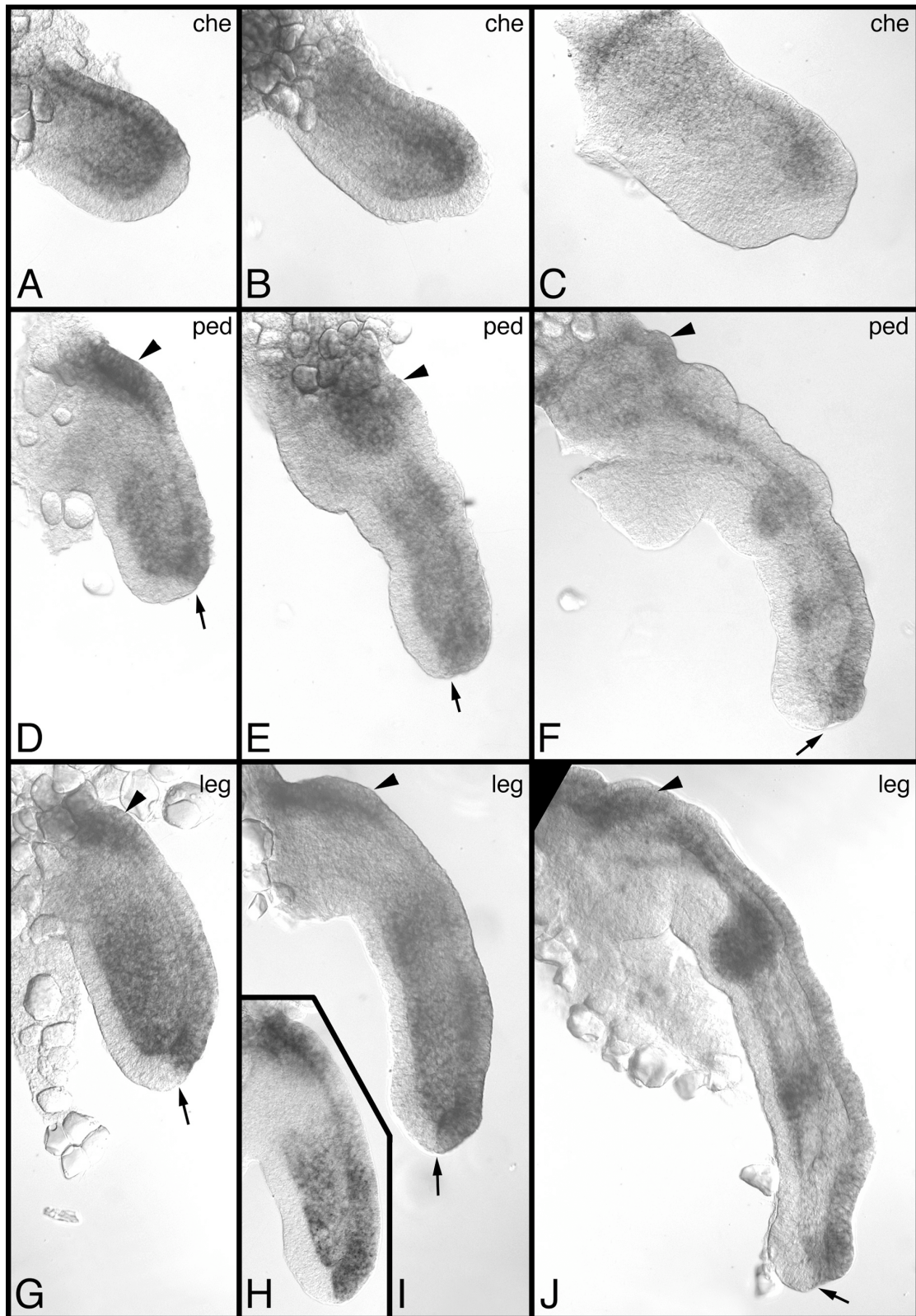


Abb. 3.11

### **Abbildung 3.12**

Expression von *Cs-H15-1* (A-C, E-F, I-L) und *Cs-H15-2* (D,H,M) in den Gliedmaßen von *Cupiennius salei*. (A-D) Chelicere und (E-H) Pedipalpus bei jeweils etwa 140, 200, 230 und 230 hnE (spaltenweise von links nach rechts). (I-M) Laufbein bei etwa 140, 150, 200, 230 und 230 hnE (spaltenweise von links nach rechts). Die Pfeile in allen Abbildungen deuten auf eine proximale Expressionsdomäne im Expressionsmuster von *Cs-H15-1*. Die Pfeilköpfe deuten auf eine distale Expressionsdomäne im Muster von *Cs-H15-1*. Abkürzungen: siehe Abkürzungsverzeichnis S. 2-5.

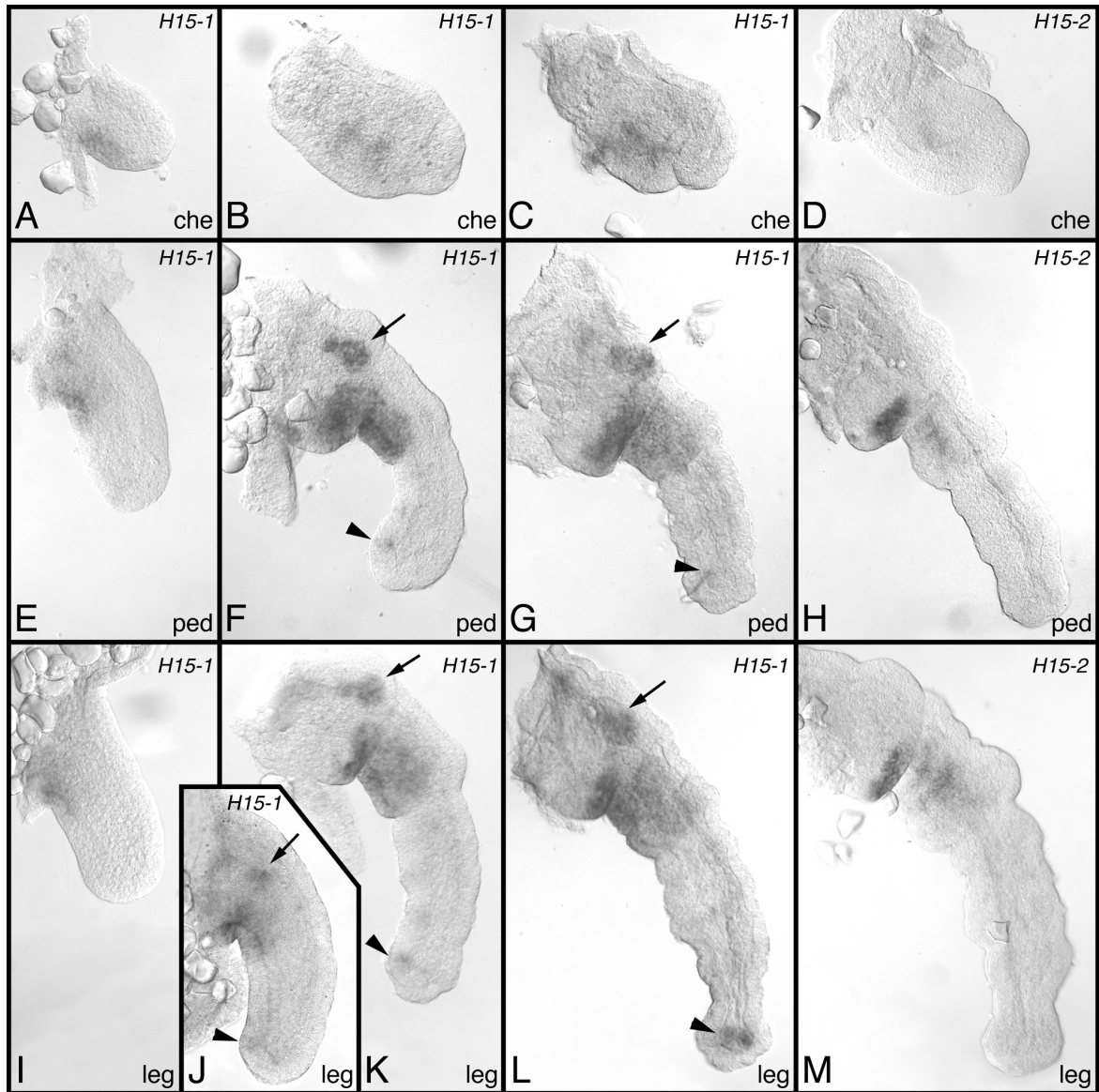


Abb. 3.12

### Abbildung 3.13

Expression von *Gm-omb* in *Glomeris* Embryos. (A) Stadium 2. (B) Spätes Stadium 3. (C) Stadium 4. (D) Stadium 5. (E) Stadium 6.1. Die Pfeile in C deuten auf die Expression von *Gm-omb* in den Seitenplatten (dorsales Gewebe). Die Pfeilköpfe in D zeigen die Expression im Neuroektoderm an. Beachte auch die starke Expression in den Augenlappen (oc) während aller Stadien. A-D sind Ventralansichten, E ist eine Lateralansicht. Abkürzungen: siehe Abkürzungsverzeichnis S. 2-5.

### Abbildung 3.14

Expression von *Gm-omb* in den Gliedmaßen. (A,E) Rumpfbeine; (B,F) Maxille; (C,G) Mandibel; (D,H) Antenne. Die Pfeile in A,E,D,H deuten auf den sehr deutlichen Übergang vom dorsalen Gewebe (mit *Gm-omb* Expression) zum expressionsfreien ventralen Gewebe. Abkürzungen: siehe Abkürzungsverzeichnis S. 2-5.



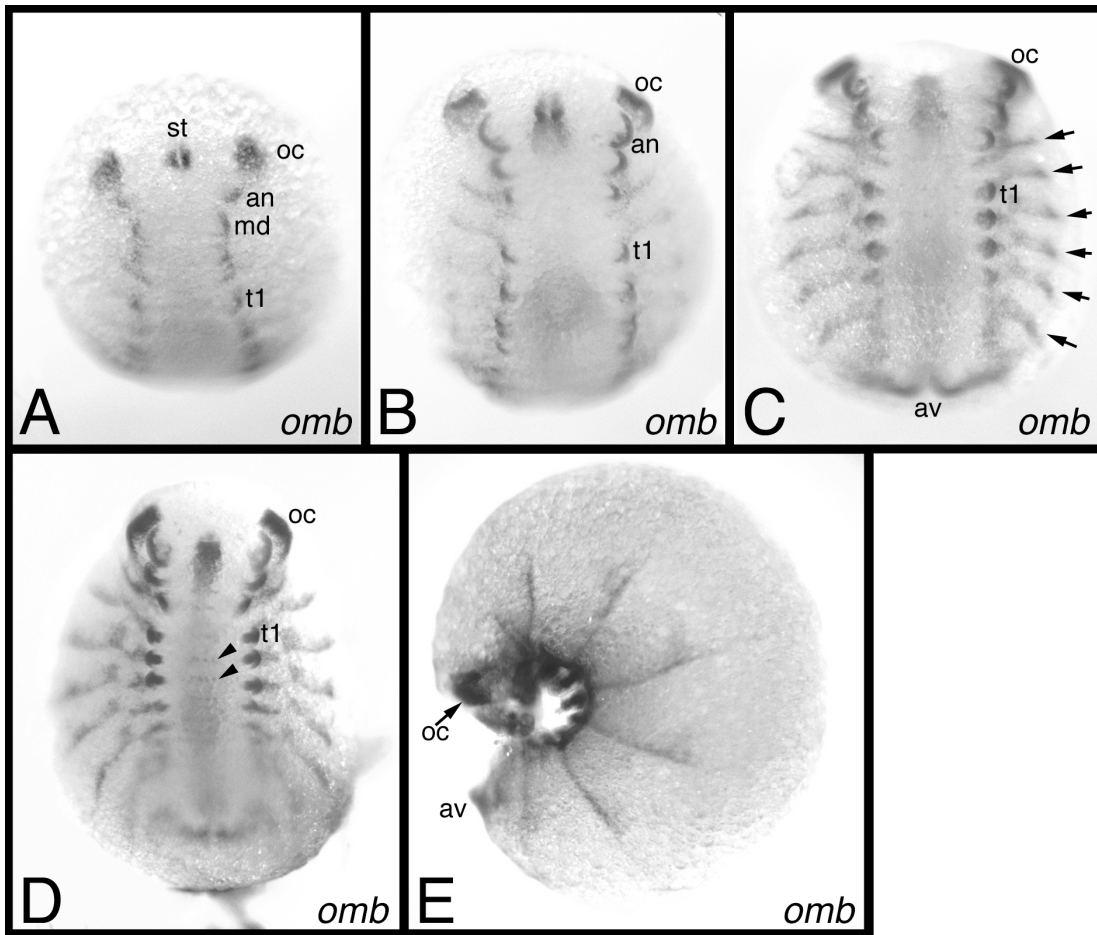


Abb. 3.13

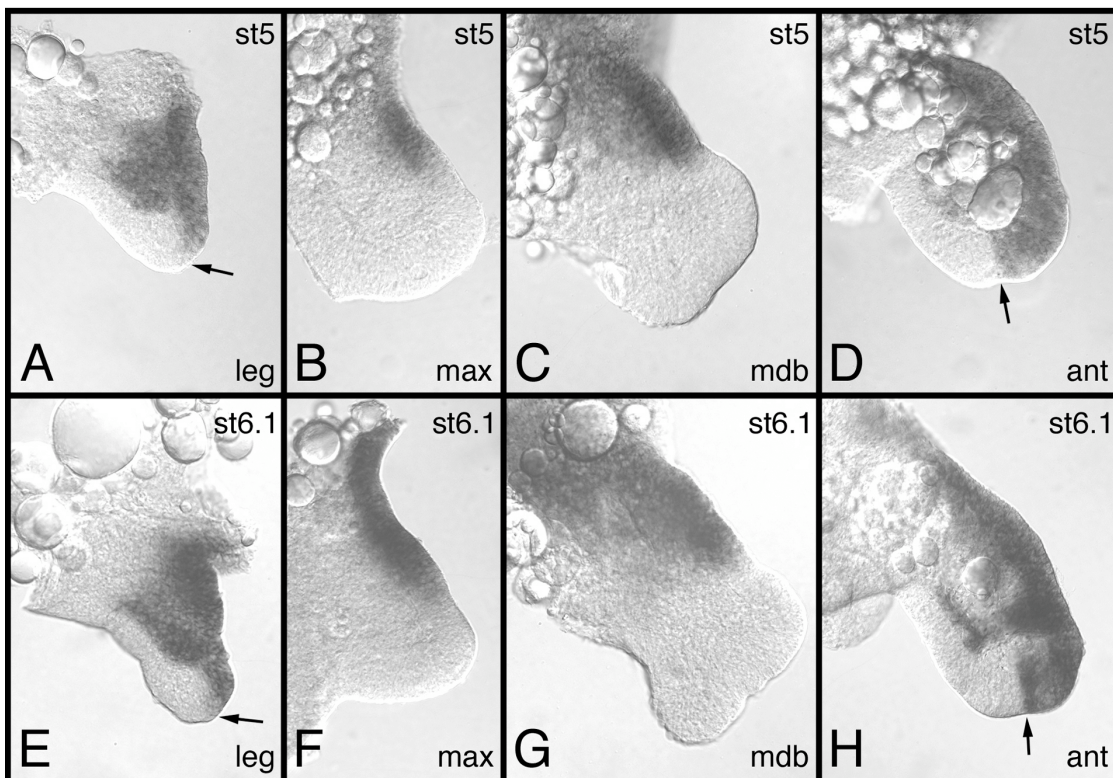


Abb. 3.14

### **Abbildung 3.15**

Expression von *Gm-H15-1* (A-D) und *Gm-H15-2* (E-G) in *Glomeris* Embryos. (A) Stadium 2. (B) Stadium 4. (C) Stadium 5. (D) Stadium 6. (E) Stadium 2. (F) Stadium 5. (G) Stadium 6.1. Die Pfeile in B,C deuten auf die Expression von *Gm-H15-1* im sich bildenden Herzen. Beachte auch die im allgemeinen sehr schwache Expression von *Gm-H15-2*. A-C, E-F sind Ventralansichten, D,G sind Lateralansichten. Abkürzungen: siehe Abkürzungsverzeichnis S. 2-5.

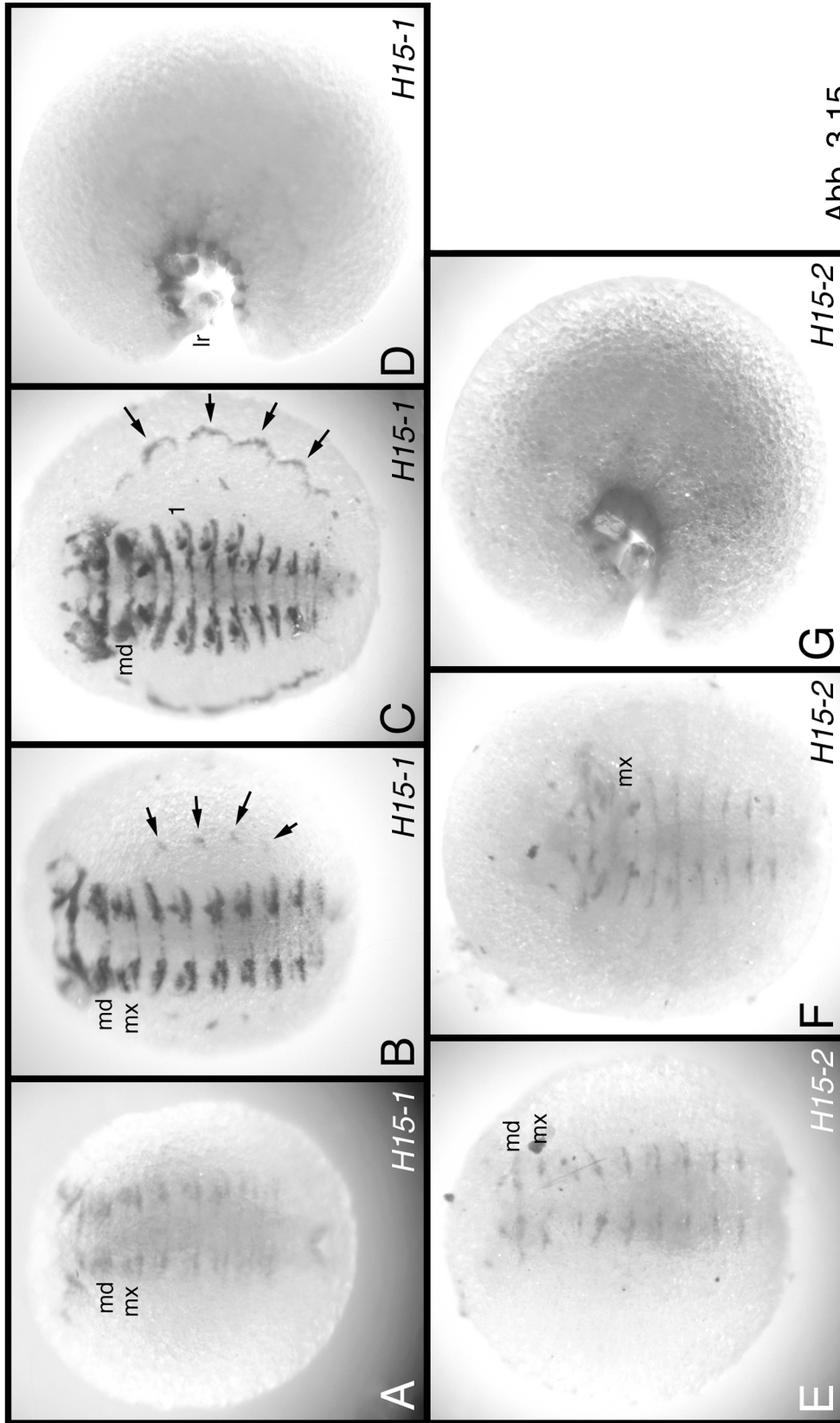


Abb. 3.15

### Abbildung 3.16

Expression von *Gm-H15-1* (A-L) und *Gm-H15-2* (M-X) in den Extremitäten von *Glomeris*. (A,E,I,M,Q,U) Rumpfbeine; (B,F,J,N,R,V) Maxillen; (C,G,K,O,S,W) Mandibeln; (D,H,L,P,T,X) Antennen. Die Pfeile in E,I,Q,U deuten auf die streifenförmige distale Domäne. Die Pfeile bzw. Pfeilköpfe in B,F,J,N,R,V deuten auf Expression in den Primordien der maxillaren Sinnespalpen bzw. der Lobi interiori der Intermaxillarplatte. Die Pfeile in H,L,P,T,X kennzeichnen die Primordien der Sinneszapfen an der Antennenspitze. Zum Nachweis, daß alle vier Zapfen die *H15*-Gene exprimieren, sind in H und T in den Einsatz-Bildern die Spitzen der Antennen abgebildet (von distal betrachtet). Die Primordien sind mit 1-4 durchnummeriert. Abkürzungen: siehe Abkürzungsverzeichnis S. 2-5.

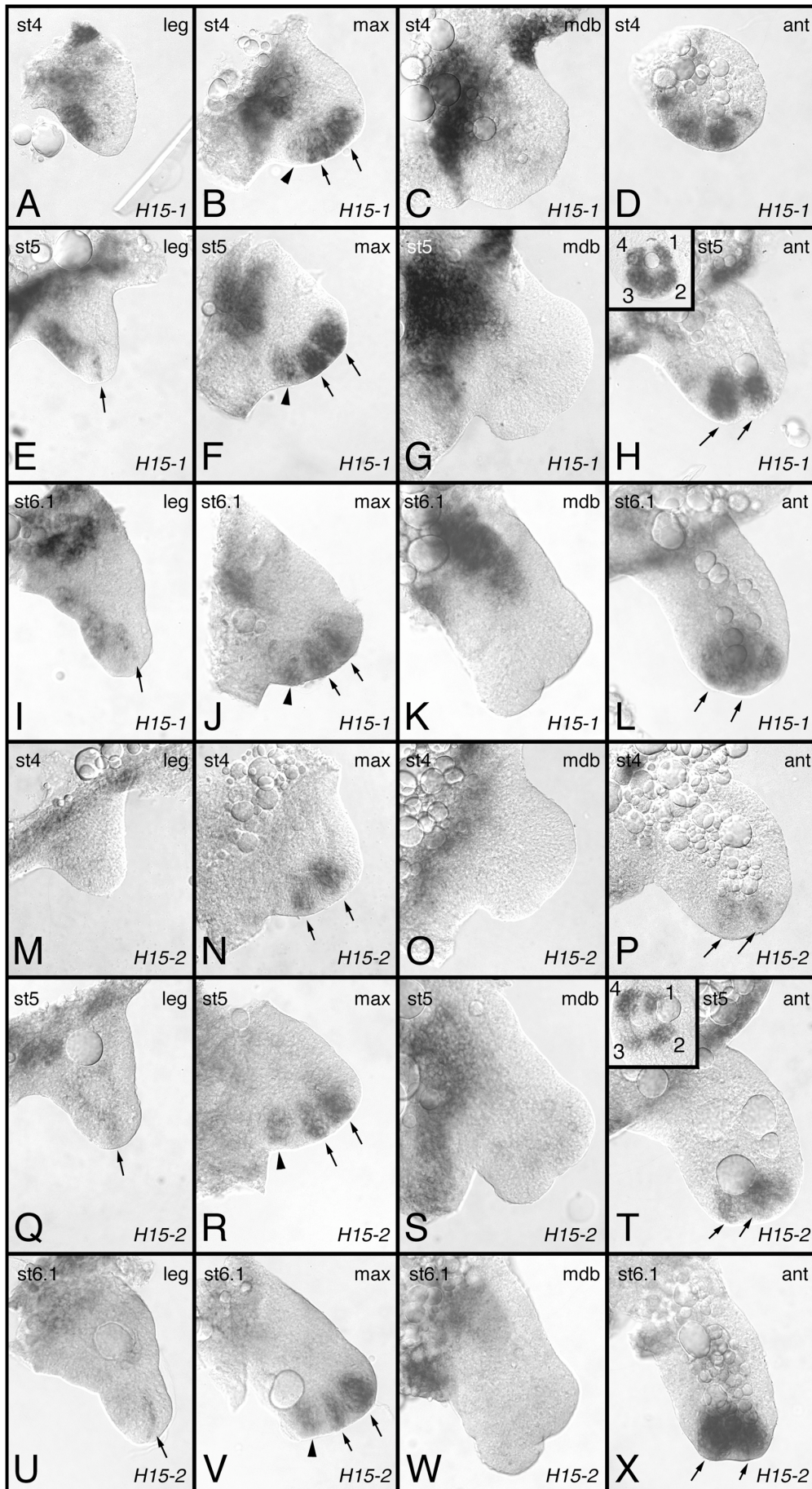


Abb. 3.16

### **Abbildung 3.17**

Expression von *CG6634* in *Drosophila*. (A,B) Expression im Herz im Stadium 14 (A) und 15 (B). (C,D) Segmentpolaritätsgen-ähnliches Streifenmuster im Stadium 5 (C) und 11 (D). (E,F) Expression im ventralen Nervensystem (E; Stadium 12) und im Gehirn (F; Stadium 15). (G) Expression in der Beinimaginalscheibe im dritten Larvenstadium. Das Gen ist in einer breiten, ventralen Domäne exprimiert. Im proximalen Teil ist die Expression auf zwei Flecken beschränkt (Sternchen).

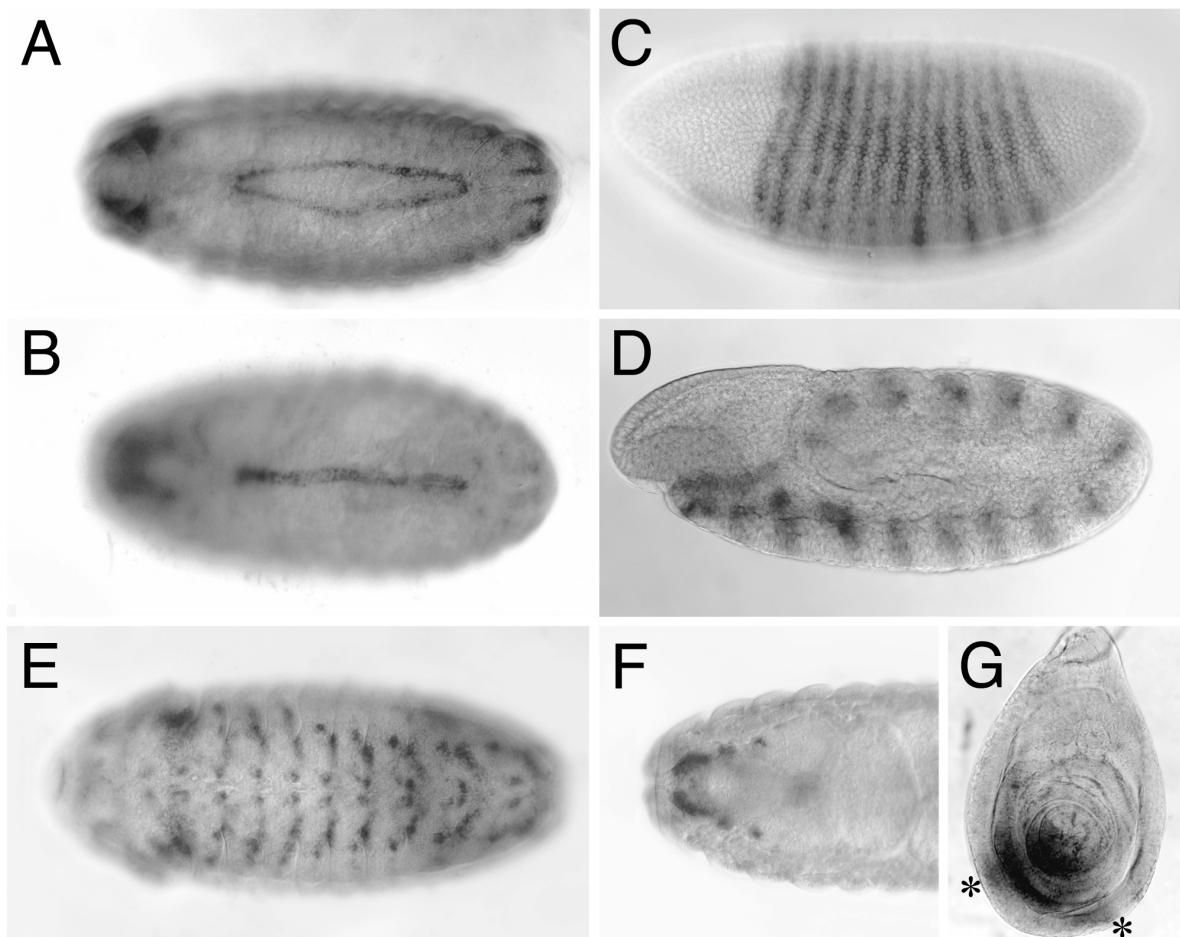


Abb. 3.17

### **Abbildung 3.18**

Expression von *Ta-H15-1* (A,B) und *Ta-H15-3* (C,D) in *Tegenaria* Embryos. (A,C) Kopf und Prosoma (B,D) Opisthosoma. Der Pfeil in B deutet auf die Expression im Herz. Beachte, daß *Ta-H15-3* nicht im Opisthosoma exprimiert ist (D). Abkürzungen: siehe Abkürzungsverzeichnis S. 2-5.

### **Abbildung 3.19**

Expression von *Ta-H15-1* (A-C) und *Ta-H15-3* (D-F) in den Gliedmaßen (etwa bei Beginn der Umrollung). (A,D) Chelicere; (B,E) Pedipalpus; (C,F) Laufbein. Die Pfeile in B,C deuten auf eine zusätzliche proximale Expressionsdomäne. Der Pfeilkopf in C zeigt auf eine kleine distale Expressionsdomäne. Abkürzungen: siehe Abkürzungsverzeichnis S. 2-5.



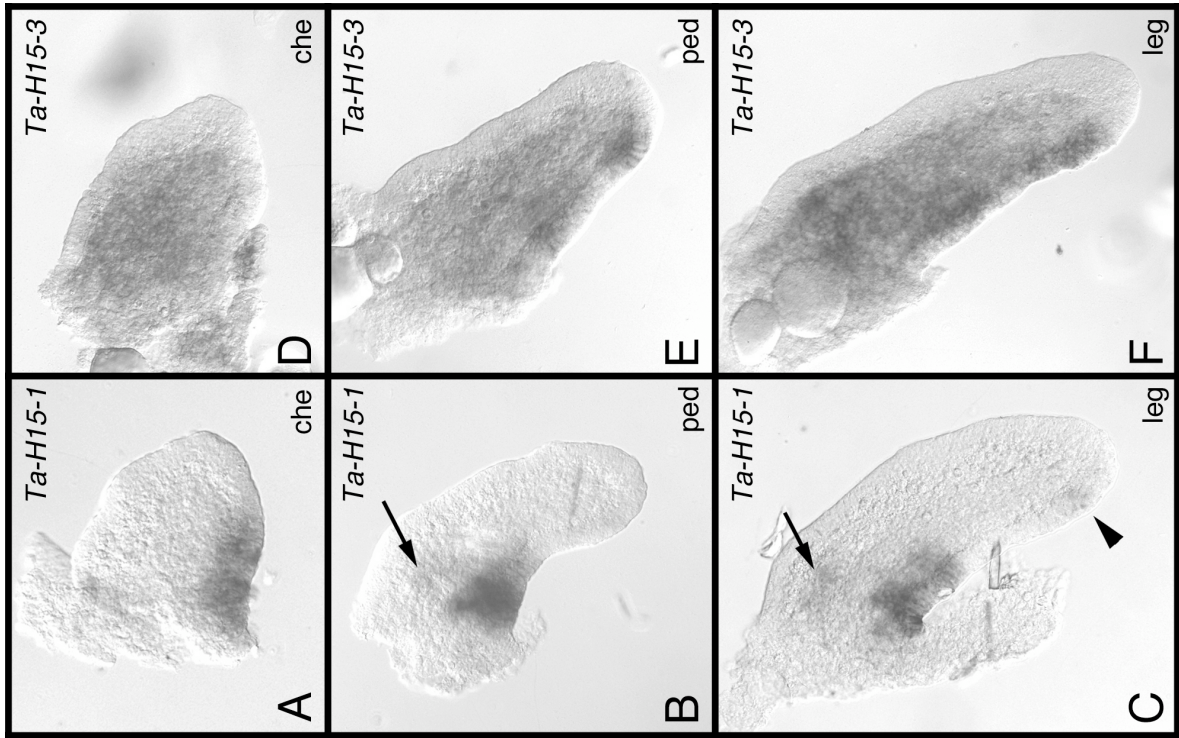


Abb. 3.19

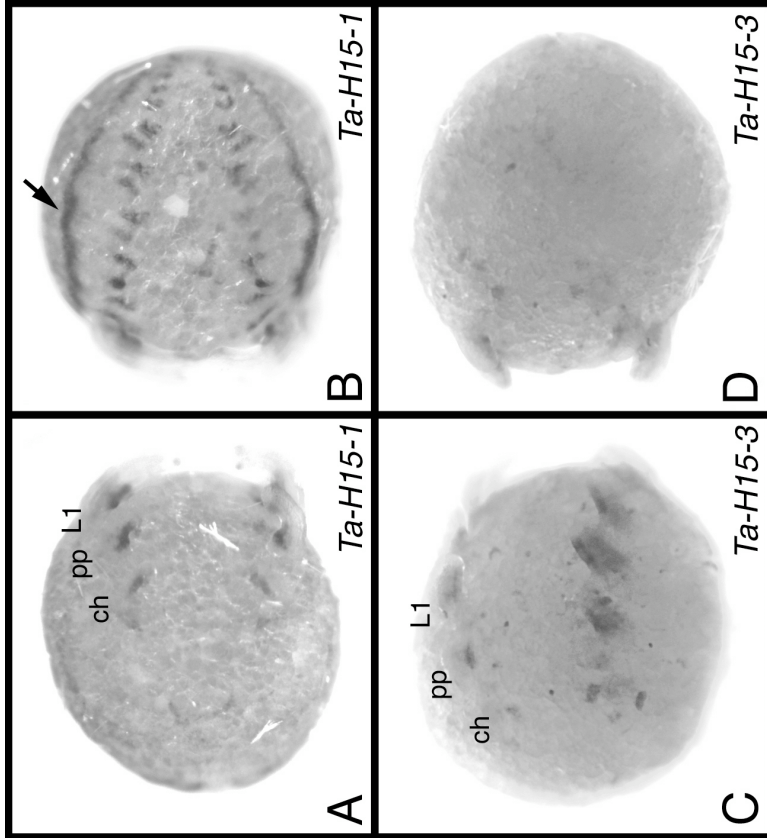


Abb. 3.18

### 3.1.3 Die Bein-Gap-Gene

#### 3.1.3.1 *Distal-less* und *dachshund*

Die Gene *Dll* und *dac* stehen in *Drosophila* unter der direkten Kontrolle des von *dpp* und *wg* generierten Aktivitätsgradienten (z.B. Lecuit und Cohen, 1997). Das *Dll* Gen gehört zur großen Überfamilie der Homöoboxgene. Diese Gene treten meist in Ansammlungen untereinander nahverwandter Gene (sog. Cluster) auf. Das bekannteste Beispiel ist hier wohl der Homöotische Cluster (Hom-C), der die Hox-Gene enthält. Ein weiterer Cluster ist der 93D/E-Cluster, zu dem in *Drosophila* eine ganze Reihe von Genen gehört, unter ihnen *Dll*. Die meisten der 93D/E-Clustergene sind im Verlauf der Evolution aus dem Cluster ausgelagert worden und so liegt auch *Dll* nicht in der Nähe des 93D/E-Clusters im engeren Sinn (zur Übersicht siehe Holland (2001)). Fragmente mit großer Ähnlichkeit zu *Dll* sind aus *Cupiennius* und *Glomeris* isoliert worden. Die Orthologie dieser Fragmente zu *Dll* aus *Drosophila* wurde in einer phylogenetischen Analyse untersucht. Einbezogen wurden alle Gene im Genom *Drosophilas* die dem 93D/E-Cluster zugerechnet werden können und zusätzlich *Dll* Gene aus anderen Arthropoden. Die Auflösung der phylogenetischen Beziehungen ist gering und meist nicht statistisch signifikant unterstützt (Abb. 3.20). Die *Dll* Gene bilden jedoch eine sehr gut unterstützte Gruppe (reliability value = 93).

Das Gen *dac* enthält als konservierte Bereiche zwei DD-Boxen und eine Ski/Sno-Box (Davis et al., 1999). Gene mit ähnlicher Struktur sind auch aus verschiedenen Vertebraten, dem Lanzettfischchen, dem Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* und diversen Arthropoden bekannt (z.B. Hammond et al., 1998; Caubit et al., 1999; Davis et al., 1999; Kozmik et al., 1999; Hammond et al., 2002; Loosli et al., 2002; Candiani et al., 2003; Inoue et al., 2002; Abzhanov und Kaufman, 2000). Die phylogenetische Analyse dieser Gene zeigt, daß die *dac* Gene aus den verschiedenen Arthropoden eine signifikant unterstützte Gruppe bilden (reliability value = 63; Abb 3.21), klar getrennt von den DACH Genen aus verschiedenen Deuterostomiern und den Ski/Sno-Genen.

### *Expression von Distal-less in Cupiennius salei*

Die Expression von *Distal-less* in *Cupiennius salei* ist bereits von Michael Schoppmeier und Wim Damen an whole-mount Präparaten untersucht worden (Schoppmeier und Damen, 2001). Eine genauere Analyse der Expression in den prosomalen Gliedmaßen ist ebenfalls durchgeführt worden (Prpic, 2000). Hier soll die Expression deshalb nur zusammenfassend dargestellt und dokumentiert werden. In frühen Stadien wird *Cs-Dll* in der gesamten Extremitätenknospe exprimiert (Abb. 3.22E). Später ist die Expression jedoch auf die distalen Bereiche der Gliedmaßen beschränkt (Abb. 3.22F-H; 3.23E,F). In der Chelicere tritt die Beschränkung auf distale Teile besonders spät ein: noch in Embryos im Alter von etwa 150 hnE exprimieren die meisten Zellen in der Epidermis *Cs-Dll* (Abb. 3.23A). Erst danach ist *Cs-Dll* ganz deutlich nur im distalen Drittel der Chelicere exprimiert (Abb. 3.23B). In den Laufbeinen entspricht die Expressionsdomäne den distalen Podomeren Femur, Patella, Tibia, Metatarsus und Tarsus (Abb. 3.22H; 3.23F). Die Expression im Pedipalpus (Abb. 3.23C,D) ist derjenigen in den Laufbeinen sehr ähnlich und entspricht den Podomeren Femur, Patella, Tibia und Tarsus (der Metatarsus fehlt im Pedipalpus). Zusätzlich zeigt sich aber etwa ab 200 hnE eine weitere Domäne starker Expression im Gnathendit des Pedipalpus (Abb. 3.23D, Pfeil).

Abgesehen von der soeben beschriebenen Expression ist *Cs-Dll* auch in den Kopflappen, im Labrum, in den Spinnwarzen und im Telson exprimiert (siehe Schoppmeier und Damen, 2001).

### *Die Expression von dachshund in Cupiennius salei*

Die Expression von *Cs-dac* in den Extremitäten beginnt später als die von *Cs-Dll*. Das Gen wird nicht in den ganz jungen Beinknospen exprimiert (nicht gezeigt), sondern erscheint erstmals wenn die Knospen schon deutlich gewachsen sind (Abb. 3.22D). *Cs-dac* ist in einer ungeteilten Domäne in einer medialen Position auf der PD-Achse der Laufbeine exprimiert, die dem späteren Trochanter und Femur entspricht (Abb. 3.22K-M; 3.24E,F). Diese Daten bestätigen die Ergebnisse die in einer anderen Spinnenart, *Steatoda triangulosa*, erzielt worden sind (Abzhanov und Kaufman, 2000).

In *Cupiennius*-Embryos während der Inversion konnten in der Coxa zwei zusätzliche dorsale Expressionspunkte beobachtet werden (Abb. 3.22L, Pfeil). Diese

punktförmige Expression löst sich in Embryos gegen Ende der Inversion in eine schwache, diffuse Expression auf (Abb. 3.22M; 3.24F). Diese relativ spät erscheinende Domäne scheint von der viel stärkeren medialen Expressionsdomäne unabhängig zu sein und hat somit wohl nichts mit der PD Achsenbildung zu tun. Vielmehr steht die coxale Expression wahrscheinlich mit der Bildung von coxalen Sinnesorganen in Verbindung, da *dac* Homologa in anderen Arthropodenarten nachweislich im zentralen und peripheren Nervensystem exprimiert werden (Mardon et al., 1994; Prpic et al., 2001; diese Arbeit). Dafür spricht auch die Beobachtung, daß in sehr späten Entwicklungsstadien eine kleine Gruppe von Zellen im Tarsus *Cs-dac* exprimiert (Abb. 3.22M; 3.24F). Diese Zellen gehören ganz offensichtlich zum PNS und innervieren möglicherweise die Vorläufer tarsaler Sinnesorgane.

Die Expression von *Cs-dac* in den sich entwickelnden Pedipalpen ist mit der in den Laufbeinen nahezu identisch (Abb. 3.24C,D). Starke Expression ist in einer medialen Domäne zu beobachten und auch die später einsetzende proximale Expression ist vorhanden. Lediglich die wenigen tarsalen Zellen, die in den Laufbeinen vorübergehend *Cs-dac* exprimieren, haben in den Pedipalpen offenbar kein serielles Homologon, da im Tarsus keine *Cs-dac* positiven Zellen zu finden waren. Im Gegensatz dazu exprimieren die Cheliceren *Cs-dac* nicht in einer medialen Domäne. Während eines Großteils der Entwicklung ist in der Chelicere überhaupt keine *Cs-dac* Expression nachweisbar (Abb. 3.24A). Nur in sehr späten Stadien nach erfolgter Inversion zeigte sich eine diffuse und schwache Expression (3.24B). Diese befindet sich im Innern der Extremität, nicht in der äußeren Epidermis und kann nicht mit medialen Positionen auf der PD Achse der Chelicere in Verbindung gebracht werden. Das späte Erscheinen dieser Domäne, sowie ihre diffuse und schwache Beschaffenheit und ihre Lage am proximalen Ende der Chelicere unterhalb der äußeren Epidermis, legen den Schluß nahe, daß diese chelicerale Expression nicht mit der medialen Domäne in Beinen und Pedipalpen vergleichbar ist. Vielmehr besteht wohl eine serielle Homologie zwischen der Expression in der Chelicere und der proximalen Expressionsdomäne in den Beinen und Pedipalpen.

Um die relative Lage der *Cs-dac* Expression entlang der PD Achse zu ermitteln, wurden Doppelfärbungen mit *Cs-Dll* durchgeführt. Diese Versuche zeigten, daß die mediale *Cs-dac* Domäne in den Laufbeinen zunächst vollständig innerhalb der *Cs-Dll* Domäne liegt und mit dieser eine gemeinsame proximale Grenze hat (Abb. 3.22I). Erst in späteren Stadien verschieben sich die Expressionsdomänen der beiden Gene relativ

zueinander, so daß sie schließlich nur im Bereich des späteren Femur überlappen (Abb. 3.22J). Die Pedipalpen zeigen das gleiche Expressionsprofil (nicht gezeigt).

Außer in den prosomalen Extremitäten ist *Cs-dac* Expression auch im Labrum und in den opisthosomalen Extremitätenknospen nachzuweisen (Abb. 3.22A-C). Schließlich ist *Cs-dac* auch im sich entwickelnden Bauchmark und Herzen exprimiert und zeigt ein komplexes Expressionsmuster in den Kopflappen (Abb. 3.22A-C). Letzteres steht wahrscheinlich mit der Bildung von Seh- und Assoziationszentren im Gehirn in Verbindung, da *dac* in *Drosophila* eine zentrale Rolle bei der Entwicklung der Augen und Pilzkörper spielt (Mardon et al., 1994; Shen und Mardon, 1997; Kurusu et al., 2000; Martini et al., 2000; Noveen et al., 2000).

### *Expression von Distal-less in Glomeris marginata*

Transkripte von *Gm-Dll* sind in allen Kopf- und Rumpfsegmenten nachweisbar. Im Stadium 1 findet sich mRNA Expression in segmental wiederholten kreisförmigen Flecken im Antennal-, Prämandibular-, Mandibular- und Maxillarsegment und in den ersten drei Rumpfsegmenten (Abb. 3.25A,B). Mit Ausnahme des Prämandibularsegments, welches keine Extremitäten entwickelt, markieren diese segmentalen Expressionsdomänen die Orte an denen sich in älteren Stadien die Gliedmaßen entwickeln werden. Daher wird diese Expression im Weiteren als prämorphogenetische Expression bezeichnet. In diesem Stadium ist im Postmaxillarsegment noch kein Expressions-Signal nachzuweisen. Im Stadium 2 jedoch ist dann auch in diesem Segment eine Expression zu sehen und zwar in einer Position, die offensichtlich seriell homolog zu den übrigen segmentalen Flecken ist (Abb. 3.25C). Zu diesem Zeitpunkt ist das Signal im Prämandibularsegment wieder verschwunden (Abb. 3.25D) und im vierten Rumpfsegment deutet sich ein weiteres Fleckenpaar an. In diesem Stadium greift die Expression in den Rumpfsegmenten 1 bis 3 in Ausläufern nach dorsal über. Das ändert sich jedoch sobald im Stadium 3 die Extremitätenknospen dieser Segmente erscheinen. Jetzt beschränkt sich die Expression auf die sich bildenden Knospen, ohne dorsale Ausläufer (Abb. 3.25E). Die Expression im Postmaxillarsegment ist in der Zwischenzeit ebenfalls wieder verschwunden. Gleichzeitig mit dem Erscheinen der Extremitätenknospen im Mandibular- und Maxillarsegment verringert sich die Expressionsstärke von *Gm-Dll* in diesen Segmenten.

Im Stadium 4 ist die homogene mRNA Expression in den Mandibel- und Maxillenknospen durch ein komplexeres Muster ersetzt worden, welches während der folgenden Stadien 5 und 6 noch weiter an Komplexität zunehmen wird (siehe unten). Im Rumpf markiert die Expression von *Gm-Dll* sich entwickelnde Gliedmaßen oder, in jüngeren Segmenten, deren Entstehungsorte (Abb. 3.25F,G). Wie gut zu erkennen ist, ist die Entwicklung der ersten drei Rumpfbeine synchron und läuft derjenigen der übrigen Rumpfbeine weit voraus, die sich in einer regelmäßigen zeitlichen Abfolge entwickeln. Das ist besonders offensichtlich im Stadium 6, in dem die ersten drei Rumpfbeine bereits ein gutes Stück gewachsen sind, während sich die anderen Beine noch im Knospenstadium befinden: die ältesten im Rumpfsegment 4, die jüngsten im Rumpfsegment 8 (Abb. 3.25H,I).

Zusätzlich zur eben beschriebenen segmentalen Expression, konnte *Gm-Dll* mRNA auch in weiteren Strukturen nachgewiesen werden. Über die gesamte Embryonalentwicklung hinweg zeigt sich Expression im Labrum und in den Analklappen. Im Zentralnervensystem ist die Expression auf das Gehirn beschränkt (Abb. 3.25D-I). Im Stadium 1 wird der gesamte vordere Teil des Keimstreifs von einer diffusen Färbung ausgefüllt (Abb. 3.25A), ähnlich zu Berichten aus der Entwicklung von *Drosophila* (Kumar und Moses, 2001). Im Stadium 2 hat sich diese anteriore Färbung auf einige Flecken in den Kopflappen reduziert (Abb. 3.25D). Diese Flecken bleiben auch während der Stadien 3 und 4 erhalten (Abb. 3.25E,F). Das Fleckenmuster wird im Stadium 5 deutlich komplexer (Abb. 3.25G), löst sich aber im Stadium 6 wieder in eine recht diffuse Färbung auf (Abb. 3.25H,I). Die Lage dieser Flecken deckt sich gut mit der erwarteten Lage der Lobi optici ("Augenlappen") und der Corpora pedunculata ("Pilzkörper").

Das Expressionsmuster von *Gm-Dll* ist dynamisch und ändert sich in den einzelnen Entwicklungsstadien. Das ist besonders in den Mundwerkzeugen zu beobachten. Im Maxillarsegment schwächt sich die prämorphogenetische Expression ab, sobald die Knospen der Maxillen erscheinen (Stadium 3; Abb. 3.25E) und wird im Stadium 4 durch die Expression in den Anlagen der zwei sensorischen Maxillar-Taster ersetzt (Abb. 3.25F; 3.26D). In der Folge bewegen sich die Maxillen auf die ventrale Mittellinie zu. Das führt dazu, daß die Maxillen im Stadium 5 sehr dicht beieinander liegen. Eine Expression von *Gm-Dll* ist nun auch in der Anlage des Lobus interior zu sehen (Abb. 3.26E). Im Stadium 6 haben die Maxillen damit begonnen, miteinander zu verwachsen, um so das Gnathochilarium (Unterlippe) zu bilden und müssen für die Präparation auseinandergerissen werden. Der seitliche (äußere) Teil jeder Hälfte der Gnathochilarium-

Anlage wird zu Cardo und Stipes. Die Anlagen der zwei Palpen des Stipes exprimieren immer noch *Gm-Dll* (Abb. 3.26F). Der mittlere (innere) Teil jeder Hälfte der Gnathochilarium-Anlage trägt zur Bildung der Intermaxillarplatte bei. In der sich entwickelnden Intermaxillarplatte exprimieren die Anlagen der Lobi interiori ebenfalls *Gm-Dll* (Abb. 3.26F).

Zeitgleich mit dem Erscheinen der Mandibelknospen im Stadium 3 nimmt die zuvor noch starke prämorphogenetische Expression im Mandibularsegment rasch ab und wird im Stadium 4 schließlich durch Expression in drei kleinen Zellgruppen ersetzt (Abb. 3.26G). Die inneren zwei Zellgruppen befinden sich im Internlappen, während die seitliche Zellgruppe im Externlappen liegt. Im Stadium 5 verstärkt sich die Expression im Externlappen und im Internlappen exprimieren nun drei Zellgruppen *Gm-Dll* (Abb. 3.26H). Im Stadium 6 ist die Expression schwächer und diffus. Etwas stärkere Expression zeigt sich in zwei undeutlichen Streifen, einer davon im Externlappen, der andere im Internlappen (Abb. 3.26I).

In der Antenne und in den Rumpfbeinen 1-3 findet sich *Gm-Dll* Expression im distalen Teil der Extremitäten. Die Expression in der Antenne ist überaus stark, schwächt sich aber im Stadium 6 ab (Abb. 3.26J,K). Die Expression in den Rumpfbeinen ist ebenfalls stark, wird aber im Stadium 6 leicht ungleichmäßig (Abb. 3.26A,B). In Embryos kurz vor Abscheidung der Embryonalkutikula (sehr spätes Stadium 6, die obere Altersgrenze für Embryos die für in-situ Hybridisierung zugänglich sind) hat die Expression von *Gm-Dll* in terminalen und medialen Zellen abgenommen, ist jedoch in supraproximalen und subterminalen Zellen weiterhin stark (Abb. 3.26C).

### *Die Expression von dachshund in Glomeris marginata*

Eine Expression von *Gm-dac* ist in mehreren Organanlagen nachweisbar. Die ausgedehnteste Expression findet sich im Zentralnervensystem (ZNS) und ist dort überdies auch sehr dynamisch. Die früheste Expression im ZNS zeigt sich im Gehirn (Stadium 2) als Fleck, der grob den sich entwickelnden Sehzentren entspricht (Abb. 3.27A). Die Expression im Gehirn gewinnt schnell an Komplexität und in älteren Stadien exprimieren viele Zellen des Proto- und Deutocerebrums das Gen *Gm-dac* (Abb. 3.27H). Im Bauchmark beginnt die Expression im frühen Stadium 3 im Mandibular- und Prämandibularsegment (Abb. 3.27C,D), wird aber schon kurz danach in den übrigen

Kopfsegmenten und den ersten drei Rumpfsegmenten angeschaltet, mit Ausnahme jedoch des Postmaxillarsegments (Abb. 3.27E). Hier ist der Beginn der *Gm-dac* Expression verzögert und erscheint erst im Stadium 4. Während der Reifung durchläuft jedes Rumpfsegment die räumlich und zeitlich gleiche (stereotype) Abfolge von *Gm-dac* Aktivierung in einer stetig wachsenden Zahl neuroektodermaler Zellen, die sehr an die Bildung der Neuroblasten in *Drosophila* in mehreren diskreten Wellen erinnert (Goodman und Doe, 1993). Allerdings scheinen diese neuroektodermalen Zellen in *Glomeris* nicht direkt mit echten Neuroblasten vergleichbar zu sein (Dove und Stollewerk, 2003).

Starke Expression findet sich auch in den Analklappen und, in älteren Stadien, von dort ausgehend entlang der seitlichen Ränder der Wachstumszone (Abb. 3.27A,C,E,G,I). Diese Expression steht möglicherweise mit der Bildung des Proktodäums und anderer Teile des hinteren Teils des Verdauungsystems in Zusammenhang. Schwächere Expression zeigt sich seitlich im Postmaxillarsegment und allen Rumpfsegmenten, sobald sie sich von der Wachstumszone abgelöst haben (Abb. 3.27C,E). Im Stadium 6 ist diese laterale Expression jedoch auf das sich bildende Herz beschränkt (Abb. 3.27J). Schließlich ist auch im Labrum Expression nachweisbar, mit zunehmender Stärke von Stadium 3 bis 6 (Abb. 3.27D-I).

Ähnlich wie *Gm-Dll* so ist auch bei *Gm-dac* eine prämorphogenetische Expression nachweisbar, welche die Bildungsorte der Gliedmaßen vorzeichnet. Das trifft allerdings nur auf das Antennal-, Mandibular- und Maxillarsegment zu (Abb. 3.27A,B). Ein prämorphogenetisches Signal zeigt sich nicht in anhangslosen Kopfsegmenten oder in den Rumpfsegmenten. In den Beinen der Rumpfsegmente 1-3 wird *Gm-dac* zum ersten Mal im Stadium 3 exprimiert, wenn die Beinknospen erscheinen. In diesem Stadium umgibt die Expression die Beinknospe ringförmig etwas oberhalb der Gliedmaßenbasis. Im Stadium 4 ist *Gm-dac* deutlich auf mediale Bereiche der PD-Achse der Beine beschränkt (Abb. 3.27E,F). Im Stadium 5 beginnt die Expression allerdings auf proximale Bereiche überzugreifen (Abb. 3.28A) und im Stadium 6 ist *Gm-dac* auch proximal in den Beinen exprimiert, wenn auch deutlich schwächer als im medialen Bereich (Abb. 3.28E). Zusätzlich dazu wird das Gen *Gm-dac* im Stadium 6 in einer kleinen Zellgruppe ventraler PNS Zellen nahe der Beinspitze exprimiert.

In der Antenne ist *Gm-dac* ebenfalls ringförmig im medialen Bereich der PD-Achse exprimiert. Zunächst ist dieser Expressionsring schmal (Stadium 3), erweitert sich aber bald (Stadium 4) und teilt sich schließlich in zwei unvollständig getrennte Ringe auf (Stadium 5 und 6; Abb. 3.28D,H). Im Gegensatz zu den Rumpfbeinen bleiben die



proximalen Bereiche der Antenne stets frei von *Gm-dac* Expression. Ähnlich wie in den Rumpfbeinen ist *Gm-dac* auch in der Antenne im PNS exprimiert. Mit Beginn des Stadiums 3 findet sich starke Expression in den Anlagen der vier Sinneszapfen an der Spitze der Antennen (Abb. 3.28D,H).

Im Gegensatz zu den Rumpfbeinen und den Antennen ist *Gm-dac* in den Mundgliedmaßen niemals in einer Art und Weise exprimiert, die eine Rolle bei der Festlegung der medialen Anteile der PD-Achse nahelegen würde. Im Stadium 3 zeigt sich starke Expression in den Knospen der Mandibeln und Maxillen (Abb. 3.27C). Diese homogene Expression wird im Stadium 4 in beiden Gliedmaßen durch ein komplexeres Muster ersetzt. In der Maxille ist eine starke aber diffuse Expression von *Gm-dac* in der Anlage des Stipes nachzuweisen und eine separate Expressionsdomäne zeigt sich im Gewebe, das zur Bildung der Intermaxillarplatte beitragen wird (nicht gezeigt). Im Stadium 5 erscheint die Expression im Stipes zweigeteilt (Abb. 3.28B) und im Stadium 6 löst sich das gesamte Expressionsmuster in mehrere kleine Zellgruppen auf, die innerhalb der Primordien sowohl der Sinnes-Palpen des Stipes, als auch der Lobi interiori der Intermaxillarplatte liegen (Abb. 3.28F). In den Mandibeln zeigen im Stadium 4 und 5 die Externlappen sehr starke Expression, während im Internlappen mehrere kleine Gruppen von Zellen *Gm-dac* exprimieren (Abb. 3.28C). Die starke Expression im Externlappen bleibt in der Folge erhalten, wohingegen die Expression im Internlappen zunehmend diffus wird (Abb. 3.28G).

### **Abbildung 3.20**

Phylogenetische Analyse von Homöodomänen-Proteinen aus *Drosophila melanogaster* die Verwandtschaft zum 93D/E Cluster haben. Einbezogen sind auch *Dll*-Proteine aus verschiedenen Arthropodenarten. Dargestellt ist das ungewurzelte majority-rule Konsensusphylogramm, das aus 1000 Zwischenbäumen errechnet wurde, die mit der Quartet Puzzling Methode nach Strimmer und von Haeseler (1996) erzeugt wurden. Die Zahlen an den Kanten geben die sog. reliability values an. Abkürzungen: siehe Abkürzungsverzeichnis S. 2-5.

### **Abbildung 3.21**

Phylogenetische Analyse der *Ski/Sno*- und *dac*-Proteine aus verschiedenen Metazoa. Dargestellt ist das ungewurzelte majority-rule Konsensusphylogramm, das aus 1000 Zwischenbäumen errechnet wurde, die mit der Quartet Puzzling Methode nach Strimmer und von Haeseler (1996) erzeugt wurden. Die Zahlen an den Kanten geben die sog. reliability values an. Abkürzungen: siehe Abkürzungsverzeichnis S. 2-5.

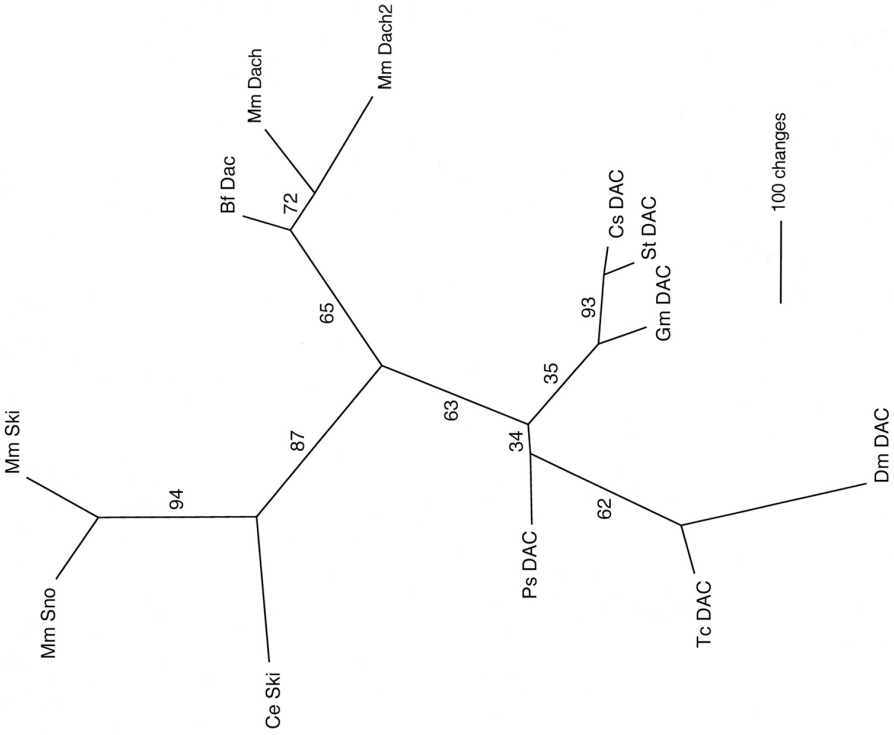


Abb. 3.21

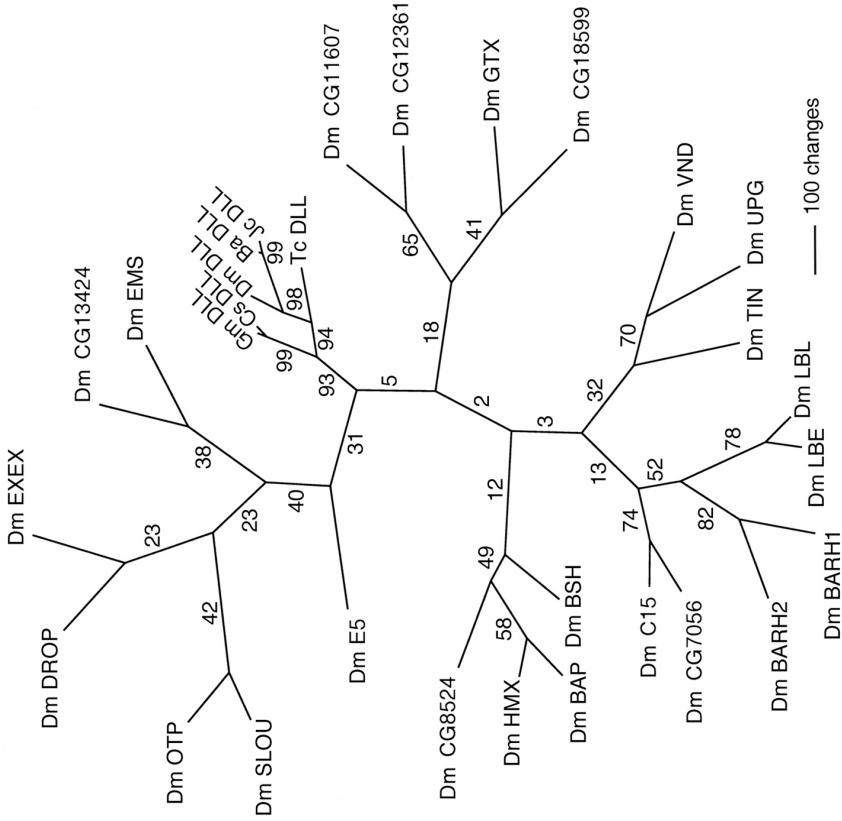


Abb. 3.20

### Abbildung 3.22

Expression von *Cs-dac* und *Cs-Dll*. (A-C) Expression von *Cs-dac* in sukzessive älteren Umrollungsstadien. Pedipalpen und Beine exprimieren *Cs-dac* (schwarze Pfeile in A), die Cheliceren nicht (weißer Pfeil in A). Sternchen in C: proximale dorsale Expression in den Pedipalpen und Laufbeinen. A,B sind Ventralansichten; C ist eine Lateralansicht. (D) Expression von *Cs-dac* in älteren Beinknospen bei etwa 125 hnE. (E) Expression von *Cs-Dll* in jungen Beinknospen bei etwa 90-100 hnE. (F-H) Expression von *Cs-Dll* in den Laufbeinen bei etwa 140, 170, 230 hnE (von F nach H). (I-J) Nachweis von *Cs-dac* (violett-braun) und *Cs-Dll* (blau) im selben Präparat. Koexpression (co) erscheint dunkel-violett. (I) Bein bei etwa 140 hnE. (J) Bein bei etwa 230 hnE. (K-M) Expression von *Cs-dac* in den Laufbeinen bei etwa 140, 170, 230 hnE (von K nach M). Pfeil in L: proximale dorsale Domäne. Pfeil in M: Expression (vermutlich) im PNS des Tarsus. Abkürzungen: siehe Abkürzungsverzeichnis S. 2-5.

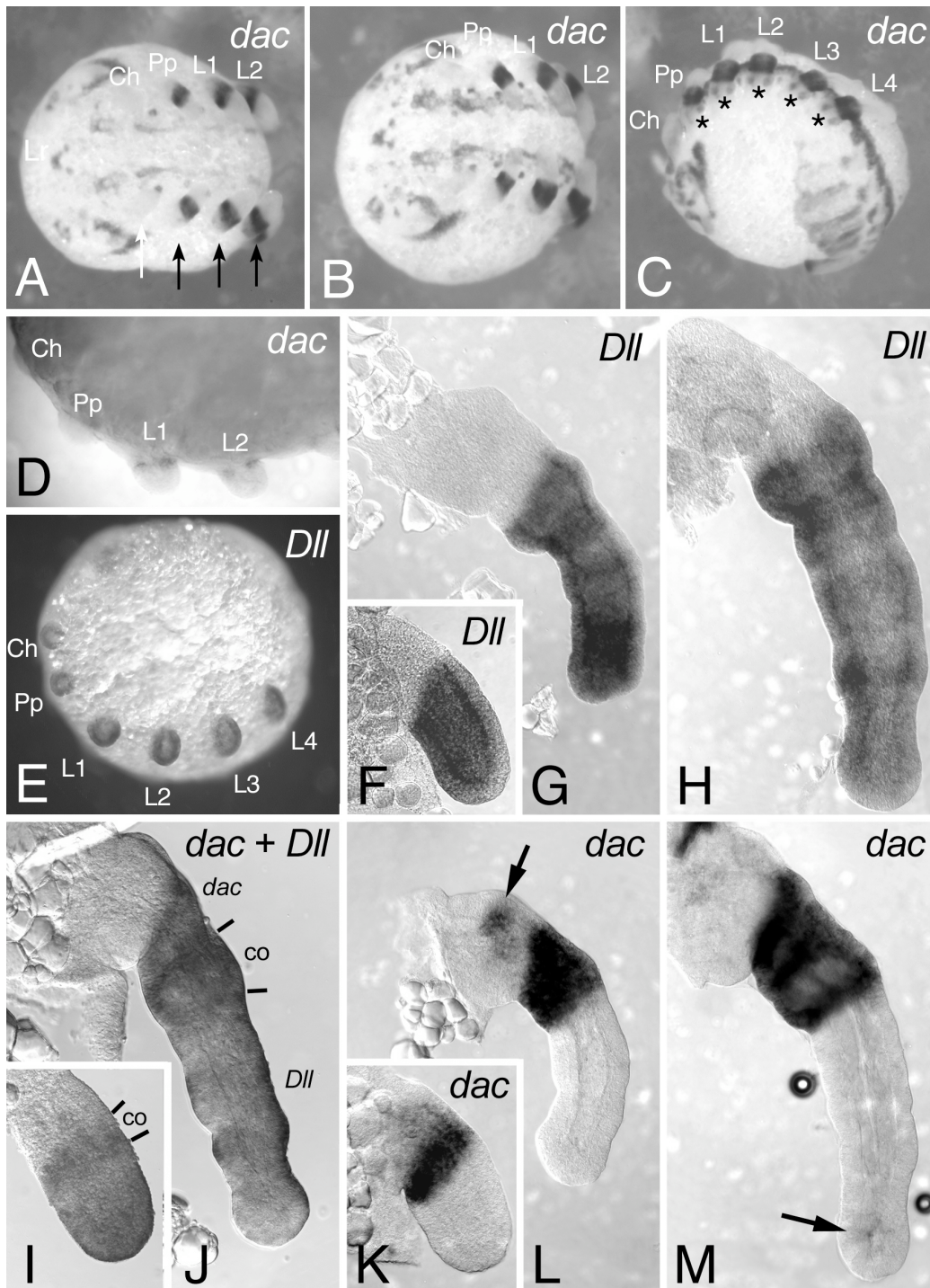


Abb. 3.22

### **Abbildung 3.23**

Expression von *Cs-Dll* in den Gliedmaßen. (A,B) Chelicere, (C,D) Pedipalpus, (E,F) Laufbein bei jeweils etwa 150 und 230 hnE (spaltenweise von links nach rechts). Pfeil in D: Expression im Gnathenditen des Pedipalpus. Abkürzungen: siehe Abkürzungsverzeichnis S. 2-5.

### **Abbildung 3.24**

Expression von *Cs-dac* in den Gliedmaßen. (A,B) Chelicere, (C,D) Pedipalpus, (E,F) Laufbein bei jeweils etwa 150 und 230 hnE (spaltenweise von links nach rechts). Pfeil in D,F: diffuse Expression in der Coxa, die möglicherweise mit der Bildung des PNS in Zusammenhang steht. Abkürzungen: siehe Abkürzungsverzeichnis S. 2-5.

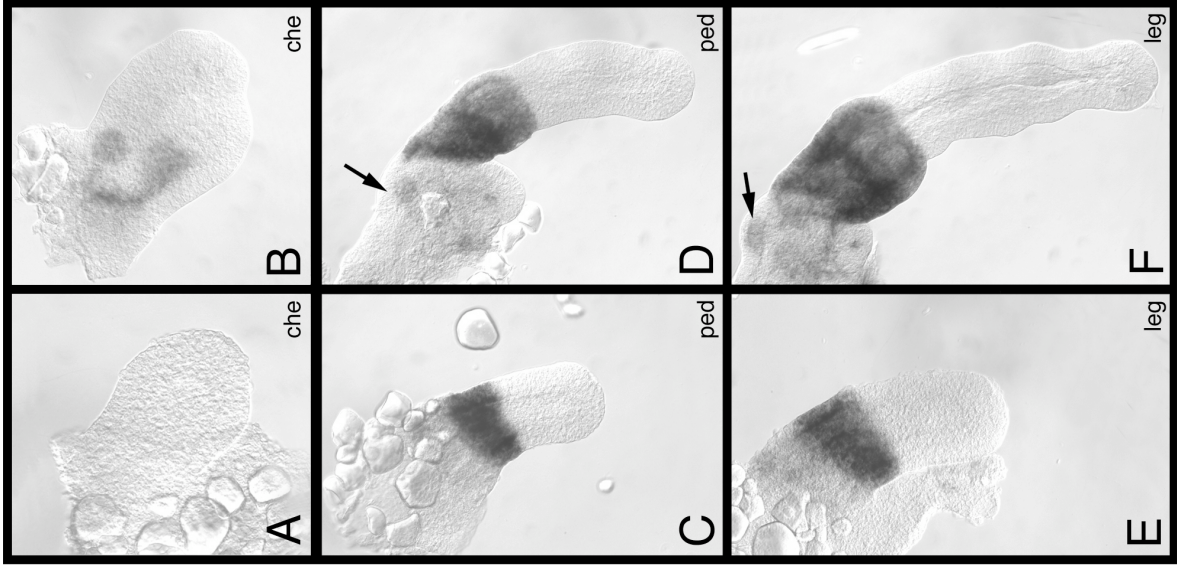


Abb. 3.24

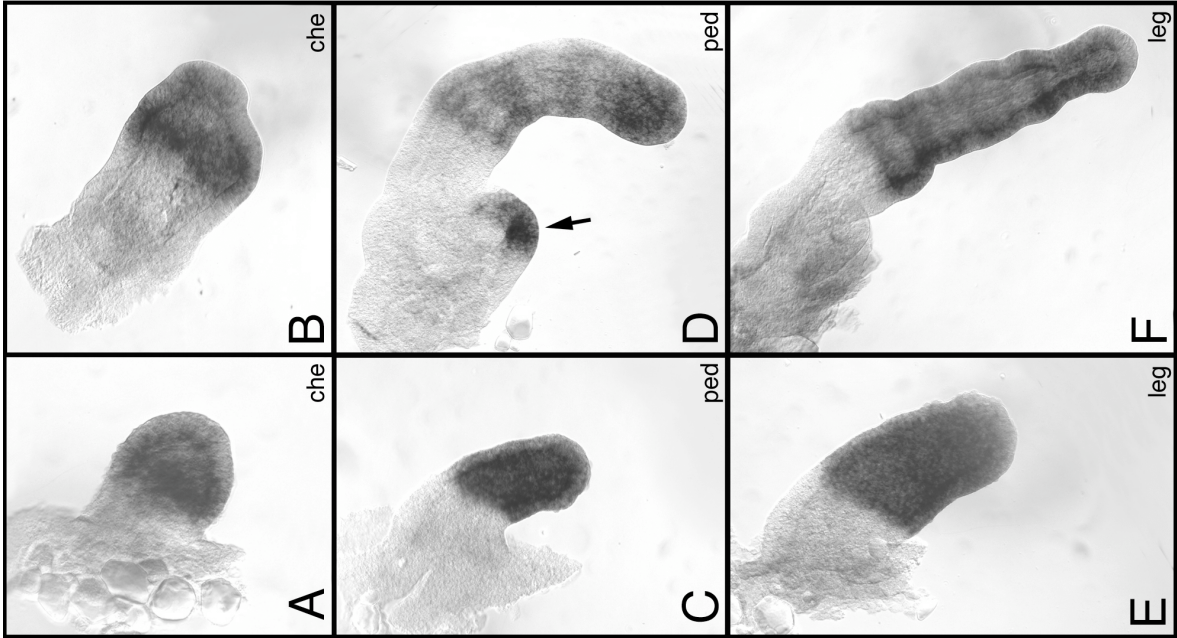


Abb. 3.23

### **Abbildung 3.25**

Expression von *Gm-Dll* in *Glomeris* Embryos. (A) Stadium 1. (B) Detail des Embryos in A; beachte die Expression im Prämandibularsegment (Sternchen). (C) Stadium 2. (D) Ansicht des Kopfes des Embryos in C; beachte die jetzt fehlende Expression im Prämandibularsegment (Pfeile). (E) Stadium 3. (F) Stadium 4. (G) Stadium 5. Die Einsatz-Abbildung zeigt die Kopfgliedmaßen Antenne (oben), Mandibel (Mitte), Maxille (unten) in der natürlichen Lage. (H) Stadium 6. (I) Stadium 6.1. A-G sind Ventralansichten. H,I sind Lateralansichten. Die Ziffern bezeichnen die Rumpfsegmente. Weitere Abkürzungen: siehe Abkürzungsverzeichnis S. 2-5.



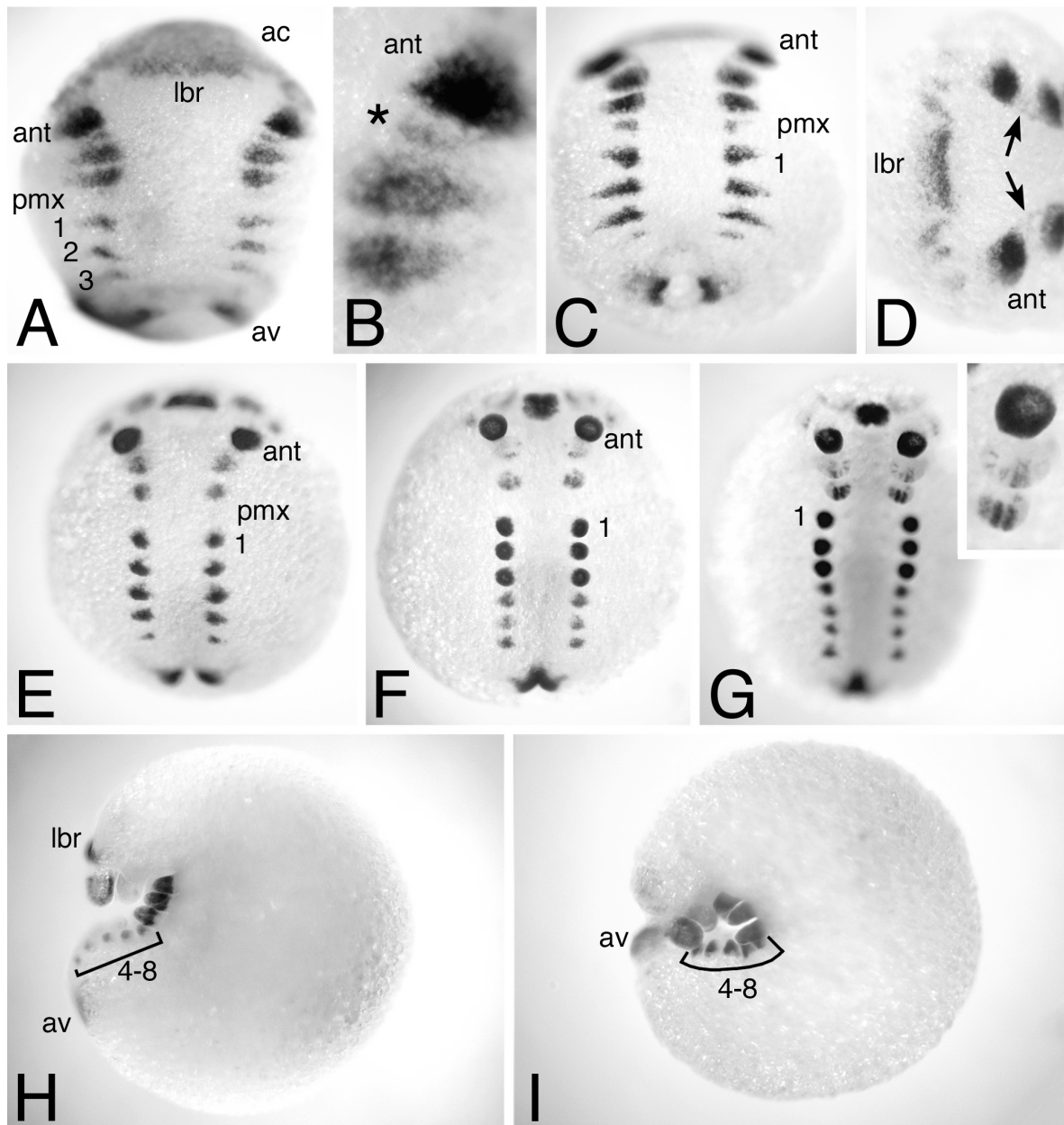


Abb. 3.25

### **Abbildung 3.26**

Expression von *Gm-Dll* in den Gliedmaßen. (A-C) Rumpfbein. (D-F) Maxille. (G-I) Mandibel. (J,K) Antenne. Die Pfeilköpfe in C deuten auf die zwei Gebiete stärkerer Expression in sehr alten Embryos des Stadiums 6. Dazwischen und an der Beinspitze ist die Expression schwächer. Die Pfeile in D deuten auf Expression in den Primordien der zwei Sinnespalpen. Der Pfeil in E zeigt die Expression im sog. Lobus interior an. Der Pfeilkopf in F deutet auf die Stelle, an der die bereits verschmolzenen Maxillen zwecks Präparation auseinandergerissen werden mußten. Abkürzungen: siehe Abkürzungsverzeichnis S. 2-5.

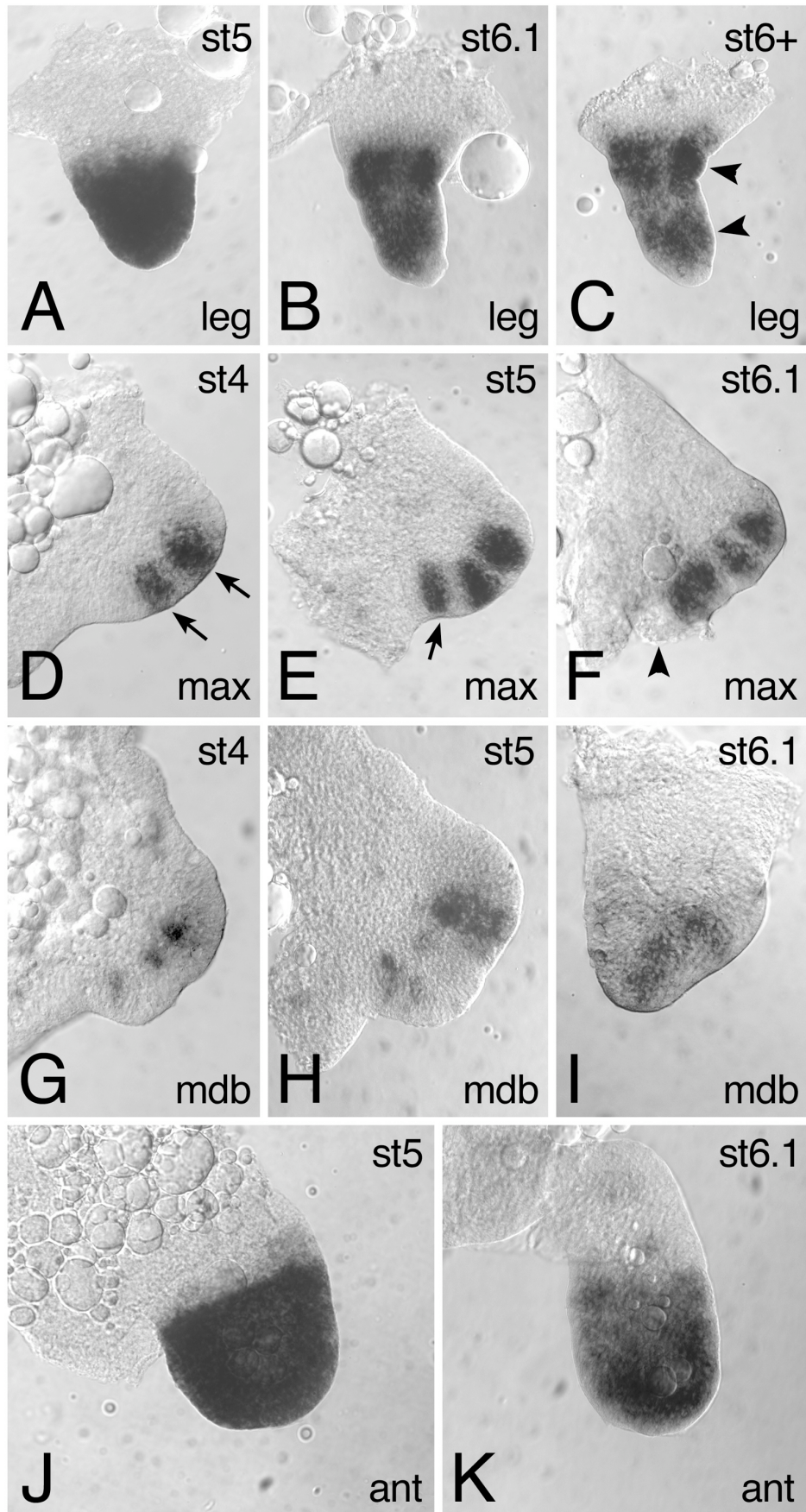


Abb. 3.26

### **Abbildung 3.27**

Expression von *Gm-dac* in *Glomeris* Embryos. (A) Stadium 2. (B) Spätes Stadium 2. (C,D) Stadium 3. In D ist nur der Kopf gezeigt. Das Sternchen kennzeichnet die Expression im Neuroektoderm des Prämandibular- und Mandibularsegments. (E) Stadium 4. Die Pfeilköpfe deuten auf die Expression im Herz. (F) Stadium 4. (G,H) Stadium 4.1. In H ist nur der Kopf gezeigt. (I) Stadium 5. (J) Stadium 6.1. A-E und G-I sind Ventralansichten. F und J sind Lateralansichten. Die Ziffern kennzeichnen die Rumpfsegmente. Weitere Abkürzungen: siehe Abkürzungsverzeichnis S. 2-5.

### **Abbildung 3.28**

Expression von *Gm-dac* in den Gliedmaßen. (A,E) Rumpfbein. (B,F) Maxille. (C,G) Mandibel. (D,H) Antenne. Die Sternchen kennzeichnen jeweils Expression im Neuroektoderm (gehört nicht zu den Gliedmaßen). Die Pfeile in D,H deuten auf die Expression in den vier Sinneszapfen (siehe auch Einsatz-Bild in D: Antennenspitze von distal betrachtet). Der Pfeilkopf in E deutet auf eine kleine ventrale Expressionsdomäne (möglicherweise im PNS). Abkürzungen: siehe Abkürzungsverzeichnis S. 2-5.

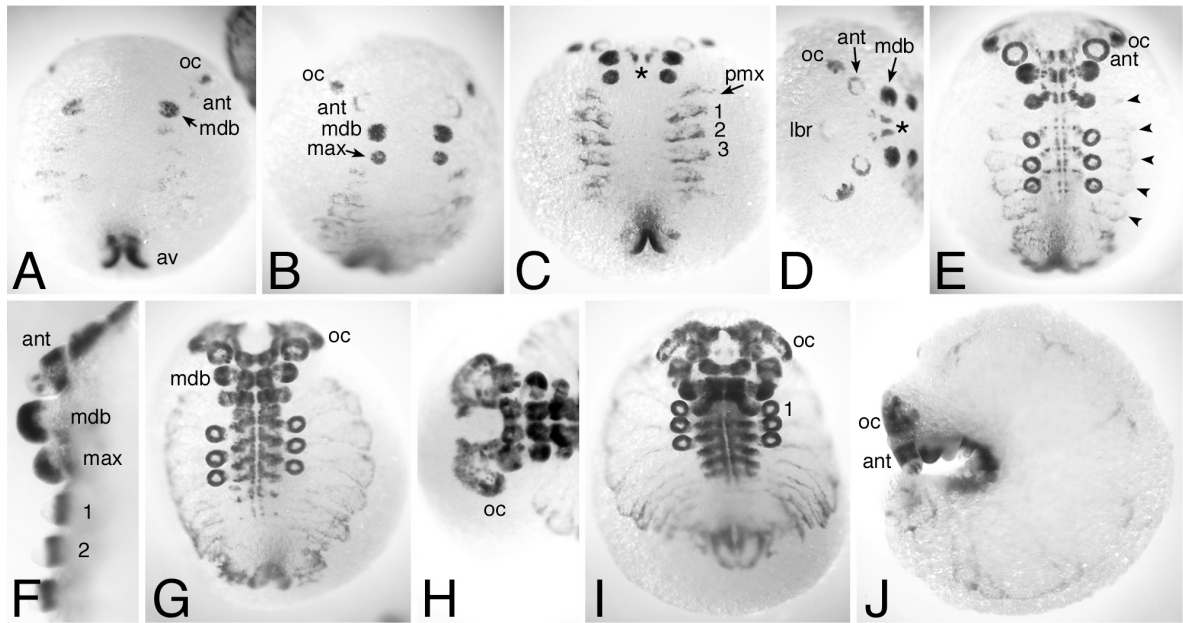


Abb. 3.27

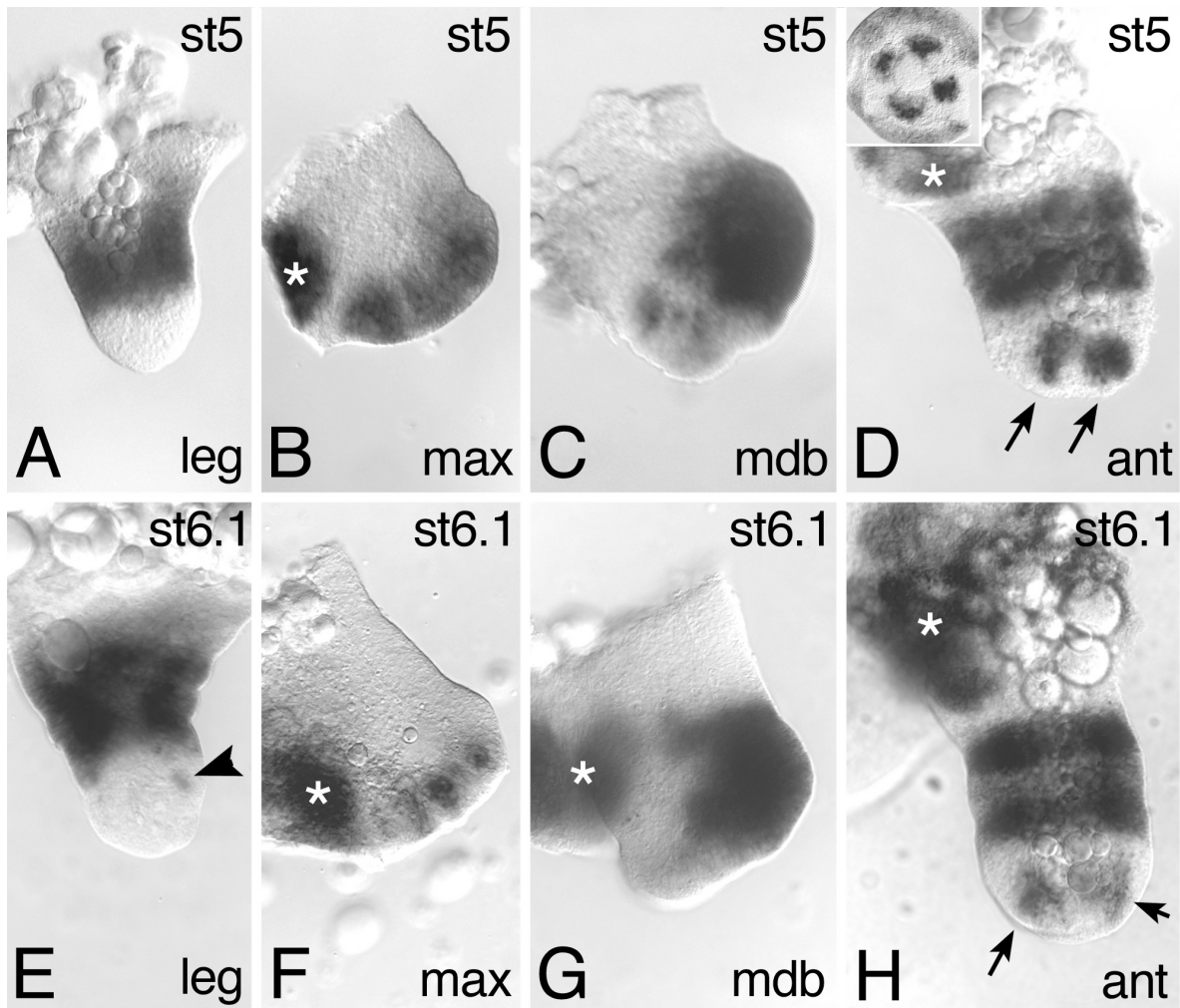


Abb. 3.28

### 3.1.3.2 *extradenticle* und *homothorax*

Die Gene *exd* und *hth* gehören beide zur Gruppe der TALE Homeoboxgene, deren Genprodukte sich durch eine um drei Aminosäuren erweiterte Homöodomäne auszeichnen (Bürglin, 1997; Bürglin, 1998). In der phylogenetischen Analyse werden sowohl die *hth* als auch die *exd* Gene aus *Glomeris* und *Cupiennius* zusammen gruppiert und bilden die Schwestergruppe zu den *hth*- bzw. *exd*-Genen aus Insekten (Abb. 3.29; 3.30).

#### *Die Expression von extradenticle und homothorax in Cupiennius salei*

In *Drosophila* sind die beiden Gene *exd* und *hth* an der Entwicklung vieler Organe beteiligt und daher auch großflächig und überwiegend diffus exprimiert (Kurant et al., 1998; Pai et al., 1998; Rieckhof et al., 1997; Rauskolb et al., 1993; Flegel et al., 1993). In *Cupiennius* zeigen alle vier Homologa ebenfalls ein relativ diffuses Expressionsmuster. *Cs-hth-1* ist im Großteil der Zellen des Keimstreifs schwach exprimiert (Abb. 3.31B,D). Lediglich der Kopf wird ausgespart; hier findet sich nur im anterioren Teil des Gehirns eine schwächere Expression (Abb. 3.31A,C). Ganz ähnlich (mit Ausnahme der Gliedmaßen, siehe unten) ist die Expression von *Cs-hth-2* (Abb. 3.31 und Daten nicht gezeigt). Das Gen *Cs-exd-1* ist diffus im gesamten Keimstreif exprimiert, einschließlich der Kopflappen (Abb. 3.31E-G), während *Cs-exd-2* die Kopflappen, ähnlich wie *Cs-hth-1* ausspart (Abb. 3.31I).

In *Drosophila* ist das *exd* Gen über die gesamte Länge des Beins exprimiert. Die Expression seines Kofaktors *hth* ist dagegen auf den proximalen Teil beschränkt. Da die Genprodukte beider Gene nur als Paar funktionell sind, bestimmt dieser proximale Bereich der Koexpression zugleich den Funktionsbereich der beiden Gene. Im Gegensatz zu den thorakalen Beinen bei *Drosophila* ist keines der beiden *exd* Gene aus *Cupiennius* im gesamten Bein exprimiert. Die Expression von *Cs-exd-1* ist am proximalen Ende der Laufbeine am stärksten und nimmt dann in Richtung auf das distale Ende sehr rasch an Stärke ab (Abb. 3.32E-G; 3.33E,F). In den ältesten Embryonalstadien zeigt sich *Cs-exd-1* Expression in der Coxa und reicht sehr schwach noch bis in den Trochanter hinein. Zusätzlich findet sich ein Ring von *Cs-exd-1* Expression auf Höhe der Patella. Das zweite *exd* Gen, *Cs-exd-2*, ist in Ringen exprimiert; einer auf der Höhe des Trochanters und ein zweiter im Bereich der Patella. Dazu gibt es noch eine bandförmige Expressionsdomäne in der Coxa (Abb. 3.32H).

Die Expression der beiden *exd* Gene im Pedipalpus gleicht weitgehend der in den Laufbeinen. In jüngeren Stadien wird *Cs-exd-1* in einer proximalen Domäne exprimiert, die jedoch nach distal hin nicht so rapide an Stärke abnimmt, wie es in den Laufbeinen der Fall ist (Abb. 3.33C). Somit reicht die *Cs-exd-1* Expression in den Pedipalpen zunächst weiter nach distal als in den Laufbeinen. Nichtsdestotrotz ist das Expressionsmuster in den beiden Gliedmaßentypen in den ältesten Embryonalstadien fast völlig identisch (vgl. Abb. 3.33D und F). *Cs-exd-2* ist im Pedipalpus ähnlich wie in den Laufbeinen in zwei Ringen (im Trochanter und in der Patella) exprimiert. Zusätzlich wird *Cs-exd-2* sehr stark im Coxalendit exprimiert (nicht gezeigt; siehe Prpic (2000)). In der Chelicere schließlich ist *Cs-exd-1* ubiquitär exprimiert und ist somit nicht auf proximale Bereiche beschränkt (Abb. 3.33A). Erst in sehr alten Stadien tritt distal eine Reduktion der Expressionsstärke auf (Abb. 3.33B, Pfeilkopf). *Cs-exd-2* wird in der Chelicere in einem breiten Band etwa auf halber Höhe der Extremität exprimiert (nicht gezeigt; siehe Prpic (2000)).

So wie die Bein-Expression der zwei *exd* Gene aus *Cupiennius* keine offensichtliche Ähnlichkeit mit dem *exd* Expressionsmuster aus *Drosophila* zeigt, gilt Gleiches auch für die beiden *hth* Gene aus *Cupiennius*. *Cs-hth-1* ist nahezu über die gesamte Länge der Laufbeine exprimiert, nur die distale Spitze bleibt frei von Expression (Abb. 3.32A-C; Abb. 3.34C,F). Sehr spät erscheint hier ein schmaler Ring von *Cs-hth-1* Expression. *Cs-hth-2* weist ein sehr überraschendes Muster auf; das Gen ist in einem segmental wiederholten Muster exprimiert, wobei jedem zukünftigen Gelenk ein Expressionsring zukommt (Abb. 3.32D).

Im Pedipalpus ist *Cs-hth-1* genauso wie in den Laufbeinen in der gesamten Extremität exprimiert, mit Ausnahme der Zellen an der Spitze (Abb. 3.34B,E). Dort zeigt sich später ebenfalls ein schmaler zusätzlicher Expressionsring. *Cs-hth-2* ist auch im Pedipalpus in segmentalen Ringen exprimiert (nicht gezeigt; siehe Prpic (2000)). In der Chelicere zeigt *Cs-hth-1* eine starke ubiquitäre Expression (Abb. 3.34A,D). Diese bleibt über alle Entwicklungsstadien erhalten. *Cs-hth-2* ist in einem breiten Band um die Mitte der Chelicere herum exprimiert; später ist auch in der Spitze der Chelicere eine Expression von *Cs-hth-2* zu sehen (nicht gezeigt; siehe Prpic (2000)).

### *Die Expression von extradenticle und homothorax in Glomeris marginata*

Sowohl *Gm-exd* als auch *Gm-hth* sind in den meisten Zellen des Keimstreifs exprimiert. Das wesentlich schwächere Hybridisierungs-Signal von *Gm-exd* legt nahe, daß *Gm-exd* signifikant schwächer exprimiert ist als *Gm-hth*; allerdings wurden keine quantitativen, vergleichenden Messungen durchgeführt. *Gm-exd* ist in vielen Bereichen des sich entwickelnden Gehirns nur schwach exprimiert (Abb. 3.35A-D), wohingegen *Gm-hth* in den meisten Zellen des Proto- und Deutocerebrums stark exprimiert ist (Abb. 3.35I,J). Die Expression von *Gm-hth* in den Lateralplatten der Segmente ist sehr ausgeprägt (Abb. 3.35G-L), während *Gm-exd* in den Lateralplatten zunächst nur schwach exprimiert ist und später völlig fehlt (Abb. 3.35 B-F). Die Expression von *Gm-exd* erscheint gleichmäßig verteilt, wohingegen die Expressionsstärke von *Gm-hth* deutlich heterogen ist, was darauf hindeuten könnte, daß die Expression dieses Gens einer strikten räumlichen Regulation unterliegt.

In den Rumpfbeinen ist die Expression von *Gm-exd* auf proximale Bereiche beschränkt (Abb. 3.36A), während *Gm-hth* in proximalen und medialen Bereichen exprimiert ist (Abb. 3.36E). In beiden Fällen ist die Spitze der Beine frei von Expression. In der Antenne erscheint *Gm-hth* Expression gleichmäßig in der gesamten Extremität verteilt zu sein (Abb. 3.36H). Im Gegensatz dazu ist *Gm-exd* in der Antenne in einem komplexeren Muster exprimiert (Abb. 3.36D). Es besteht aus starker Expression in proximalen Zellen, distal gefolgt von zwei schmalen Ringen von schwacher bzw. starker Expression. Zellen an der Spitze der Antenne exprimieren *Gm-exd* nicht. In den Mundgliedmaßen ist die Expression von *Gm-exd* und *Gm-hth* ubiquitär, aber nicht ganz einheitlich verteilt (Abb. 3.36B,C,F,G).

### *Die Expression von extradenticle und homothorax in Tribolium castaneum*

Die Gene *Tc-exd* und *Tc-hth* sind in einem Großteil der Zellen des sich entwickelnden Keimstreifs von *Tribolium* exprimiert. Hier soll nur die Expression in den thorakalen Beinen betrachtet werden. Ähnlich wie in *Drosophila* ist *Tc-exd* während der gesamten Beinentwicklung ubiquitär exprimiert (Abb. 3.37A,B). Im Gegensatz dazu ist *Tc-hth* schon in frühen Entwicklungsstadien auf die Basis der Beinknospen beschränkt (Abb. 3.37C). Später ist der gesamte distale Teil der Beine frei von *Tc-hth* Expression. Die proximale



Expressionsdomäne zeigt etwa ab Beginn der Keimstreif-Retraktion eine Substrukturierung: ganz an der Basis der Beine und in einem Ring etwas distal davon ist *Tc-hth* sehr stark exprimiert; dazwischen liegt ein Bereich schwächerer Expression (Abb. 3.37 D,E). Somit zeigt *Tribolium* bezüglich der Expression von *exd* und *hth* in den Beinen Ähnlichkeiten zu *Drosophila*, aber deutliche Unterschiede zu *Glomeris* und *Cupiennius*.

### **Abbildung 3.29**

Phylogenetische Analyse von *hth*-Proteinen und ähnlichen Proteinen aus verschiedenen Arthropoden, der Maus und *Caenorhabditis elegans*. Dargestellt ist das ungewurzelte majority-rule Konsensusphylogramm, das aus 1000 Zwischenbäumen errechnet wurde, die mit der Quartet Puzzling Methode nach Strimmer und von Haeseler (1996) erzeugt wurden. Die Zahlen an den Kanten geben die sog. reliability values an. Abkürzungen: siehe Abkürzungsverzeichnis S. 2-5.

### **Abbildung 3.30**

Phylogenetische Analyse von *exd*-Proteinen und ähnlichen Proteinen aus verschiedenen Arthropoden, der Maus und *Caenorhabditis elegans*. Dargestellt ist das ungewurzelte majority-rule Konsensusphylogramm, das aus 1000 Zwischenbäumen errechnet wurde, die mit der Quartet Puzzling Methode nach Strimmer und von Haeseler (1996) erzeugt wurden. Die Zahlen an den Kanten geben die sog. reliability values an. Abkürzungen: siehe Abkürzungsverzeichnis S. 2-5.

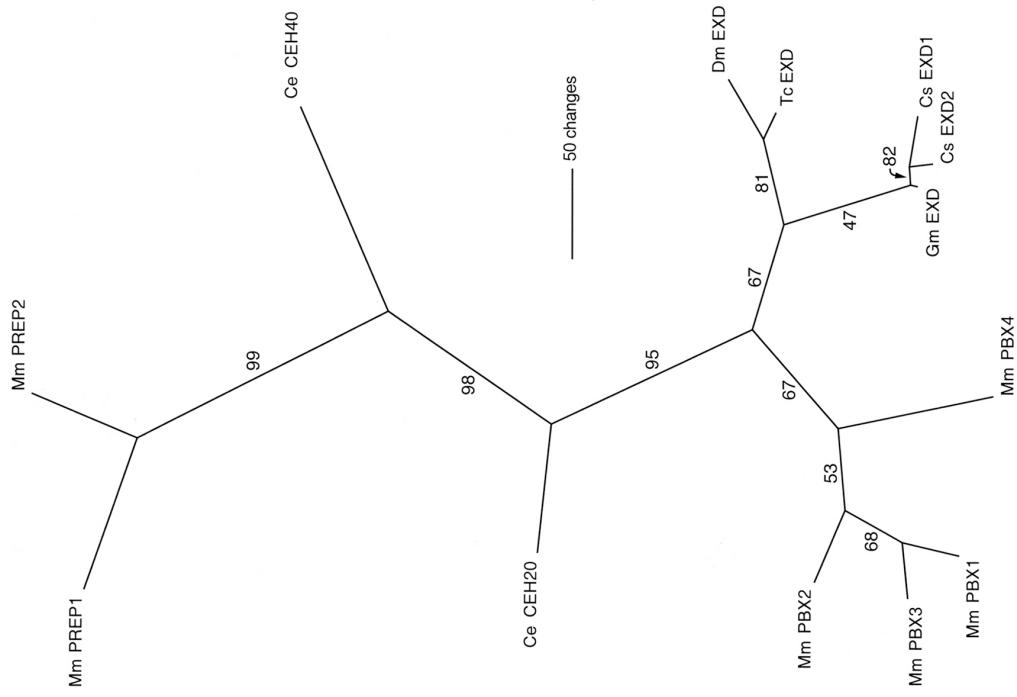


Abb. 3.29

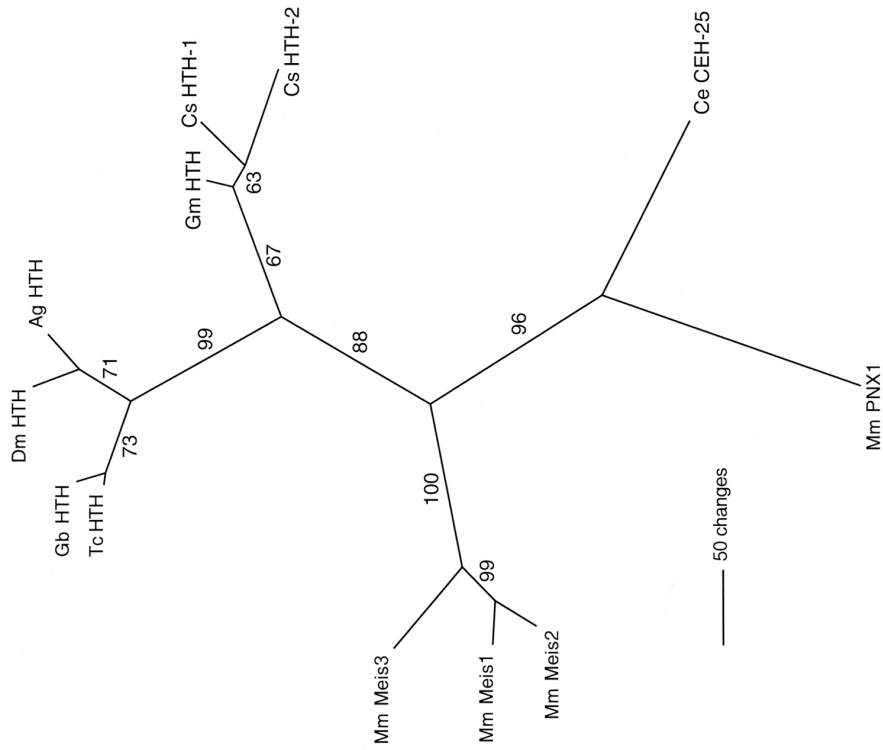


Abb. 3.30

### Abbildung 3.31

Expression von *Cs-hth-1* (A-D), *Cs-exd-1* (E-G), *Cs-hth-2* (H) und *Cs-exd-2* (I) in *Cupiennius* Embryos. A,C zeigen den Kopf, B,E,H das Prosoma, D das Opisthosoma. F,G,I sind leicht schräge Lateralansichten. A,B etwa 110 hnE. C,D etwa 160 hnE. E,F etwa 180 hnE. G-I etwa 200 hnE. Abkürzungen: siehe Abkürzungsverzeichnis S. 2-5.

### Abbildung 3.32

Expression von *Cs-hth-1* (A-C), *Cs-exd-1* (E-G), *Cs-hth-2* (D) und *Cs-exd-2* (H) in den Laufbeinen bei jeweils etwa 140, 160, 230, 230 hnE (spaltenweise von links nach rechts). Der Pfeil in C deutet auf den spät erscheinenden distalen Expressionsring. Das Sternchen in F,G markiert den Expressionsring im Muster von *Cs-exd-1*. Das Muster von *Cs-exd-2* besteht aus drei Ringen (Pfeil und Pfeilköpfe in H). Abkürzungen: siehe Abkürzungsverzeichnis S. 2-5.

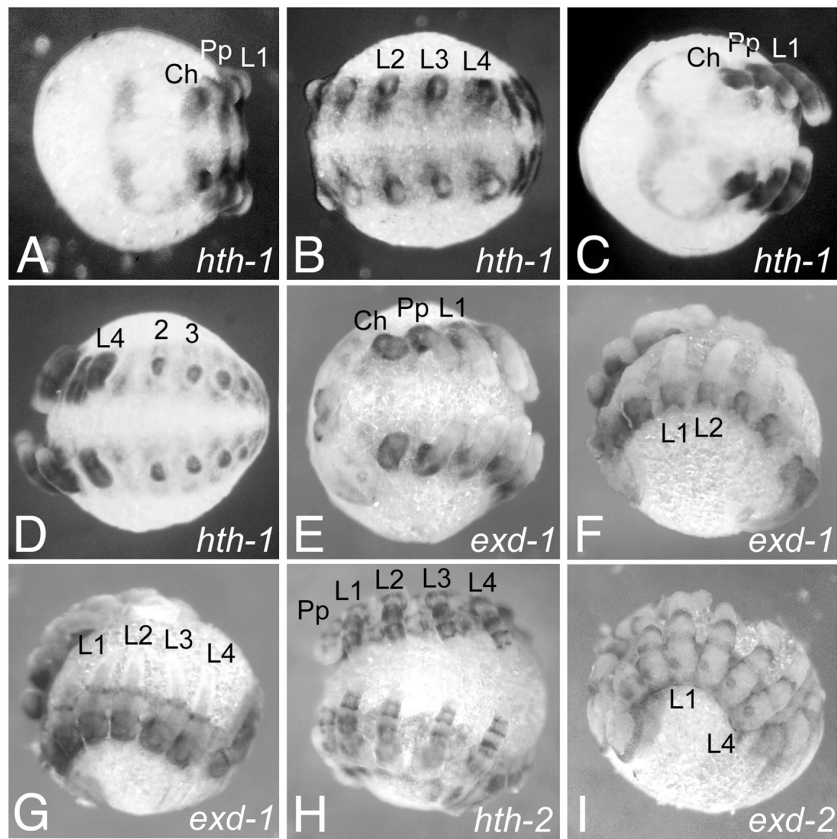


Abb. 3.31

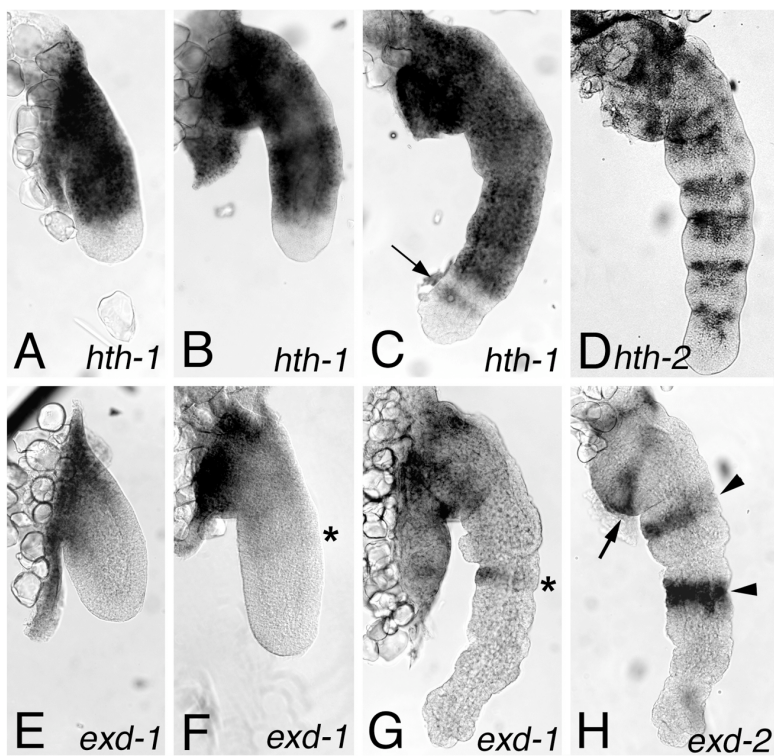


Abb. 3.32

### **Abbildung 3.33**

Expression von *Cs-exd-1* in den Gliedmaßen. (A,B) Chelicere, (C,D) Pedipalpus, (E,F) Laufbein bei jeweils etwa 150 und 230 hnE (spaltenweise von links nach rechts). Pfeil in D,E: distaler Expressionsring. Pfeilkopf in B: abgeschwächte Expression in der Chelicerenspitze. Abkürzungen: siehe Abkürzungsverzeichnis S. 2-5.

### **Abbildung 3.34**

Expression von *Cs-hth-1* in den Gliedmaßen. (A,D) Chelicere, (B,E) Pedipalpus, (C,F) Laufbein bei jeweils etwa 150 und 230 hnE (spaltenweise von links nach rechts). Pfeil in E,F: spät erscheinender distaler Expressionsring. Abkürzungen: siehe Abkürzungsverzeichnis S. 2-5.

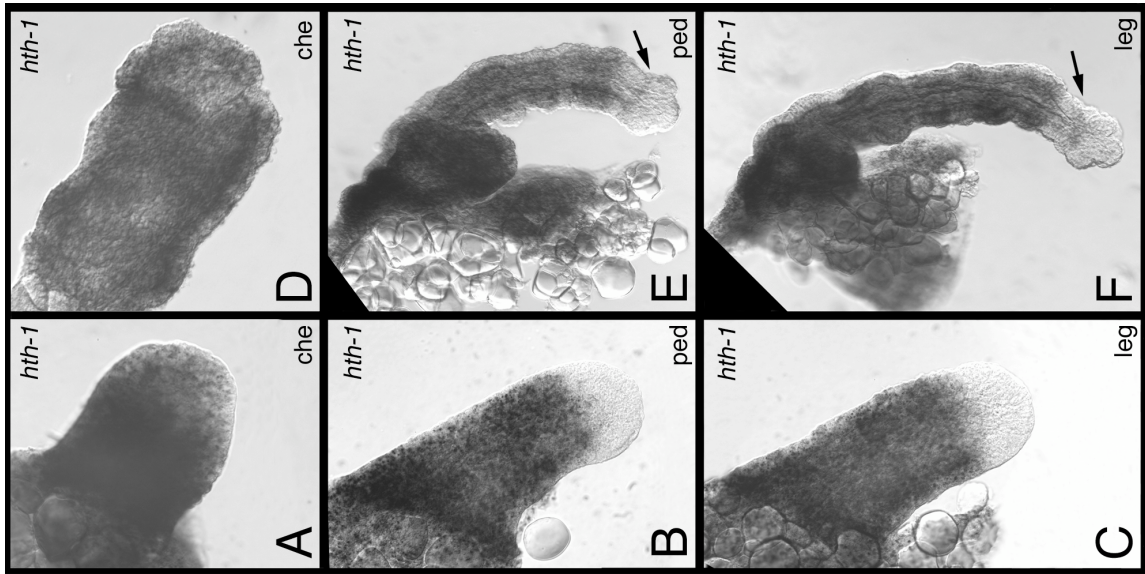


Abb. 3.34

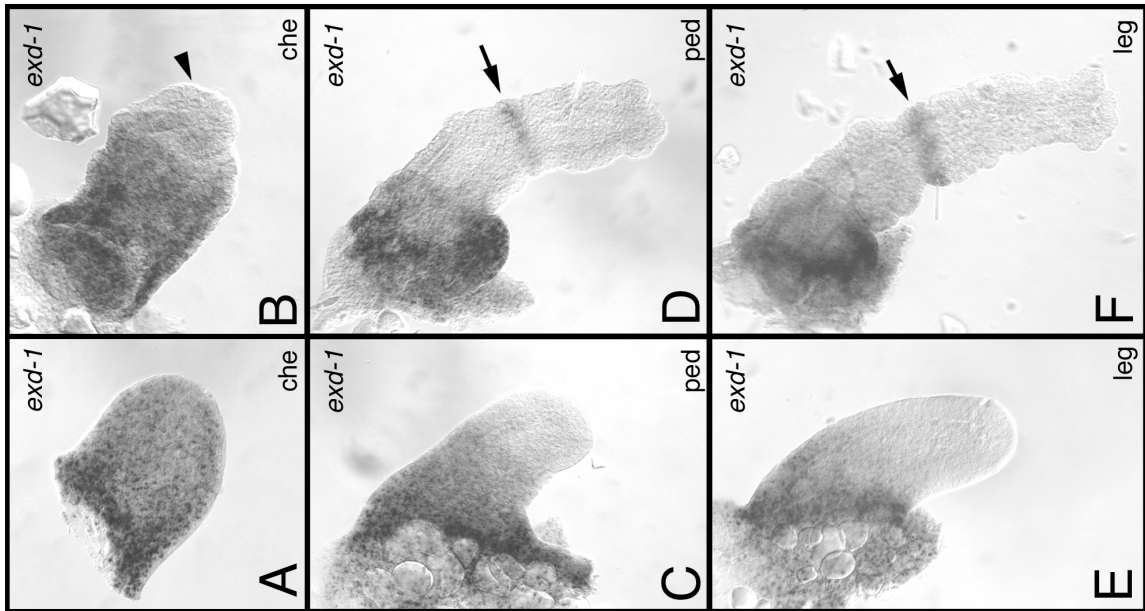


Abb. 3.33

### Abbildung 3.35

Expression von *Gm-exd* (A-F) und *Gm-hth* (G-L) in *Glomeris* Embryos. (A) Stadium 1. (B) Stadium 3. (C) Stadium 4. (D) Stadium 4.1. (E) Stadium 5. (F) Frühes Stadium 6. (G) Stadium 2. (H) Stadium 3. (I) Stadium 4. (J) Stadium 5. (K) Stadium 6. (L) Stadium 6.1. Die Pfeilköpfe in J zeigen die Expression in den sog. Seitenplatten. A-D und G-K sind Ventralansichten. E,F,L sind Lateralansichten. Die Ziffern bezeichnen die Rumpsegmente. Weitere Abkürzungen: siehe Abkürzungsverzeichnis S. 2-5.

### Abbildung 3.36

Expression von *Gm-exd* (A-D) und *Gm-hth* (E-H) in den Gliedmaßen bei Stadium 6.1. (A,E) Rumpfbein. (B,F) Maxille. (C,G) Mandibel. (D,H) Antenne. Der Pfeil und der Pfeilkopf in D deuten je auf einen Ring schwächerer bzw. stärkerer Expression, die sich beide distal an die proximale Expressionsdomäne anschließen. Abkürzungen: siehe Abkürzungsverzeichnis S. 2-5.



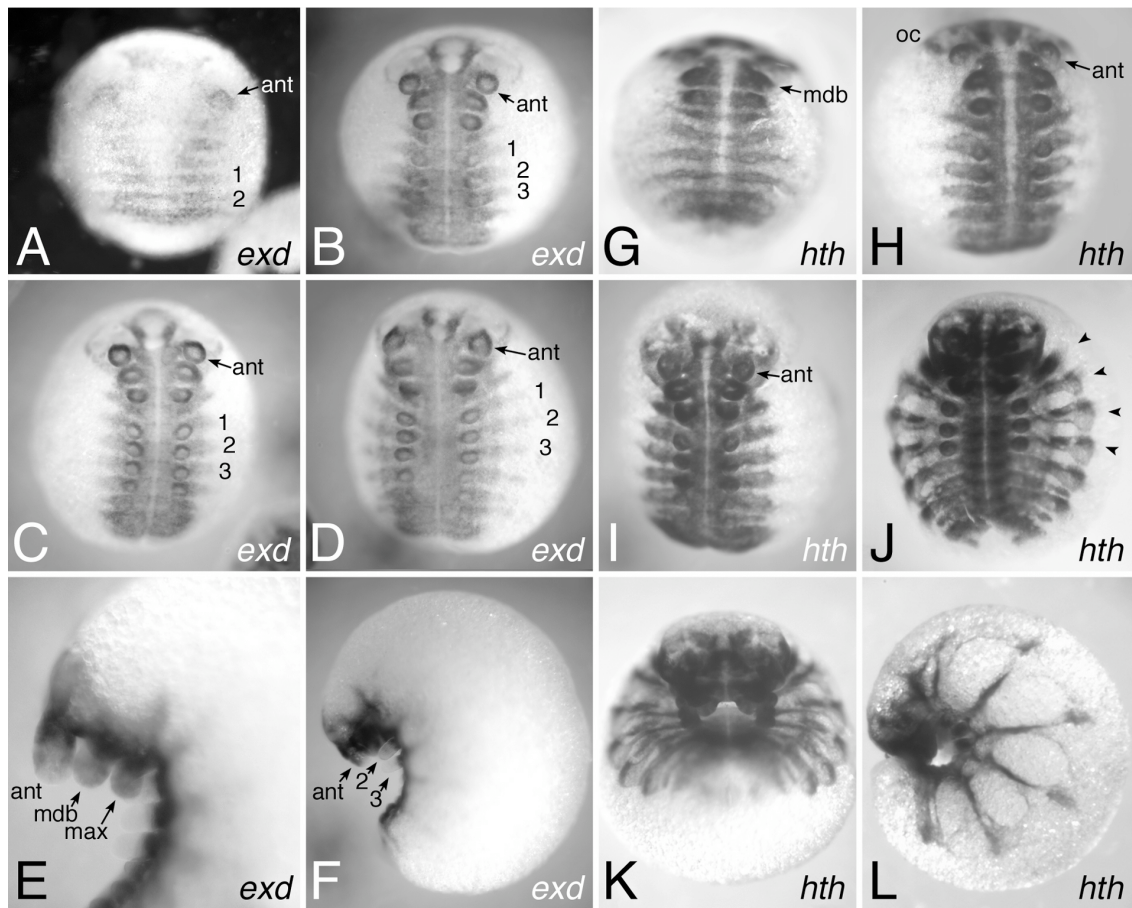


Abb. 3.35

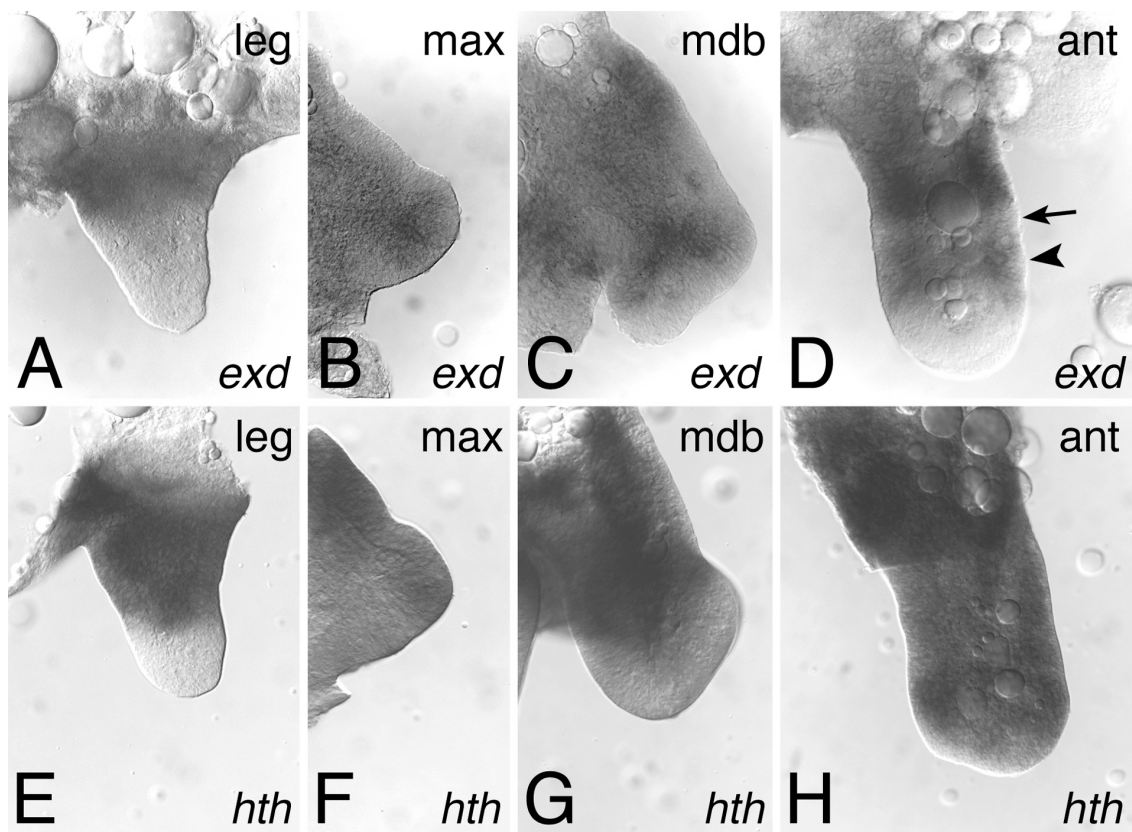


Abb. 3.36

### **Abbildung 3.37**

Expression von *Tc-exd* (A,B) und *Tc-hth* (C-E) in *Tribolium* Embryos. (A) Embryo bei voller Keimstreif-Streckung. Nur die Thoraxsegmente sind abgebildet. (B) Embryo während der Keimstreif-Verkürzung. Ebenfalls nur Thoraxsegmente. (C) Während der Keimstreif-Streckung sind die Spitzen der Extremitätenknospen von *Tc-hth* Expression ausgenommen. (D) Präpariertes thorakales Bein eines Embryos während der Keimstreif-Verkürzung. Das Expressionsmuster besteht aus einer proximalen Expression und einem etwas distal davon gelegenen Ring. (E) Embryo mit vollständig verkürztem Keimstreif. A-C sind Ventralansichten. E ist eine Lateralansicht. Abkürzungen: siehe Abkürzungsverzeichnis S. 2-5.

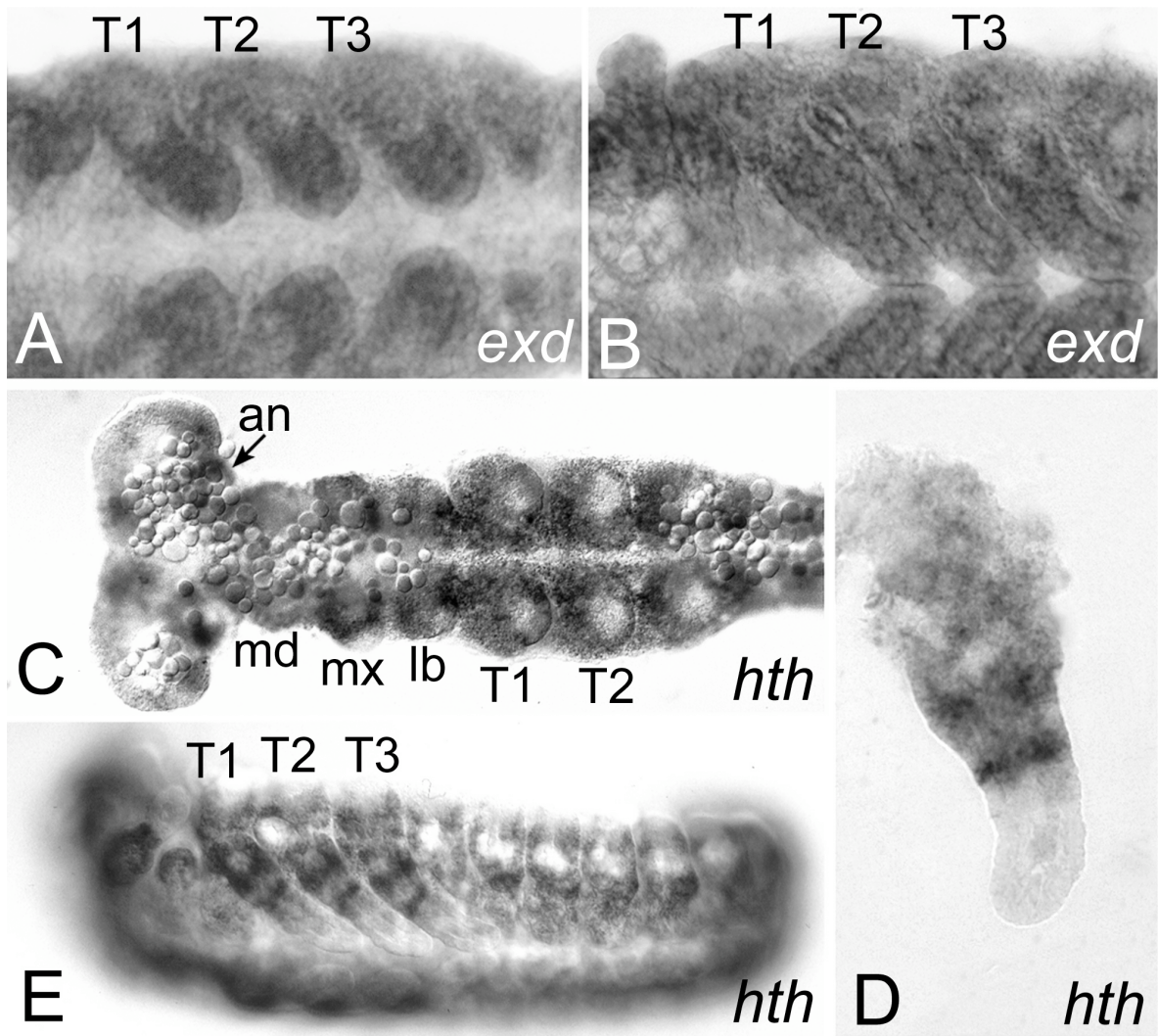


Abb. 3.37

### 3.1.4 Die Bein-Segmentierungs-Gene

#### 3.1.4.1 Der *Notch*-Signalweg und seine Effektoren

##### *Die Expression von Notch in Cupiennius salei*

*Notch* ist in den meisten embryonalen Geweben von *Cupiennius* exprimiert. Die Orthologie, das allgemeine Expressionsmuster und die Rolle des Gens während der Entwicklung des Nervensystems und der Körpersegmentbildung sind bereits eingehend studiert worden (Stollewerk, 2002; Stollewerk et al., 2003). Im Rahmen der vorliegenden Untersuchungen soll deshalb das Hauptaugenmerk auf der Expression von *Notch* während der Extremitätenentwicklung liegen. In den Extremitätenknospen bis etwa 150 hnE ist *Cs-Notch* nur sehr schwach und ohne erkennbares Muster exprimiert (nicht gezeigt). In der Chelicere bleibt die Expression auch über diesen Zeitpunkt hinaus schwach und ohne fassbare Musterbildung (Abb. 3.38A-E). Im Pedipalpus und in den Laufbeinen dagegen zeigen sich ab etwa 150 hnE neben einer deutlichen Expression an der Basis auch zwei weitere, ringförmige Domänen (Abb. 3.38F,K). Diese sind jedoch so schwach, daß sie nur schwer zur Darstellung gebracht werden können. Im Pedipalpus werden im weiteren Verlauf diese zwei Domänen stärker und somit deutlich sichtbar und kommen schließlich an der distalen Grenze des Femur bzw. der Tibia zu liegen (Abb. 3.38G-J). Darüber hinaus kommen sukzessive weitere ringförmige Domänen hinzu, die, ebenso wie die älteren Domänen, erst sehr schwach in Erscheinung treten und dann ständig stärker werden. So erscheint ab etwa 180 hnE eine distale Domäne, welche schließlich in der Patella zu liegen kommt (Abb. 3.38H-J). Desweiteren erscheint ab etwa 200 hnE eine mediale Domäne, die im Trochanter zu liegen kommt (Abb. 3.38I,J). Nahe der Extremitätenspitze zeigt sich ab etwa 170 hnE außerdem eine diffuse Expression (Abb. 3.38G-J).

In den Laufbeinen zeigt sich ein ganz ähnliches Expressionsprofil. Der einzige Unterschied betrifft den Metatarsus, der ja im Pedipalpus fehlt. Hier zeigt sich etwa ab 170 hnE eine ringförmige Domäne, die naturgemäß im Pedipalpus fehlt (Abb. 3.38L-O). Auf Grund der Schwäche durch die sich die *Notch*-Expressionsdomänen auszeichnen, konnte der Ursprung dieser beinspezifischen Domäne nicht eindeutig geklärt werden. Es bleibt aber festzuhalten, daß im Expressionsprofil von *Cs-Ser* (siehe unten) dem Erscheinen der ringförmigen Domänen im *Notch*-Expressionsprofil jeweils ähnliche, aber komplementäre Domänen zeitlich vorangehen. Beispielsweise weist das *Cs-Ser* Expressionsmuster im Bein

bei etwa 150 hnE bereits 3 distale/mediale Ringe auf (Abb. 3.40I), während das *Cs-N* Expressionsmuster erst 2 solche Ringe zeigt (Abb.3.38K). Da *Ser* in *Drosophila* ein *Notch*-Ligand und somit ein Aktivator des *Notch*-Signalweges ist, liegt die Vermutung nahe, daß der *Cs-Notch*-Expressionsring im Metatarsus (der dritte Ring des *Cs-Notch*-Profils) durch den benachbarten und zeitlich vor ihm erscheinenden dritten *Cs-Ser*-Ring erzeugt wird. Der metatarsale *Cs-N*-Ring erscheint demnach wahrscheinlich (ebenso wie die übrigen Ringe des *Cs-N*-Expressionsprofils) de novo, auch wenn dies im Präparat nicht dargestellt werden konnte.

### *Die Expression der DSL-Gene in Cupiennius salei*

Die Gene *Serrate* (*Ser*) und *Delta* (*Dl*) in *Drosophila* sind sich strukturell sehr ähnlich und dienen beide als Liganden für den Rezeptor *Notch* (z.B. Klueg und Muskavitch, 1999). Sie gehören zu einer größeren Genfamilie, die als DSL-Genfamilie bezeichnet wird (Lissemore und Starmer, 1999). Aus *Cupiennius* sind insgesamt drei Fragmente bekannt, die eine Ähnlichkeit zu den DSL-Genen aufweisen. Es sollte daher zunächst deren Orthologie geklärt werden. In der phylogenetischen Analyse bilden die *Ser* Gene aus *Cupiennius*, *Drosophila*, *Tribolium*, *Anopheles* und die *Jagged* Gene aus der Maus erwartungsgemäß eine Gruppe (Abb. 3.39). Diese Gruppierung ist allerdings statistisch nicht signifikant unterstützt (reliability value = 34). Die Auflösung der phylogenetischen Analyse erlaubt mithin keine Trennung zwischen den DSL-Genen aus *Caenorhabditis* und den *Ser/Jag* Genen. Allerdings sind die *Ser/Jag* Gene signifikant von den *Dl* Genen getrennt (reliability value = 60). Somit können relativ sicher zwei *Dl* Homologa und ein *Ser* Homologon in *Cupiennius* angesprochen werden.

Von den *Dl* Genen ist zumindest *Cs-Dl-1* zeitweise in Ringen in den Beinen exprimiert (Daten nicht gezeigt). Aus Zeitgründen wurde die genauere Expressions- und Funktionsanalyse jedoch nicht mit den *Delta* Genen, sondern nur mit *Cs-Ser* durchgeführt. Die Studien zu *Cs-Dl-1* und *Cs-Dl-2* sollen im Anschluß an die hier vorgestellten Arbeiten weitergeführt werden.

Das Gen *Cs-Ser* ist allgemein schwach und nahezu ubiquitär exprimiert (Daten nicht gezeigt). Im Neuroektoderm (mit Ausnahme des Gehirns selbst) ist das Gen offenbar nicht exprimiert. In jungen Stadien zeigen sich in der Wachstumszone ganz schwache segmentale Streifen (nicht gezeigt). In den Gliedmaßen ist das Gen ubiquitär exprimiert,

zeigt aber ein sehr dynamisches Muster, zusammengesetzt aus starker und schwacher Expression. In den Knospen aller prosomalen Gliedmaßen ist *Cs-Ser* einheitlich und relativ stark exprimiert (Abb. 3.40A,D,G). In der Chelicere ändert sich bald darauf an der Spitze die Expressionsstärke (Abb. 3.40C), worauf sich ein subterminaler Ring sehr starker Expression bildet, dem ein Ring sehr schwacher Expression folgt (Abb. 3.41A). Den Abschluß bildet eine Kappe mäßig starker Expression. Dieses Muster bleibt über die gesamte Entwicklung erhalten (Abb. 3.41A-C; 3.42A-C).

Im Pedipalpus und in den Laufbeinen entstehen aus der einheitlichen Expression langsam Ringe stärkerer Expression und dazwischen liegend Bereiche schwächerer Expression (Abb. 3.40E,H). Bei etwa 150 hnE haben sich im Pedipalpus zwei Ringe, im Laufbein drei Ringe gebildet. Dieser Unterschied ist verständlich, da der distalste der drei Ringe im Bein im Bereich des zukünftigen Metatarsus entsteht, der bekanntlich im Pedipalpus fehlt. Zusätzlich zu den zwei bzw. drei Ringen erscheint eine ganz proximale Expressionsdomäne und an der Spitze ist ebenfalls eine Expression nachzuweisen. Diese Domänen und Ringe bleiben während der gesamten Entwicklung erhalten. Dazu kommen weitere Ringe die de novo auf der Höhe des Trochanter und der Patella auftauchen (Abb. 3.41D-F, G-I). Eine Besonderheit im Laufbein ist die Aufspaltung des distalsten Rings ab etwa 180 hnE (Abb. 3.42G-L). Die zwei resultierenden Ringe liegen schließlich am Beginn und am Ende des Metatarsus. In beiden Gliedmaßentypen treten in späteren Stadien segmental wiederholt Punkte sehr starker Expression hervor, während die Expressionsstärke der Ringe nachlässt (Abb. 3.42D-F, G-I). Bei diesen Punkten handelt es sich möglicherweise um Vorläufer von Sinnesorganen (siehe dazu auch *Cs-h* unten).

### *Die Expression von hairy in Cupiennius salei*

In *Cupiennius* ist bislang nur ein einziges Gen der *hairy*-bHLH Genfamilie (z.B. Fisher und Caudy, 1998) bekannt. In einer früheren Orthologie-Analyse (Damen et al., 2000) ist es dem *Drosophila* Gen *hairy* zugeordnet worden. Die Expression in den Beinen von *Cupiennius* (siehe nachfolgend) scheint dieser Auffassung jedoch zu widersprechen, weshalb eine neue Orthologie-Analyse durchgeführt wurde. Allerdings belegt auch diese Analyse die Orthologie von *Dm-h* und *Cs-h* (Abb. 3.43).

Das allgemeine Expressionsmuster von *Cs-h* und hierbei besonders die segmentale Expression (siehe auch Abb. 3.44A,B) wurde bereits beschrieben (Damen et al., 2000).

Hier soll die Aufmerksamkeit auf die Gliedmaßenentwicklung gelenkt werden. Vor und während der Bildung der Extremitätenknospen umgibt ein Ring von *Cs-h* Expression die Entstehungsorte der Knospen (Abb. 3.44A,B). Kurz darauf zeigt sich in der Chelicere ein komplexes Muster aus mehreren Flecken *Cs-h* exprimierender Zellen (Abb. 3.45A). Das Muster in den Cheliceren erscheint sehr veränderlich während der gesamten Entwicklung (Abb. 3.45A-C; 346A-E). Die Bedeutung dieses Phänomens ist jedoch unbekannt.

In den Pedipalpen und Laufbeinen ist zunächst ein Muster aus insgesamt drei Ringen zu beobachten (Abb. 3.45D,E,G,H). Diese Ringe bleiben erhalten und kommen schließlich in der Coxa, dem Femur und der Tibia zu liegen (Abb. 3.46J,O). Im Laufbein kommt nach etwa 160 hnE ein vierter Ring distal dazu (Abb. 3.45I), der schließlich im Metatarsus zu liegen kommt. Ein entsprechender Ring fehlt im Pedipalpus (Abb. 3.45F). Während des weiteren Wachstums der Pedipalpen und Beine kommen de novo zwei weitere Expressionsringe dazu, wie es schon bei *Cs-N* und *Cs-Ser* beobachtet wurde, die im zukünftigen Trochanter und der zukünftigen Patella liegen (Abb. 3.46F-J, K-O). Zusätzlich zu den beschriebenen Ringen zeigt sich durchweg eine starke Expressionsdomäne in der Spitze der Pedipalpen und Beine. Schließlich muß noch eine weitere Besonderheit der *Cs-h* Expression erwähnt werden. Gegen Ende der Embryonalentwicklung wird das Erscheinungsbild der Expressionsringe uneinheitlich. Die Färbung erscheint dann wie aus Punkten und Flecken zusammengesetzt (Abb. 3.46J,O). Das erinnert sehr an das späte Expressionsmuster von *Cs-Ser* (Abb. 3.42F,I). Wie dort, so stehen wohl auch bei *Cs-h* die Punkte stärkerer Expression mit der Bildung von Sinnesorganen in Verbindung. Da die Punkte in der Nähe der entstehenden Gelenke liegen, handelt es sich möglicherweise um Vorläufer von Propriozeptoren.

### *Die Expression von AP-2 in Cupiennius salei*

*AP-2* aus *Drosophila* gehört zu einer kleinen Familie von Transkriptionsfaktoren mit spezifischen konservierten Bereichen, die zur DNA-Bindung, Dimerisierung und zur Transkriptionsaktivierung dienen (Williams und Tjian, 1991). In der Maus und dem Menschen liegen diese Gene in mehreren Paraloga vor (in der Maus sind es fünf Gene), wohingegen in *Drosophila* nur ein einziges Gen existiert. Aus *Cupiennius* konnte ein Fragment mit großer Ähnlichkeit zu *AP-2* isoliert werden. In der phylogenetischen Analyse bilden die *AP-2* Gene aus *Cupiennius*, *Anopheles* und *Drosophila* eine gut unterstützte

Gruppierung, die von den Genen aus Vertebraten deutlich getrennt werden kann (reliability value = 80; Abb. 3.47).

*Cs-AP-2* ist im Gehirn exprimiert. Zunächst zeigt sich eine Expression an den seitlichen Rändern des Kopflappens und eine punktförmige Domäne am Vorderrand (Abb. 3.48A). Diese Expressionsorte stellen nach aller Wahrscheinlichkeit die Sehzentren der Median- und Seitenaugen dar. Die Expression dort wird stetig stärker und bleibt die ganze Entwicklung über miteinander verbunden (Abb. 3.48B-D). Daneben erscheint später eine weitere Domäne im Gehirn. Etwa zehn kleinere Gruppen von Zellen in jeder Gehirnhälfte exprimieren *Cs-AP-2* (Abb. 3.48D, Sternchen). Auf Grund der Lage dieser Zellen unmittelbar vor den Cheliceren und direkt hinter den Sehzentren der Medianaugen, handelt es sich bei ihnen mit großer Wahrscheinlichkeit um die Anlage des sog. Zentralkörpers (Babu und Barth, 1984). Des Weiteren ist *Cs-AP-2* in den Spinnwarzen exprimiert (Abb. 3.48E).

Die Expression in den prosomalen Gliedmaßen beginnt als Ring um die Basis der Extremitätenknospen (Abb. 3.49A,B), der sich in der Folge verstärkt und verbreitert (Abb. 3.49C,D). In der Chelicere ist dieser Ring stets schwach exprimiert und bleibt über weite Strecken der Entwicklung erhalten (Abb. 3.50A-D). Etwa ab 170 hnE teilt sich der Ring in der Chelicere in getrennte Expressionsflecken unbekannter Bedeutung auf (Abb. 3.51A-C). Im Pedipalpus und in den Laufbeinen gerät der Expressionsring weiter nach distal und beginnt sich aufzuspalten (Abb. 3.50E-H, I-L). Dieser Vorgang benötigt im Pedipalpus etwas mehr Zeit als in den Beinen. Gleichzeitig bilden sich de novo ein neuer Ring proximal des ursprünglichen Rings und eine punktförmige Expressionsdomäne im ventralen Bereich der Coxa von Pedipalpus und Laufbeinen.

Im Pedipalpus spielen sich danach noch folgende weitere Veränderungen des Expressionsmusters von *Cs-AP-2* ab. Der de novo entstandene proximale Ring verbreitert sich, nimmt gleichzeitig an Expressionsstärke ab und teilt sich unvollständig in zwei verschwommene Ringe (Abb. 3.51D-F, Sternchen). Der mittlere Ring, der selbst aus der Teilung des ursprünglichen Rings hervorgegangen ist, verbreitert sich und teilt sich erneut in einen starken distalen und einen sehr schwachen proximalen Ring (Abb. 3.51D-E, konzentrische Kreise). Schließlich bildet auch die ventrale Domäne in der Coxa einen Ring um die Basis des herauswachsenden Gnathenditen (Abb. 3.51D-F, Pfeil). Auch in den Laufbeinen zeigt sich ein sehr dynamisches Muster. Der proximale Ring wird ebenfalls schwächer und teilt sich auf (Abb. 3.51G-I, Sternchen), ebenso wie der mittlere Ring, der sich in einen schwachen und einen starken Teil spaltet (Abb. 3.51G-H, konzentrische



Kreise). Anders als im Pedipalpus ändert sich die ventrale Expression in der Coxa nicht, da hier kein Endit entsteht (Abb. 3.51G-H, Pfeil). Allerdings teilt sich im Bein auch der distale Ring nochmals in zwei unvollständig getrennte, neue Ringe auf (Abb. 3.51G-H, Kreis). Somit sind also im Bein alle vier (im Pedipalpus alle drei) distalen Ringe durch Aufspaltung aus einem einzigen Vorläufer hervorgegangen. Im Gegensatz zu den bisher betrachteten Genen gibt es also im Expressionsmuster von *Cs-AP-2* nur einen Ring (den proximalen Ring) der de novo erscheint.

### *Die Expression von nubbin in Cupiennius salei*

Das Gen *Cs-nub* (= *Cs-pdm*) ist bereits zuvor isoliert und untersucht worden (Damen et al. 2002). Auch in diesem Fall soll hier speziell nur die Expression während der Extremitätenentwicklung betrachtet werden. In den Extremitätenknospen ist *Cs-nub* zunächst ubiquitär exprimiert (Abb. 3.52A,B). In der Chelicere bleibt die Expression während der gesamten Entwicklung diffus und ohne erkennbares Muster (Abb. 3.53A-C, 3.54A-F). In den Beinen und im Pedipalpus weicht die Expression jedoch in der Folge distal zurück (Abb. 3.53D,G) und löst sich in ein Muster aus Ringen auf (Abb. 3.53E,F,H,I). Im Pedipalpus gibt es nur zwei Ringe, wovon der distale relativ schwach exprimiert ist. Im Bein finden sich drei Ringe. Hier ist der mittlere schwächer exprimiert als die übrigen zwei. Sowohl im Pedipalpus als auch in den Laufbeinen bildet sich im weiteren Verlauf ein neuer Ring etwas distal vom schwach exprimierten Ring (= distaler Ring im Pedipalpus, mittlerer Ring im Bein). Dieser zusätzliche Ring (in Abb. 3.54G-L, M-R mit 2' bezeichnet) erscheint zuerst als diffuse, wolkenförmige Expression, wird dann aber dorsal deutlicher und bildet schließlich einen vollständig um die Gliedmaße verlaufenden Ring. Im Bein (und etwas weniger offensichtlich auch im Pedipalpus) wird in dem gleichen Maß, in dem der neue Ring 2' stärker wird, der mit 2 bezeichnete Ring schwächer (Abb. 3.54P-R, J-L). Etwa ab 185 hnE erscheint zusätzlich ein recht undeutlicher Ring auf der Höhe des zukünftigen Trochanters (Abb. 3.54J-L, P-R, Pfeilkopf). Der distale Ring im Bein (Ring 3 in Abb. 3.54) ist durchweg der am stärksten exprimierte Ring des Expressionsmusters, selbst noch bei etwa 230 hnE, wenn die Expressionsstärke von *Cs-nub* insgesamt nachzulassen scheint. Ein vergleichbarer Ring fehlt im Pedipalpus völlig, was dazu führt, daß dem Pedipalpus im Bereich der Tibia und des Tarsus zunächst jede Expression von *Cs-nub* fehlt. Offenbar um das auszugleichen

erscheint etwa nach 185 hnE de novo ein sehr schwach exprimierter distaler Ring, der sich an der Grenze zwischen Tibia und Tarsus befindet (Abb. 3.54J-L, Pfeil).

### *Die Expression von odd-skipped in Cupiennius salei*

In *Drosophila* existiert eine kleine Gruppe sehr ähnlicher C2H2 Zinkfingerene, die alle in den Beinimaginalscheiben exprimiert sind und, wie jüngste Untersuchungen zeigen, eine Rolle bei der Gelenkbildung spielen (Hao et al., 2003; de Celis Ibeas und Bray, 2003). Bei diesen Genen handelt es sich um *odd-skipped* (*odd*), *brother of odd with entrails limited* (*bowl*), *sister of odd and bowl* (*sob*) und *drumstick* (*drm*; auch bekannt als *abnormal leg pattern* (*alp*; Wimmer, 1991)), die zusammenfassend als *odd-skipped*-Familie bezeichnet werden. Auch aus *Cupiennius* konnten drei verschiedene Fragmente mit großer Ähnlichkeit zur *odd-skipped*-Familie isoliert werden; sie werden als *Cs-odd-1*, *Cs-odd-2* und *Cs-odd-3* bezeichnet. Die phylogenetische Analyse zeigt, daß die verschiedenen Gene der *odd-skipped*-Familie nach Arten getrennt im Baum erscheinen und somit wohl das Ergebnis unabhängiger Duplikationen sind (Abb. 3.55).

Für das Gen *Cs-odd-3* konnte kein reproduzierbares Expressionsmuster nachgewiesen werden. Das Fragment stellt daher möglicherweise ein PCR-Artefakt dar und bedarf noch der Überprüfung seiner Echtheit (Versuche noch nicht durchgeführt). Das Gen *Cs-odd-2* ist in den Extremitäten exprimiert, allerdings nur in einem Ring im distalen Bereich der Beine und Pedipalpen (Daten nicht gezeigt). Für die vorliegende Arbeit wurde lediglich das Gen *Cs-odd-1* genauer untersucht, da es in segmentalen Ringen im Bein exprimiert ist und somit vom Expressionsmuster den Genen aus *Drosophila* am ähnlichsten ist und am ehesten für einen Vergleich zwischen diesen Arten in Frage kommt.

*Cs-odd-1* ist im Labrum und in den sich bildenden Segmenten der Wachstumszone in Streifen exprimiert (Daten nicht gezeigt). Letzteres erinnert an andere Segmentierungsgene (z.B. Damen et al., 2000; Damen, 2002) und ähnelt auch dem segmentalen Expressionsmuster in *Drosophila* (Coulter et al., 1990). In älteren Segmenten in *Cupiennius* erscheint *Cs-odd-1* jedoch auf die dorsalen Gewebeanteile beschränkt zu sein (Daten nicht gezeigt). In den Beinknospen bei etwa 100-105 hnE ist *Cs-odd-1* in einem proximalen Ring um die Basis der Knospen exprimiert (Abb. 3.56A,B, gefüllter Kreis). Kurz darauf erscheint dorsal eine diffuse Expression (Abb. 3.56C), die sich zu einem Streifen verdichtet (Abb. 3.56D). Daraufhin bildet sich auch ventral eine diffuse

Expression (Abb. 3.56E), die sich zu einem Streifen verdichtet, so daß sich nun ein vollständiger Ring gebildet hat (Abb. 3.56F, Sternchen). Dieser Ring entfernt sich von der proximalen Expression, während diese ihrerseits ebenfalls ihre Lage nach distal verändert (Abb. 3.56G). Dies setzt sich im weiteren Verlauf der Entwicklung fort, so daß der proximale Ring deutlich oberhalb der Beinwurzel liegt und der zweite Ring immer weiter vom proximaleren Ring entfernt ist (Abb. 3.57E,F). An der Beinwurzel nimmt nun ein neu entstehender Ring den Platz des vormals dort gelegenen proximalen Rings ein (Abb. 3.57F, Raute) und an der Beinspitze entsteht ein neuer Ring (Abb. 3.57F, Sonne). Etwa nach 160 hnE entstehen de novo und zeitgleich zwei distale Ringe (Abb. 3.58I, Pfeilköpfe). Kurz darauf erscheint auch auf der Höhe des zukünftigen Trochanters de novo ein Expressionsring (Abb. 3.58J, Dreieck). Außerdem beginnt der stark exprimierte zentrale Ring sich aufzuspalten (Abb. 3.58J, Sternchen). Diese Dynamik im Expressionsprofil von *Cs-odd-1* führt schließlich dazu, daß an jedem Gelenk ein Expressionsring zu liegen kommt (Abb. 3.58K,L). Ganz spät erscheint ein weiterer Ring ganz distal, dessen Bedeutung und Relation zu morphologischen Strukturen jedoch unklar ist (Abb. 3.58L, Pfeil).

Das Expressionsprofil im Pedipalpus ist nahezu identisch mit dem gerade für die Laufbeine beschriebenen Profil (Abb. 3.57C,D, 3.58E-H). Der einzige Unterschied betrifft die de novo Bildung distaler Ringe um etwa 160 hnE. Hier entsteht im Pedipalpus nur ein einziger Ring (Abb. 3.58E, Pfeilkopf), während im Laufbein zwei Ringe entstehen (Abb. 3.58I, Pfeilköpfe). In der Chelicere bildet sich um die Klauenanlage herum ein Ring, der durchweg erhalten bleibt (Abb. 3.57A,B, 3.58A-D); dazu zeigt sich eine schwächere proximale Expressionsdomäne.

### **Abbildung 3.38**

Expression von *Cs-N* in den Gliedmaßen von *Cupiennius*. (A-E) Chelicere, (F-J) Pedipalpus und (K-O) Laufbein bei jeweils etwa 150, 170, 180, 200, 230 hnE (spaltenweise von links nach rechts). Der Pfeil und das Sternchen in F und K deuten auf die ersten zwei Ringe im Muster von *Cs-N*. Im Pedipalpus bleiben sie erhalten (Pfeil und Sternchen in G-J). Im Bein kommt noch ein weiterer distaler Ring dazu (zwei Sternchen in L-O). Außerdem kommen in beiden Gliedmaßentypen später noch zwei weitere Expressionsringe hinzu (Pfeilköpfe in I,J und N,O). Abkürzungen: siehe Abkürzungsverzeichnis S. 2-5.

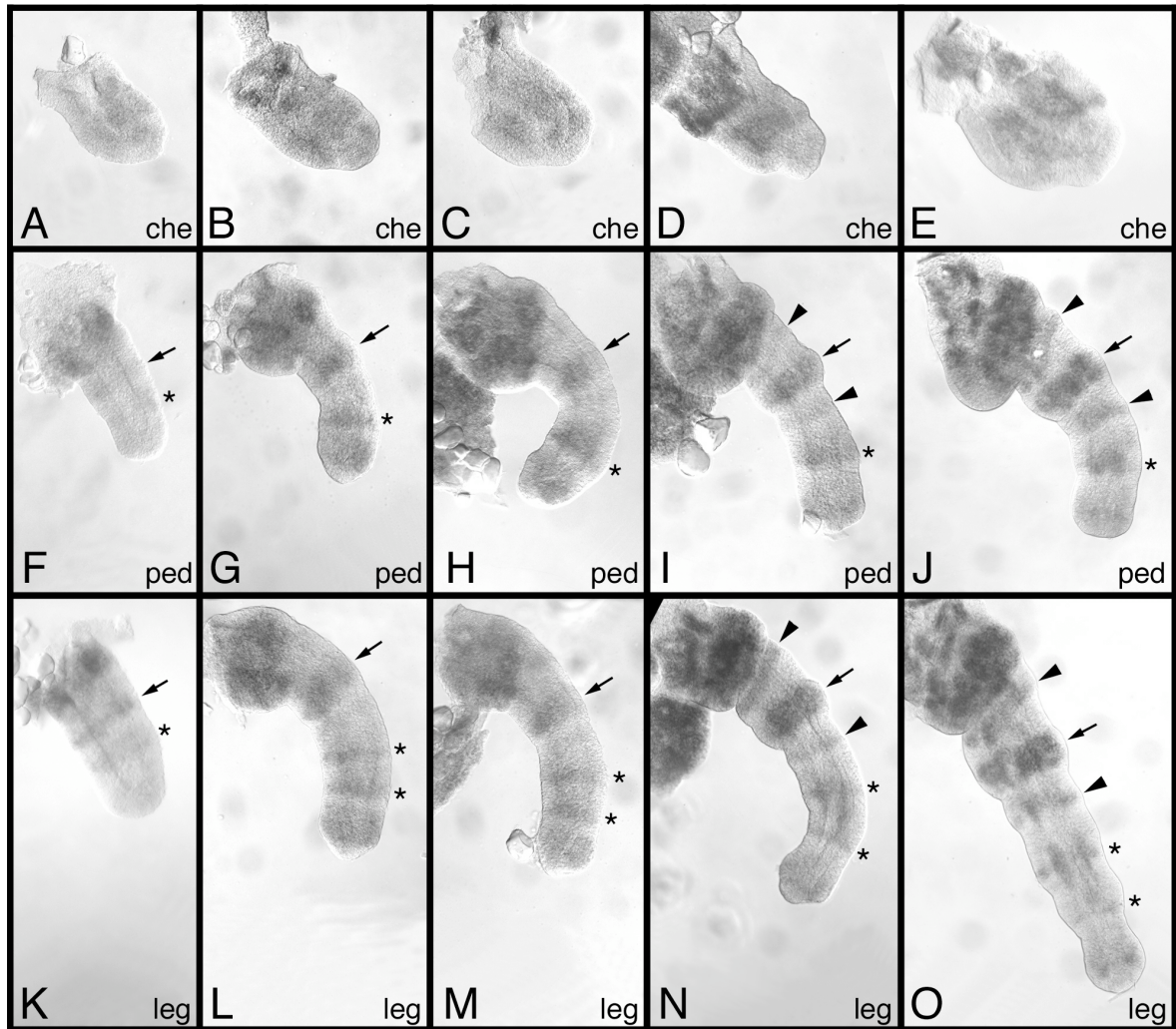


Abb. 3.38

### **Abbildung 3.39**

Phylogenetische Analyse der DSL (*Delta-Serrate-Lag*) Proteine aus der Maus, *Caenorhabditis elegans* und verschiedenen Arthropodenarten. Dargestellt ist das ungewurzelte majority-rule Konsensusphylogramm, das aus 1000 Zwischenbäumen errechnet wurde, die mit der Quartet Puzzling Methode nach Strimmer und von Haeseler (1996) erzeugt wurden. Die Zahlen an den Kanten geben die sog. reliability values an. Abkürzungen: siehe Abkürzungsverzeichnis S. 2-5.

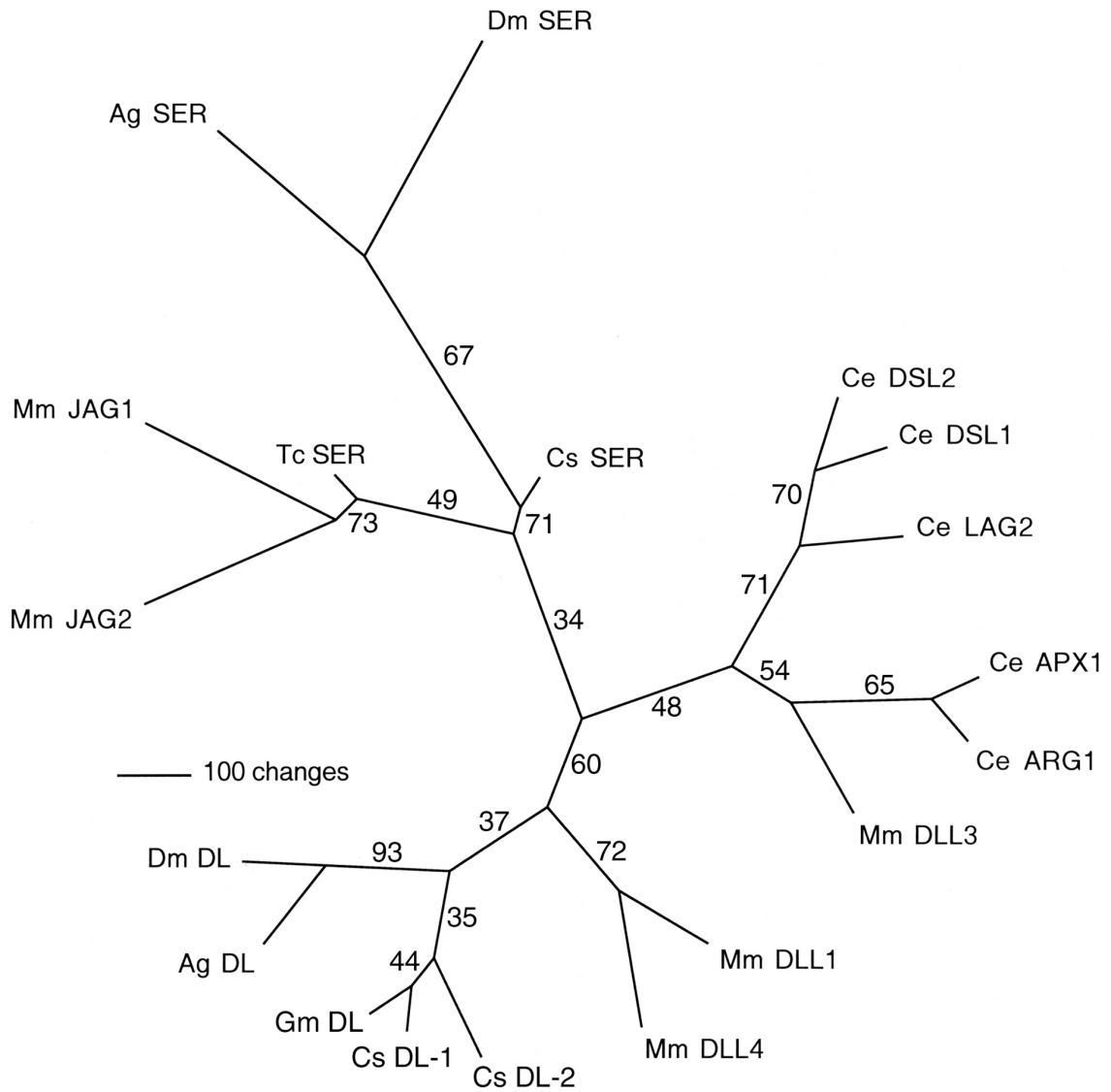


Abb. 3.39

### **Abbildung 3.40**

Expression von *Cs-Ser* in den Gliedmaßen von *Cupiennius*. (A-C) Chelicere, (D-F) Pedipalpus und (G-I) Laufbein bei jeweils etwa 100, 140, 150 hnE (spaltenweise von links nach rechts). Die Pfeile deuten auf sukzessive erscheinende Ringe verstärkter Expression von *Cs-Ser*. Im Pedipalpus liegen bei 150 hnE zwei Ringe vor, im Laufbein sind es dagegen drei Ringe. Abkürzungen: siehe Abkürzungsverzeichnis S. 2-5.

### **Abbildung 3.41**

Expression von *Cs-Ser* in den Gliedmaßen von *Cupiennius*. (A-C) Chelicere, (D-F) Pedipalpus und (G-I) Laufbein bei jeweils etwa 165, 175, 180 hnE (spaltenweise von links nach rechts). Zusätzlich zu den bereits existierenden Ringen (siehe Abb. 3.40) erscheinen im Pedipalpus und im Laufbein zusätzliche Ringe (Pfeil bzw. Pfeilkopf). Abkürzungen: siehe Abkürzungsverzeichnis S. 2-5.



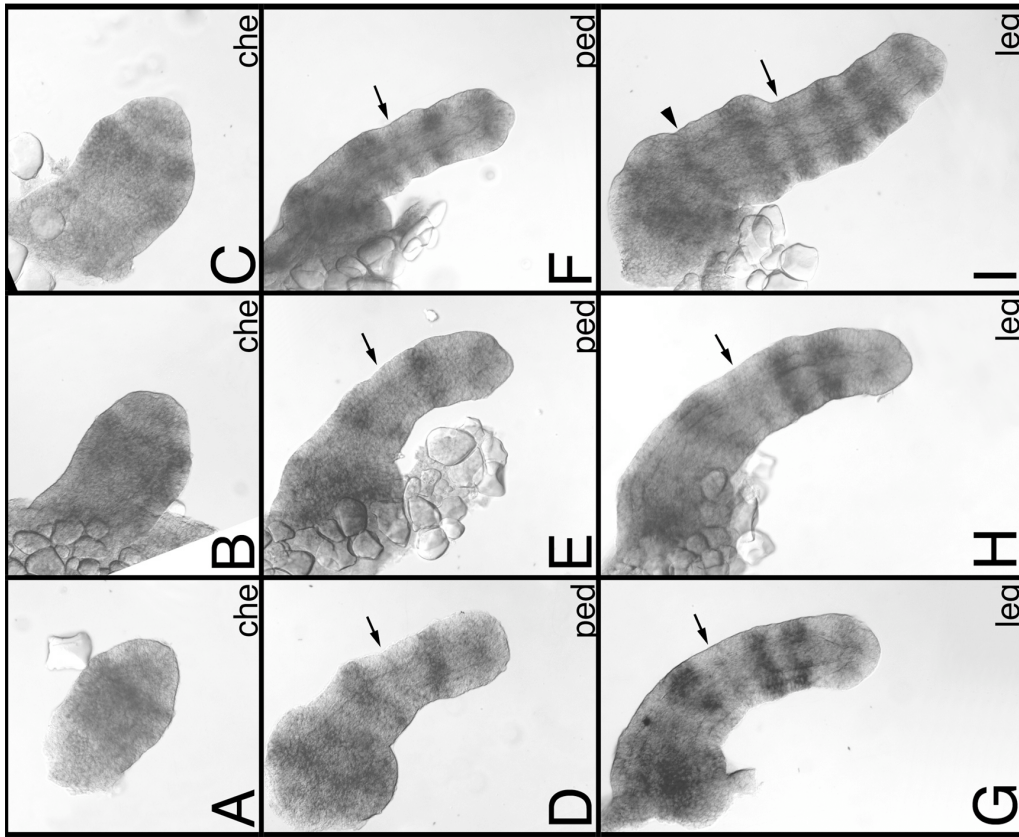


Abb. 3.41

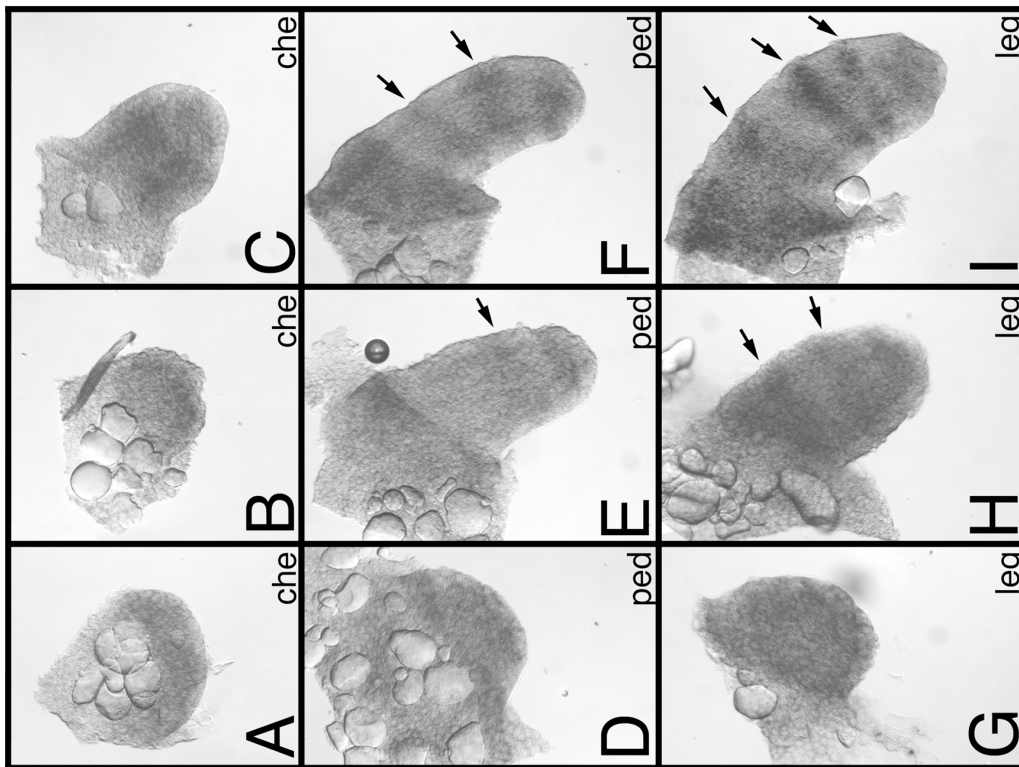


Abb. 3.40

### **Abbildung 3.42**

Expression von *Cs-Ser* in den Gliedmaßen von *Cupiennius*. (A-C) Chelicere, (D-F) Pedipalpus und (G-I) Laufbein bei jeweils etwa 185, 195, 230 hnE (spaltenweise von links nach rechts). Innerhalb der Ringe stärkerer Expression erscheinen kleine Zellgruppen mit nochmals gesteigerter Expression (siehe Pfeilköpfe). Im Laufbein ist die Aufspaltung des distalen Rings (Pfeil in G) in zwei neue Ringe zu beobachten (Pfeile in H,I). Abkürzungen: siehe Abkürzungsverzeichnis S. 2-5.

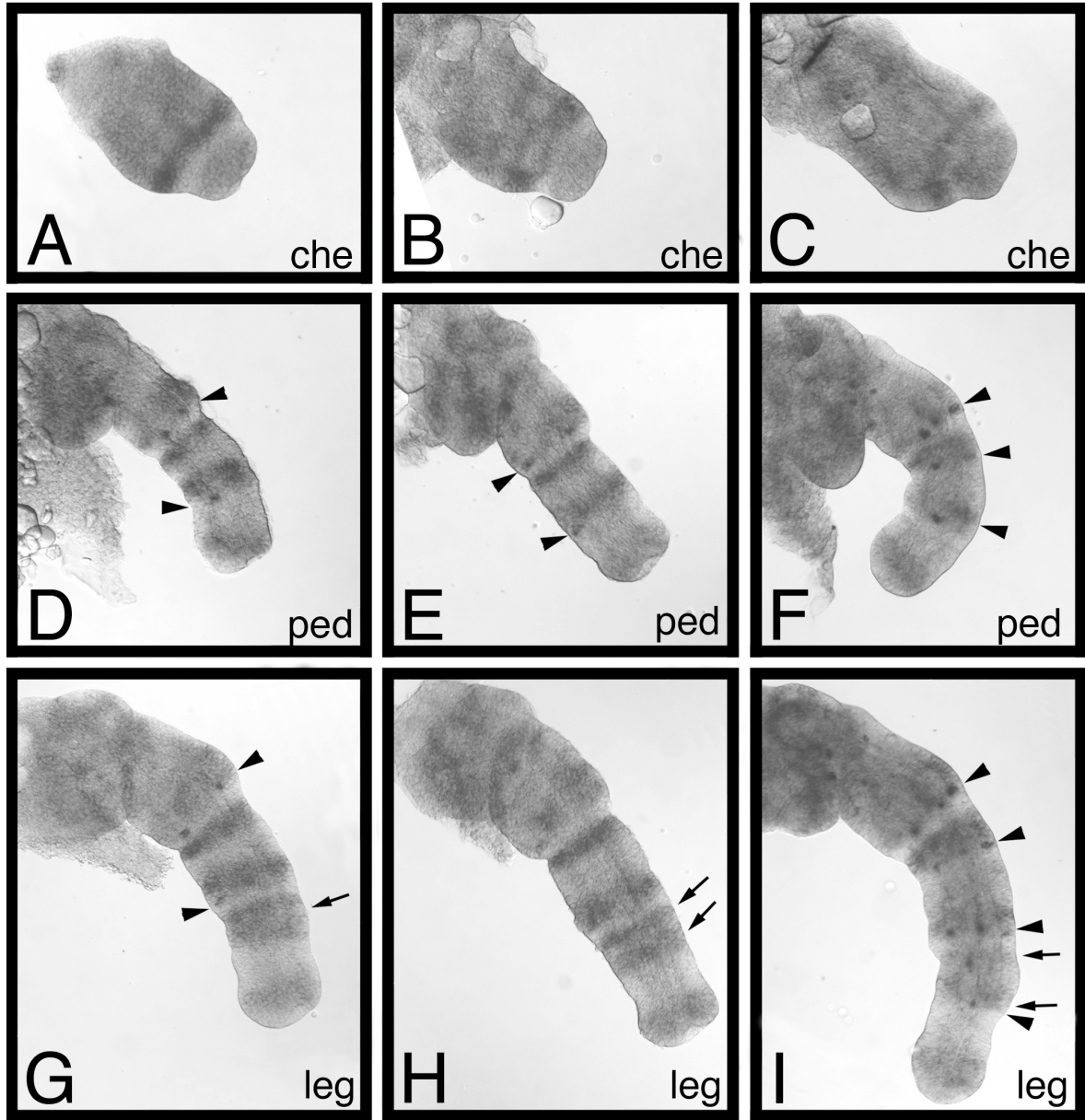


Abb. 3.42

### **Abbildung 3.43**

Phylogenetische Analyse der bHLH Proteine aus der *hairy*-Gruppe (alle 13 Gene im Genom von *Drosophila*) und des *Cs-hairy* Proteins. Dargestellt ist das ungewurzelte majority-rule Konsensusphylogramm, das aus 1000 Zwischenbäumen errechnet wurde, die mit der Quartet Puzzling Methode nach Strimmer und von Haeseler (1996) erzeugt wurden. Die Zahlen an den Kanten geben die sog. reliability values an. Abkürzungen: siehe Abkürzungsverzeichnis S. 2-5.

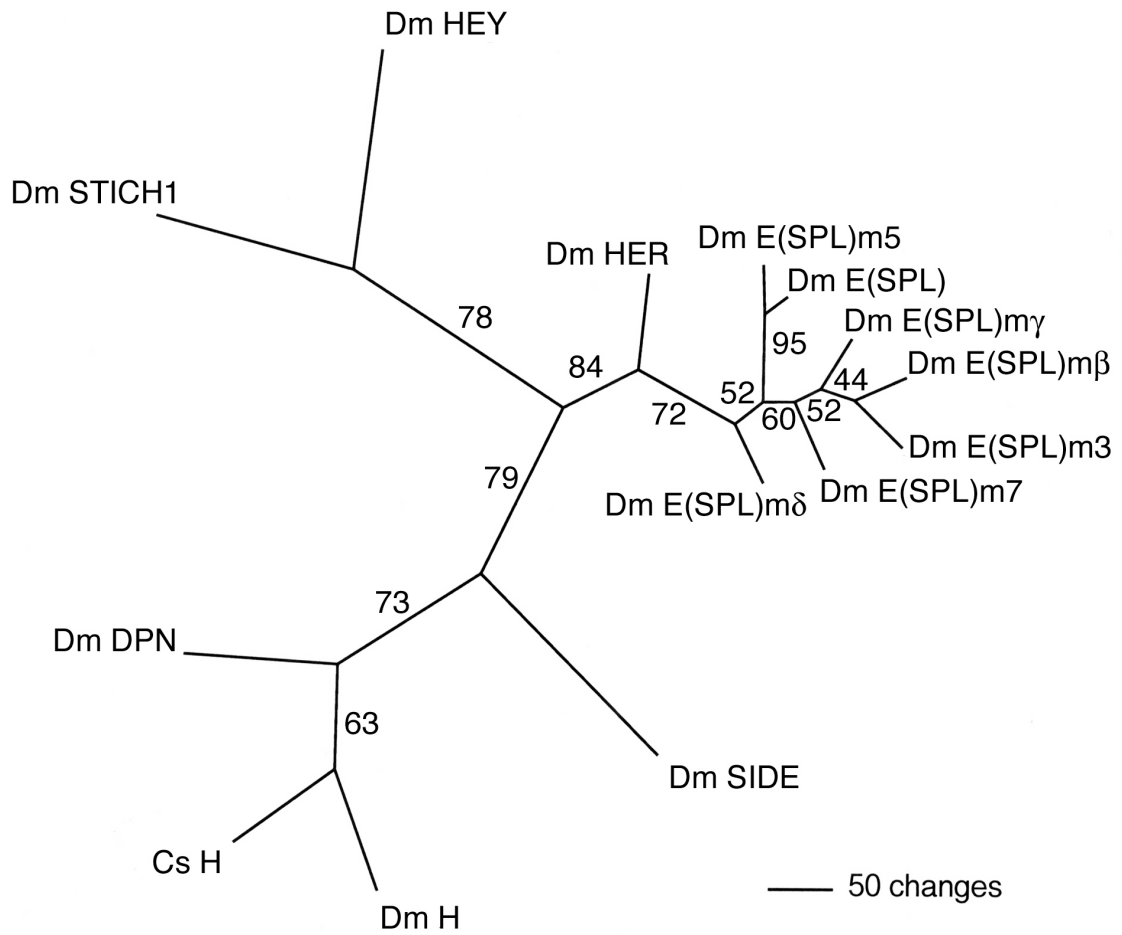


Abb. 3.43

### **Abbildung 3.44**

Expression von *Cs-h* in *Cupiennius* Embryonen. (A) Embryo bei etwa 90 hnE in leicht schräger Seitenlage. In den Anlagen der Extremitätenknospen ist eine schwache Expression von *Cs-h* zu beobachten. (B) Embryo bei etwa 100 hnE in leicht schräger Seitenlage. Expression von *Cs-h* umgibt die Extremitätenknospen an der Basis. Abkürzungen: siehe Abkürzungsverzeichnis S. 2-5.

### **Abbildung 3.45**

Expression von *Cs-h* in den Gliedmaßen von *Cupiennius*. (A-C) Chelicere, (D-F) Pedipalpus und (G-I) Laufbein bei jeweils etwa 140, 145, 150 hnE (spaltenweise von links nach rechts). Die Ziffern bezeichnen die Expressionsringe in den Pedipalpen und Laufbeinen. Im Laufbein erscheint ab etwa 150 hnE ein vierter Ring, der im Pedipalpus fehlt. Abkürzungen: siehe Abkürzungsverzeichnis S. 2-5.

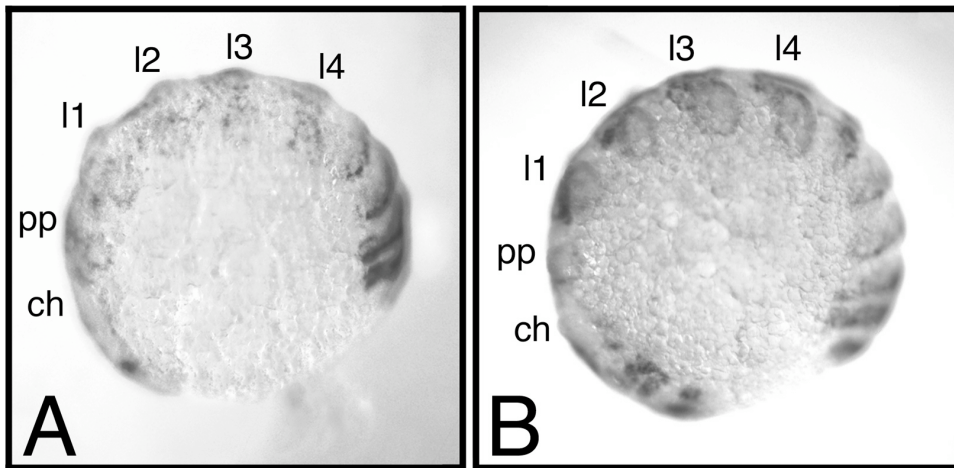


Abb. 3.44

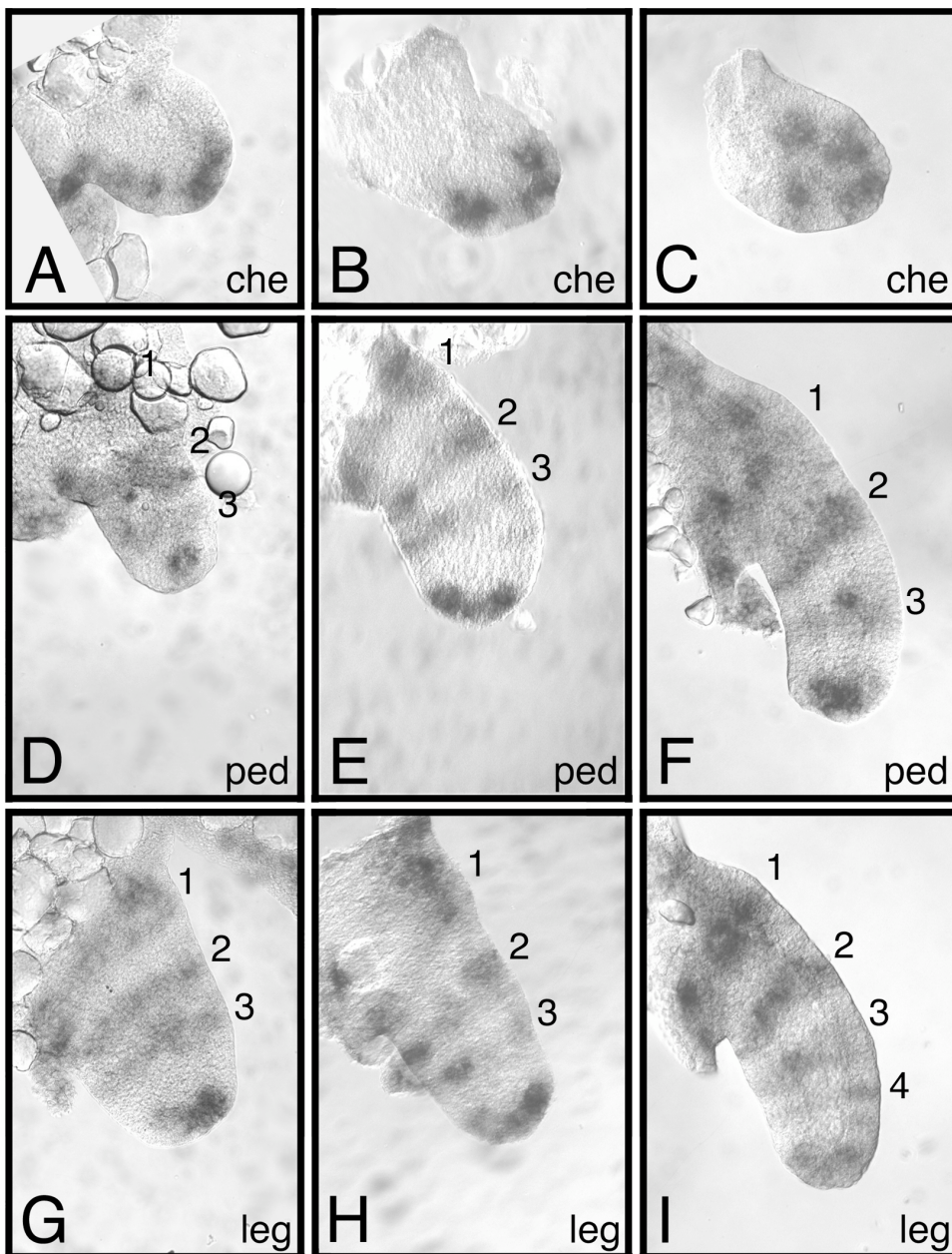


Abb. 3.45

### **Abbildung 3.46**

Expression von *Cs-h* in den Gliedmaßen von *Cupiennius*. (A-E) Chelicere, (F-J) Pedipalpus und (K-L) Laufbein bei jeweils etwa 160, 165, 175, 185, 230 hnE (spaltenweise von links nach rechts). Die Ziffern bezeichnen die Expressionsringe in den Pedipalpen und Laufbeinen (vgl. dazu auch Abb. 3.45). Im Pedipalpus und im Laufbein erscheinen ab etwa 165-175 hnE weitere Ringe auf der Höhe des Trochanters und der Patella (diese de novo erscheinenden Ringe sind mit Pfeilen gekennzeichnet). Abkürzungen: siehe Abkürzungsverzeichnis S. 2-5.



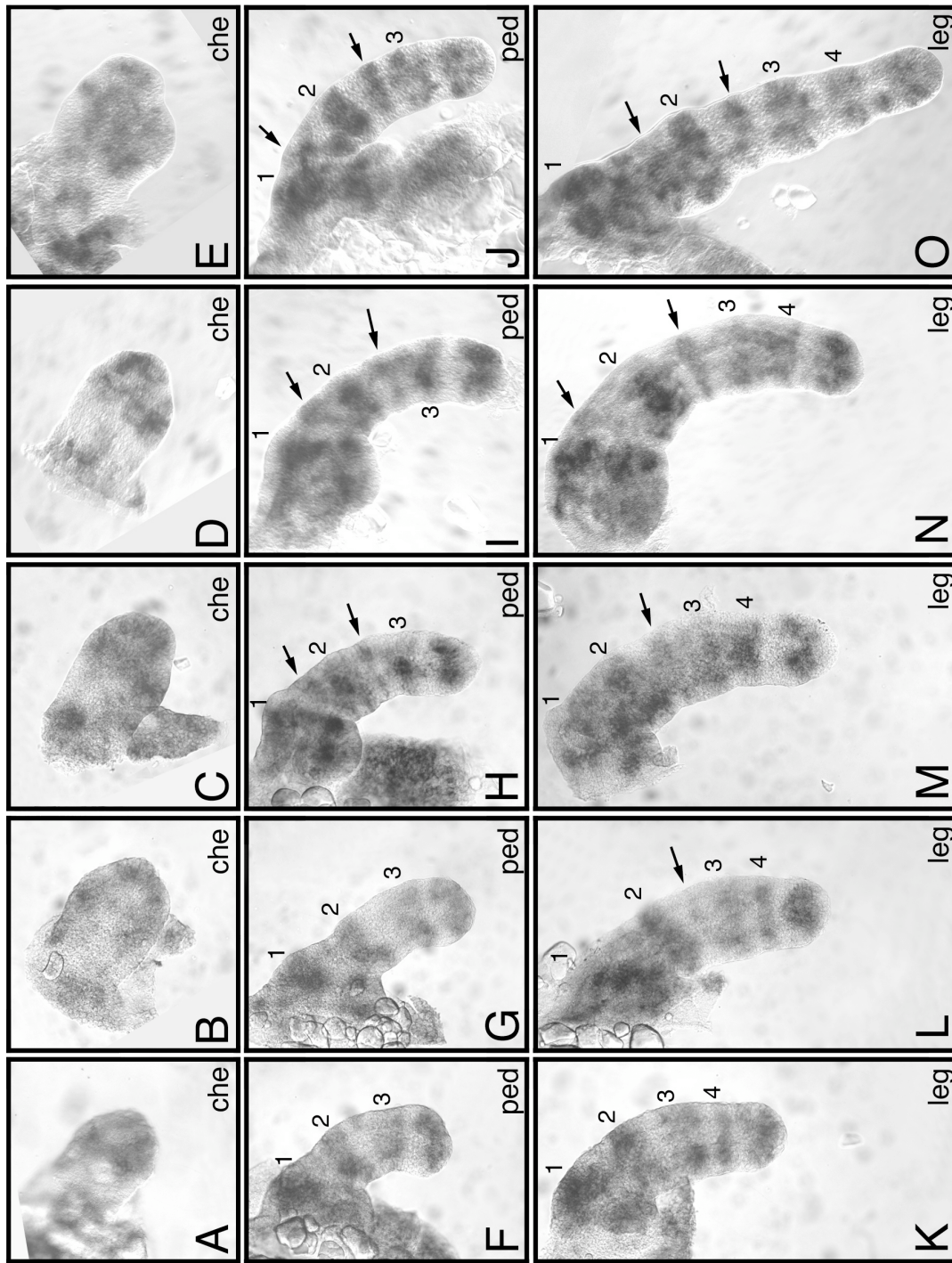


Abb. 3.46

### **Abbildung 3.47**

Phylogenetische Analyse der AP-2 Proteine aus der Maus, dem Krallenfrosch, aus *Caenorhabditis elegans* und aus diversen Arthropodenarten. Dargestellt ist das ungewurzelte majority-rule Konsensusphylogramm, das aus 1000 Zwischenbäumen errechnet wurde, die mit der Quartet Puzzling Methode nach Strimmer und von Haeseler (1996) erzeugt wurden. Die Zahlen an den Kanten geben die sog. reliability values an. Abkürzungen: siehe Abkürzungsverzeichnis S. 2-5.

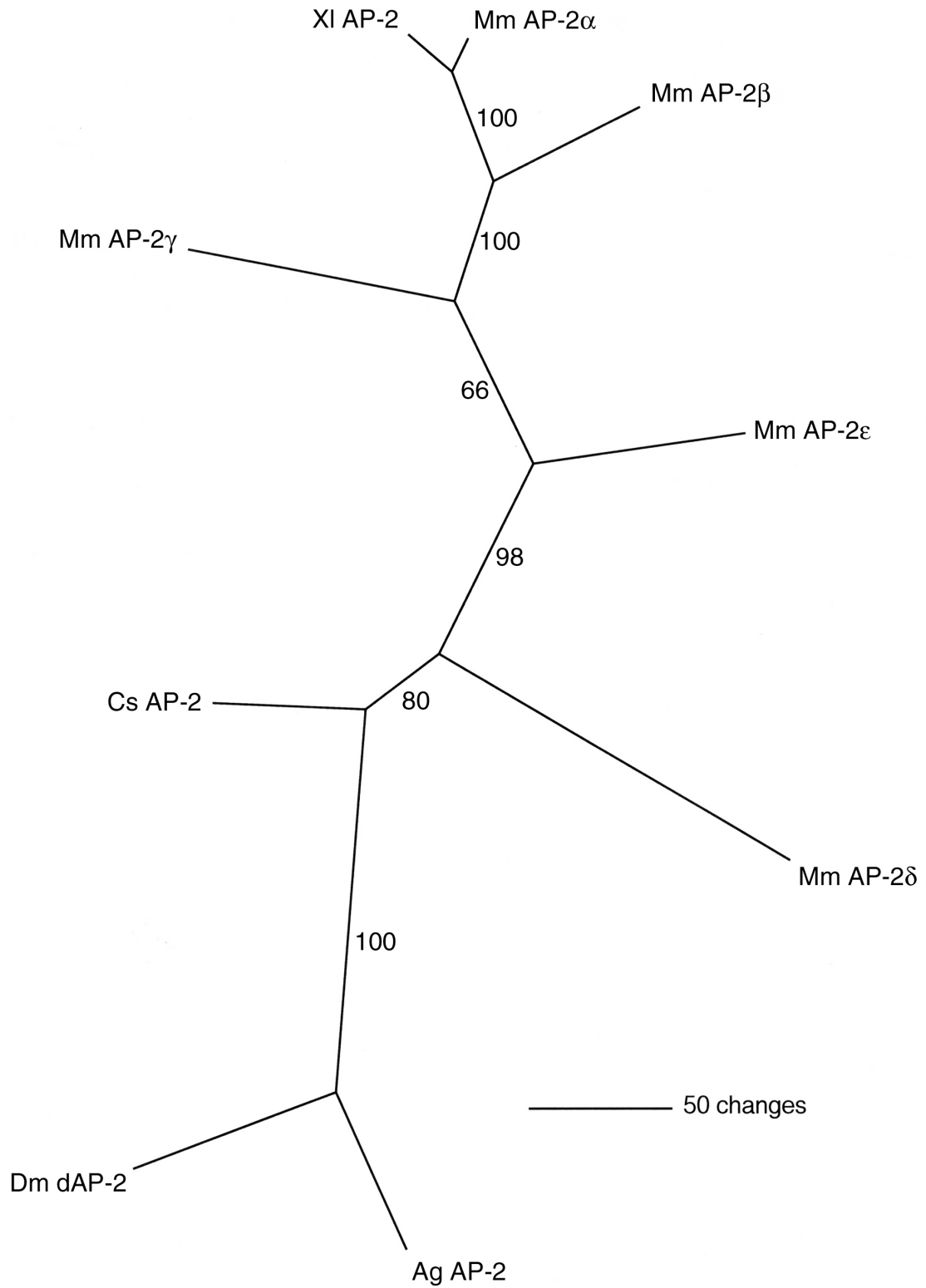


Abb. 3.47

### Abbildung 3.48

Expression von *Cs-AP-2* in *Cupiennius* Embryos. (A) Embryo bei etwa 125 hnE. Ansicht des Kopfes. Neben den Gliedmaßen (siehe Abb. 3.49, 3.50, 3.51) ist *Cs-AP-2* seitlich entlang der Kopflappen exprimiert (Pfeilköpfe) und in einer kleinen Gruppe von Zellen am Vorderrand des Gehirns (Pfeile). (B,C) Embryo bei etwa 155 bzw. 175 hnE. Ansicht des Kopfes. Die Expression am Seitenrand (Pfeilköpfe) und Vorderrand (Pfeile) des Gehirns wird stetig stärker. (D) Embryo bei etwa 200 hnE. Ansicht des Kopfes. Die Expression am Vorderrand (Pfeile) liegt offenbar in den Sehzentren der Medianaugen. Die Expression am Seitenrand (Pfeilköpfe) liegt vermutlich in den Sehzentren der Seitenaugen. Zusätzlich zeigt sich Expression in einer Struktur, die auf Grund ihrer Lage möglicherweise der Zentralkörper ist (Sternchen; Babu und Barth, 1984). (E) Embryo bei etwa 200 hnE. Ansicht des Opisthosomas. *Cs-AP-2* ist auch in den Anlagen der Spinnwarzen im vierten (Pfeil) und fünften (Pfeilkopf) Opisthosomalsegment exprimiert.

### Abbildung 3.49

Expression von *Cs-AP-2* in *Cupiennius* Embryos. (A) Embryo bei etwa 100 hnE in schräger Seitenlage. (B) Detail des Embryos in A (Seitenansicht). *Cs-AP-2* ist an der Basis der Pedipalpen und Laufbeine exprimiert, fehlt aber (noch) in der Chelicere. (C) Embryo bei etwa 115 hnE in schräger Seitenlage. (D) Detail des Embryos in C (Seitenansicht). Die Expression in den Pedipalpen und Beinen wird breiter. Die Cheliceren exprimieren (noch) kein *Cs-AP-2*.  
Abkürzungen: siehe Abkürzungsverzeichnis S. 2-5.

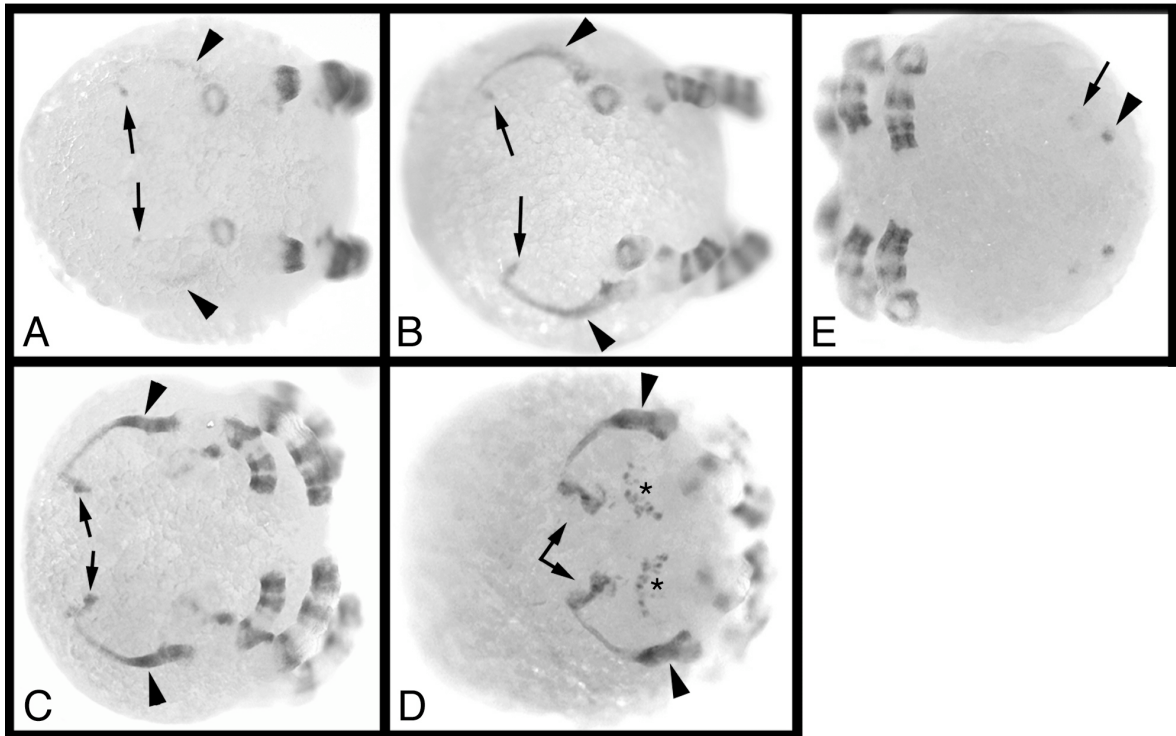


Abb. 3.48

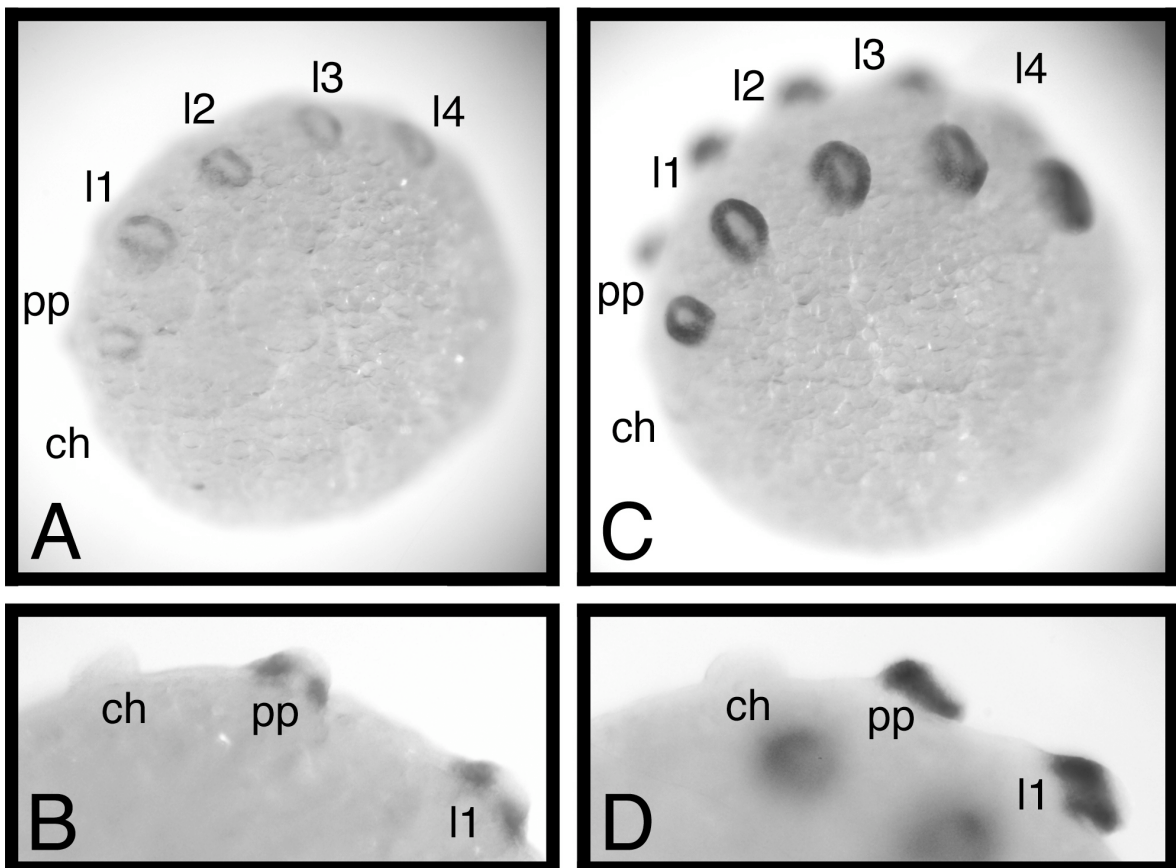


Abb. 3.49

### **Abbildung 3.50**

Expression von *Cs-AP-2* in den Gliedmaßen von *Cupiennius*. (A-D) Chelicere, (E-H) Pedipalpus und (I-L) Laufbein bei jeweils etwa 135, 140, 145, 150 hnE (spaltenweise von links nach rechts). Die Expression in der Chelicere ist stets deutlich schwächer als in den anderen Extremitäten. Die breite Domäne in den Laufbeinen und Pedipalpen (vgl. Abb. 3.49) spaltet sich auf (gefüllte Kreise) und proximal davon erscheint ein neuer Expressionsring (Stern). Außerdem erscheint eine ventrale Expressionsdomäne an der Basis der Pedipalpen und Laufbeine (Pfeile). Abkürzungen: siehe Abkürzungsverzeichnis S. 2-5.

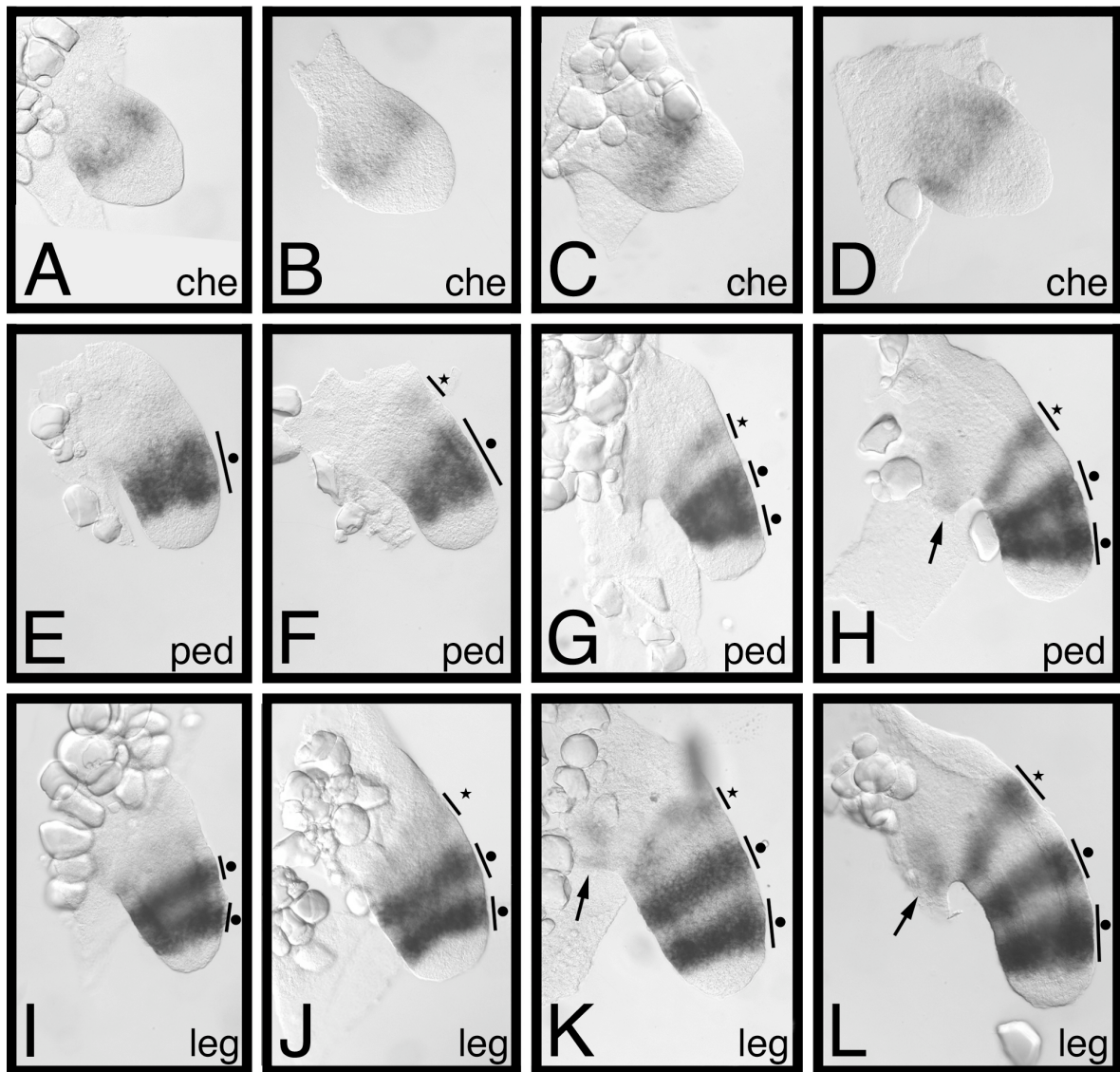


Abb. 3.50

### **Abbildung 3.51**

Expression von *Cs-AP-2* in den Gliedmaßen von *Cupiennius*. (A-C) Chelicere, (D-F) Pedipalpus und (G-I) Laufbein bei jeweils etwa 175, 200, 230 hnE (spaltenweise von links nach rechts). Das Sternchen in A-C kennzeichnet Expression im Gehirn (siehe auch Abb. 3.48). Der Pfeil in D-I deutet auf eine proximale, ventrale Expressionsdomäne. Jeder der drei bereits vorhandenen Ringe (vgl. Abb. 3.50) spaltet sich im Bein erneut auf (Sterne bzw. konzentrische Kreise bzw. Kreise). Im Pedipalpus spaltet sich dagegen der distale Ring (Kreise) nicht. Abkürzungen: siehe Abkürzungsverzeichnis S. 2-5.



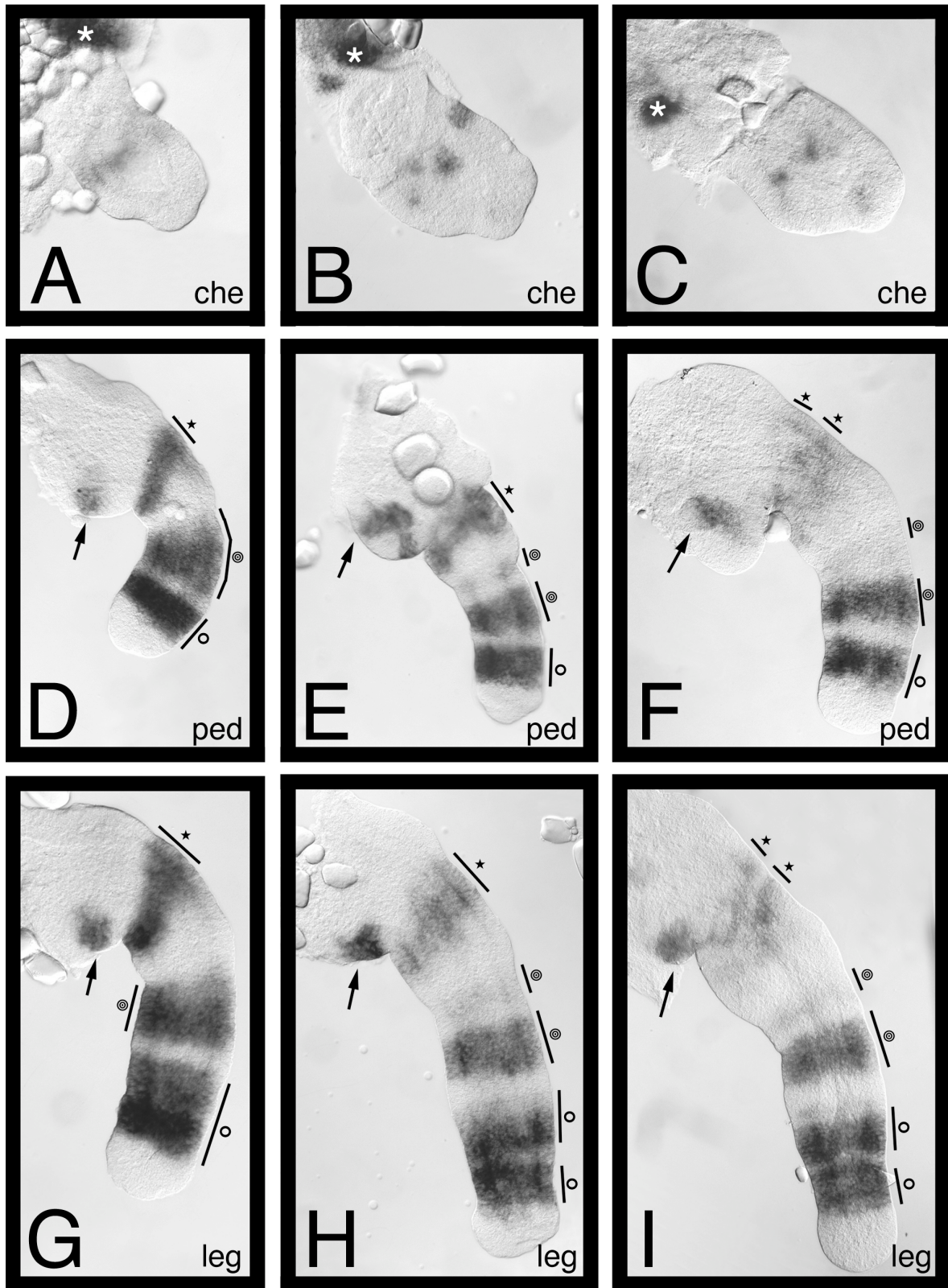


Abb. 3.51

### **Abbildung 3.52**

Expression von *Cs-nub* in *Cupiennius* Embryonen. (A) Embryo bei etwa 90 hnE in leicht schräger Seitenlage. In den Anlagen der Extremitätenknospen ist eine Expression von *Cs-nub* zu beobachten. (B) Embryo bei etwa 110 hnE in leicht schräger Seitenlage. Expression von *Cs-nub* füllt die Extremitätenknospen aus. Abkürzungen: siehe Abkürzungsverzeichnis S. 2-5.

### **Abbildung 3.53**

Expression von *Cs-nub* in den Gliedmaßen von *Cupiennius*. (A-C) Chelicere, (D-F) Pedipalpus und (G-I) Laufbein bei jeweils etwa 140, 145, 150 hnE (spaltenweise von links nach rechts). Die Ziffern bezeichnen die Expressionsringe in den Pedipalpen und Laufbeinen. Im Laufbein erscheint ab etwa 145 hnE ein dritter Ring, der im Pedipalpus fehlt. Abkürzungen: siehe Abkürzungsverzeichnis S. 2-5.

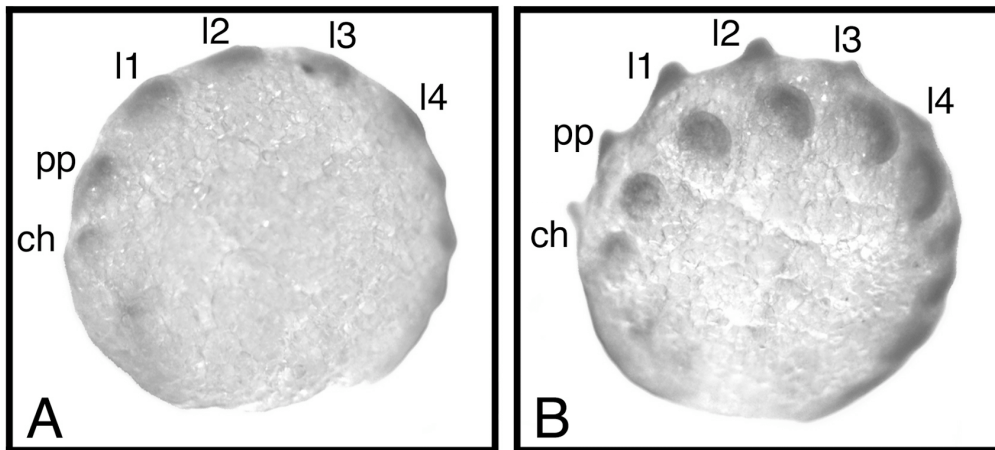


Abb. 3.52

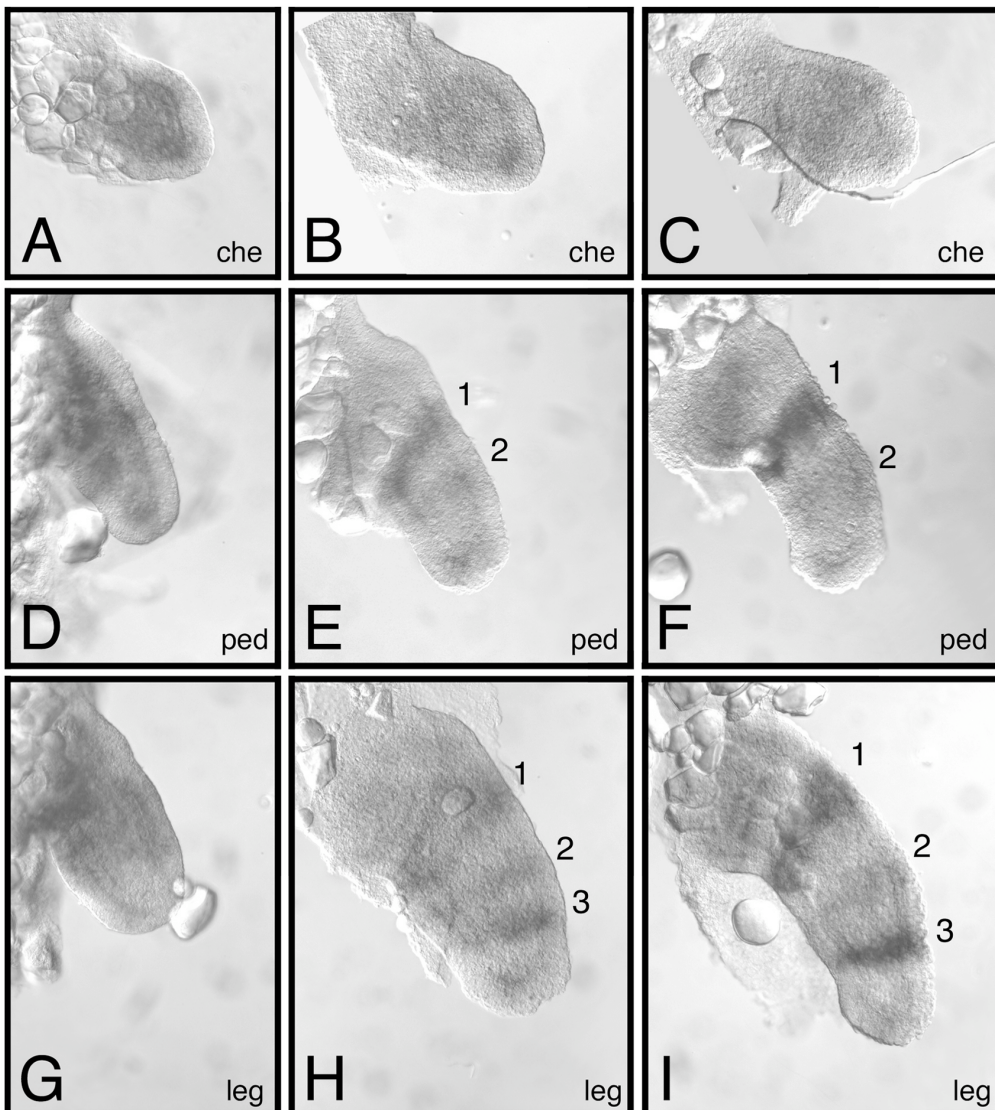


Abb. 3.53

### **Abbildung 3.54**

Expression von *Cs-nub* in den Gliedmaßen von *Cupiennius*. (A-F) Chelicere, (G-L) Pedipalpus und (M-R) Laufbein bei jeweils etwa 165, 170, 175, 185, 200, 230 hnE (spaltenweise von links nach rechts). Die Ziffern bezeichnen die Expressionsringe in den Pedipalpen und Laufbeinen (vgl. dazu auch Abb. 3.53). Im Pedipalpus und im Laufbein erscheint ab etwa 185 hnE ein sehr schwacher weiterer Ring auf der Höhe des Trochanters (Pfeilköpfe). Außerdem spaltet sich der mit der Ziffer 2 bezeichnete Ring in beiden Extremitätentypen in zwei neue Ringe (2 und 2') auf. Im Pedipalpus erscheint schließlich ab etwa 185 hnE ein schwacher distaler Ring (Pfeil in J,K,L). Abkürzungen: siehe Abkürzungsverzeichnis S. 2-5.

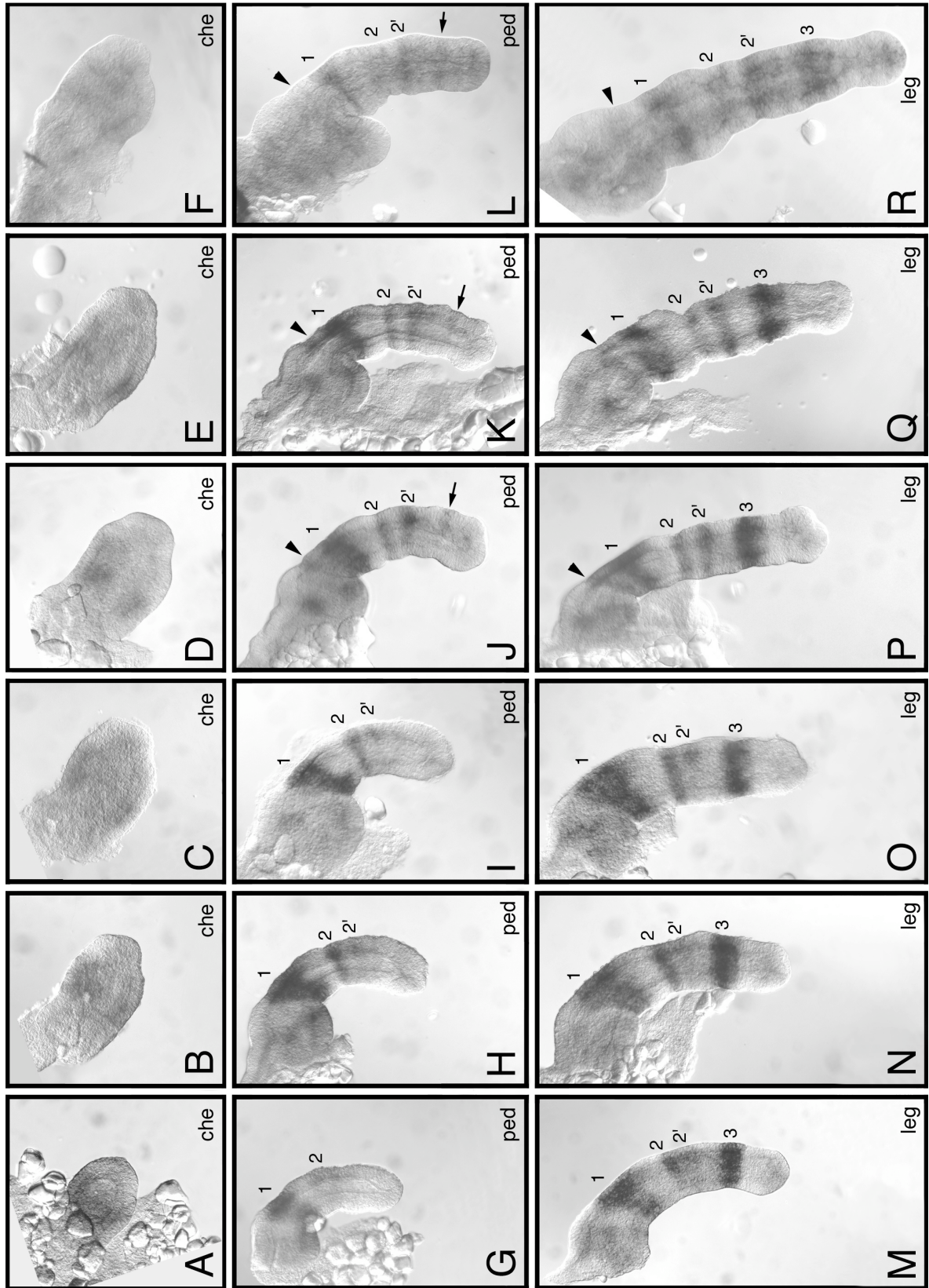


Abb. 3.54

### **Abbildung 3.55**

Phylogenetische Analyse von Proteinen der *odd-skipped* Familie aus *Drosophila*, *Cupiennius* und der Maus. Dargestellt ist das ungewurzelte majority-rule Konsensusphylogramm, das aus 1000 Zwischenbäumen errechnet wurde, die mit der Quartet Puzzling Methode nach Strimmer und von Haeseler (1996) erzeugt wurden. Die Zahlen an den Kanten geben die sog. reliability values an. Abkürzungen: siehe Abkürzungsverzeichnis S. 2-5.

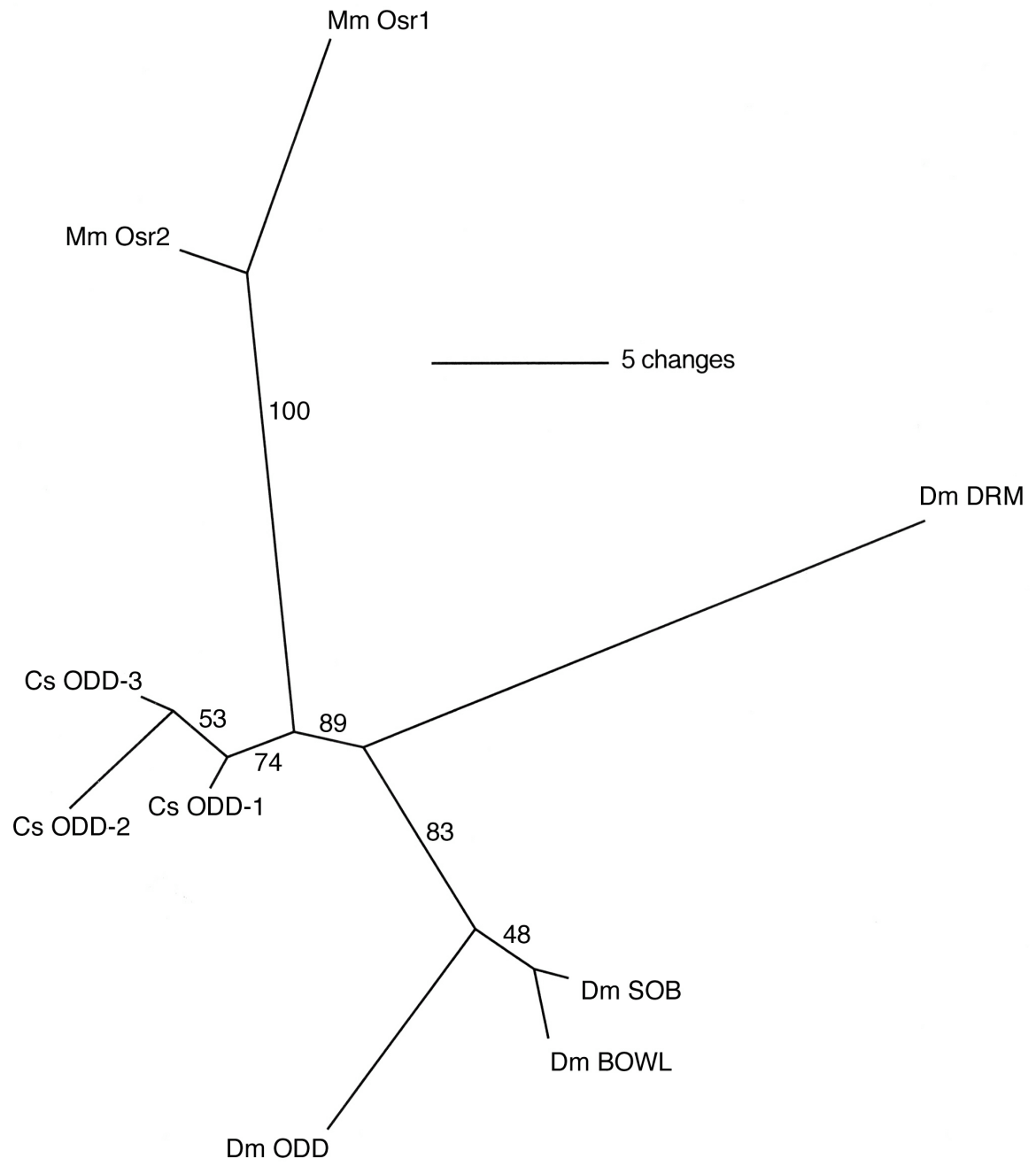


Abb. 3.55

### **Abbildung 3.56**

Expression von *Cs-odd-1* in den Laufbeinen von *Cupiennius*. (A-G) Laufbein bei etwa 100, 105, 110, 115, 120, 125, 140 hnE (von A nach G). Der gefüllte Kreis kennzeichnet den proximalen Expressionsring. Das Sternchen kennzeichnet den distal davon entstehenden Ring.

### **Abbildung 3.57**

Expression von *Cs-odd-1* in den Gliedmaßen von *Cupiennius*. (A,B) Chelicere, (C,D) Pedipalpus und (E,F) Laufbein bei jeweils etwa 145, 150 hnE (spaltenweise von links nach rechts). Zusätzlich zu den bereits existierenden Ringen (siehe Abb. 3.56; gefüllter Kreis und Sternchen) erscheinen im Pedipalpus und im Laufbein ein zusätzlicher proximaler Ring (Raute) und eine Domäne in der Extremitätenspitze (Sonne). Abkürzungen: siehe Abkürzungsverzeichnis S. 2-5.



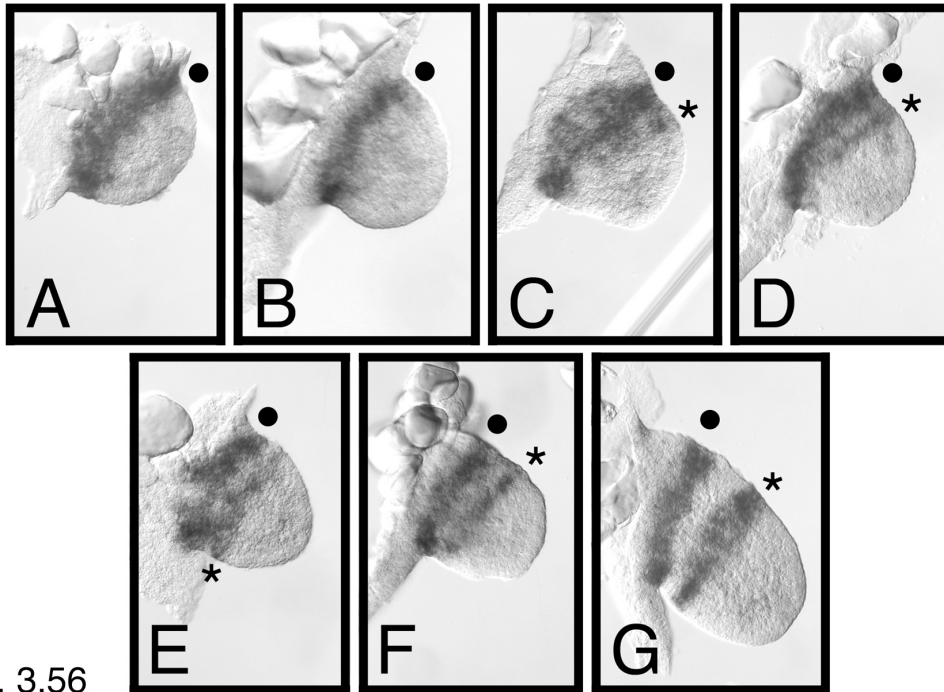


Abb. 3.56

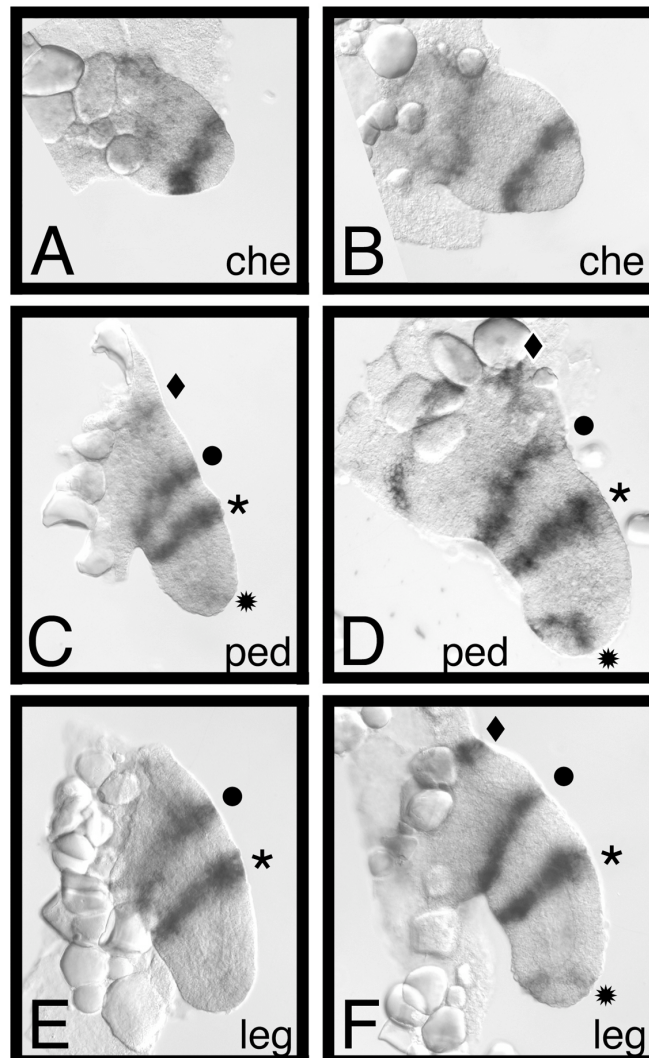


Abb. 3.57

### Abbildung 3.58

Expression von *Cs-odd-1* in den Gliedmaßen von *Cupiennius*. (A-D) Chelicere, (E-H) Pedipalpus und (I-L) Laufbein bei jeweils etwa 160, 175, 180, 230 hnE (spaltenweise von links nach rechts). Zusätzlich zu den bereits existierenden Ringen (siehe Abb. 3.56 und 3.57; gefüllter Kreis, Sternchen und Raute) erscheinen im Pedipalpus und im Laufbein zusätzliche Expressionsringe. Im Pedipalpus entsteht ein distaler Ring (Pfeilkopf) und ein Ring auf der Höhe des Trochanter (Dreieck). Im Laufbein entstehen ein Ring auf der Höhe des Trochanter (Dreieck) und zwei distale Ringe (Pfeilköpfe). Zusätzlich dazu spaltet sich der mit (\*) bezeichnete Ring im Pedipalpus und im Laufbein in zwei neue Ringe (Sternchen) und bei etwa 230 hnE kommt ganz distal ein weiterer Ring dazu (Pfeil in H,L). Abkürzungen: siehe Abkürzungsverzeichnis S. 2-5.

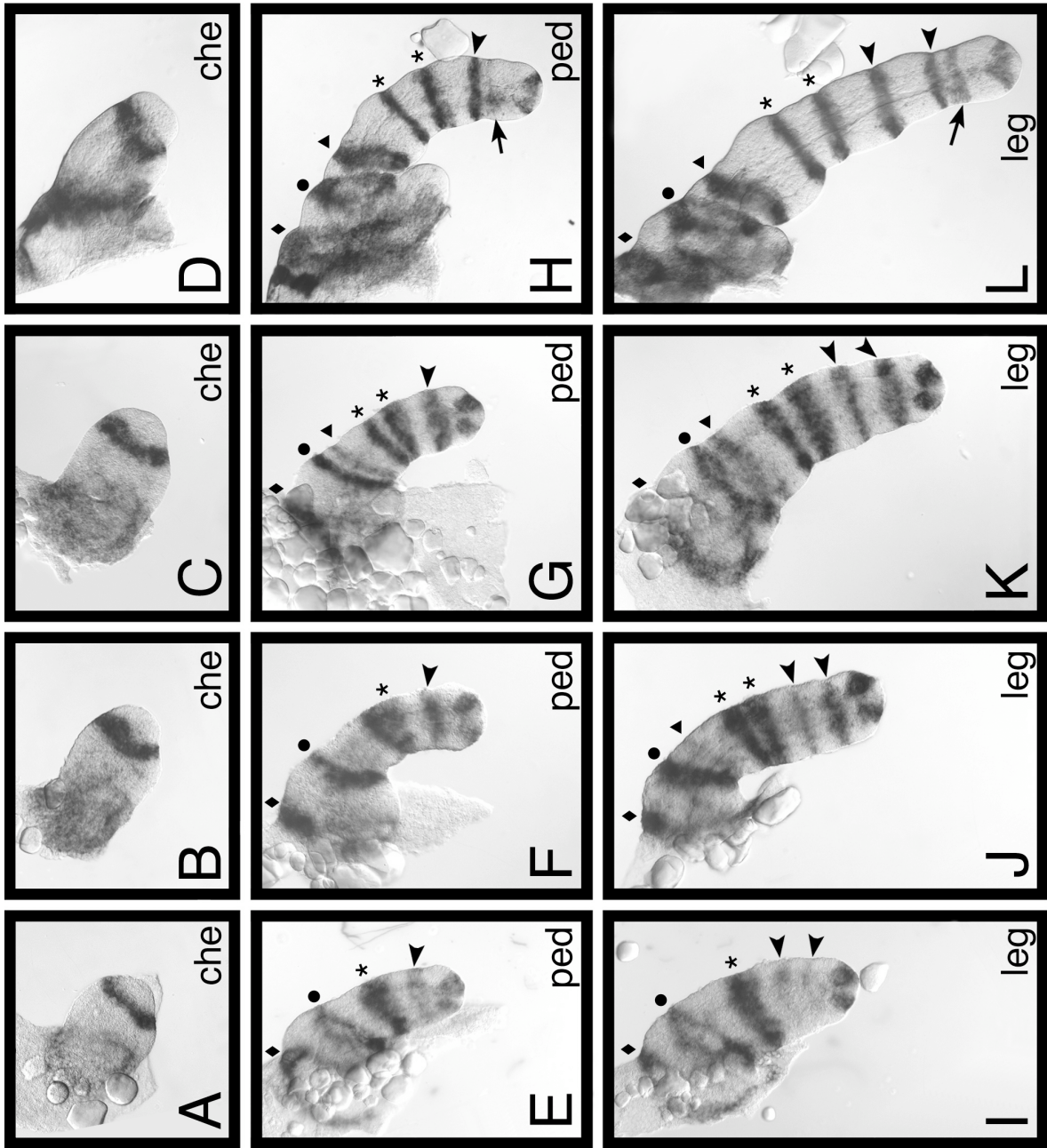


Abb. 3.58

### 3.1.4.2 Ein neuer Signalweg bei der Beinsegmentierung: EGF-Rezeptor Signaling und *seven-up*

#### *Die Expression von seven-up in Cupiennius salei*

Das Gen *svp* aus *Drosophila* gehört zu einer kleinen Gruppe von Steroidrezeptoren mit C4 Zinkfinger-Domänen, die als Orphan Receptor-Gene zusammengefasst werden (Detera-Wadleigh und Fanning, 1994). Die phylogenetische Analyse der verschiedenen Orphan Receptor-Gene und des *svp*-ähnlichen Fragments aus *Cupiennius* zeigt, daß dieses mit den *svp*-Genen aus *Drosophila melanogaster* und *Bombyx mori* eine recht gut unterstützte Gruppe bildet (reliability value = 74; Abb. 3.59). Das nächstverwandte Gen ist *Ear2* aus der Maus. Die übrigen Orphan Receptor-Gene (die COUP Transkriptionsfaktoren) bilden eine deutlich davon getrennte Gruppierung.

Neben der Expression in den prosomalen Gliedmaßen, die weiter unten besprochen wird, ist *Cs-svp* auch in anderen Bereichen des Embryos exprimiert. Früh zeigt sich eine Expression im Kopflappen. Diese ist zunächst diffus, wird aber stetig stärker und in älteren Embryonen hat das Expressionsmuster in den Kopflappen eine wabenartige Struktur (Abb. 3.60D-F). Die Genexpression befindet sich demnach wohl nicht in den von Stollewerk et al. (2001) beschriebenen Invaginationsstellen, sondern in den sie umgebenden Zellen. Expression von *Cs-svp* findet sich auch im übrigen Neuroektoderm, in den opisthosomalen Extremitätenknospen und im dorsalen Gewebe der Segmente (Abb. 3.60C). Diese Expression geht aus einer früheren, segmental wiederholten Expression hervor, die an die Expression mancher Segmentierungsgene erinnert (Abb. 3.60A,B). Allerdings wird die segmentale Expression von *Cs-svp* erst sichtbar, wenn das betreffende Segment schon völlig gebildet ist.

Der Bildung der prosomalen Gliedmaßen geht eine Expression von *Cs-svp* voraus. In den sich bildenden Extremitätenknospen ist *Cs-svp* daher auch ubiquitär exprimiert (Abb. 3.60D,E). In den Cheliceren bleibt die Expression während der gesamten Embryonalentwicklung ohne klares Muster, wobei vor allem die Expression in der Epidermis rasch zurückgeht und nur an der Grenze zwischen Basis und Klauenanlage eine schwache epidermale Expression verbleibt (Abb. 3.62A-E). In dem darunterliegenden Gewebe ist über längere Zeit eine Genexpression nachzuweisen, die jedoch ebenfalls stetig schwächer wird.

In den Pedipalpen- und Beinknospen geht die ubiquitäre Expression schnell in ein komplexeres und dynamisches Muster über. Die Expression im Inneren der Extremitäten (mesodermales Gewebe und vermutlich auch Nervengewebe) bleibt zunächst erhalten. In der Epidermis zeigen sich jedoch zwei ringförmige Domänen, eine an der Basis der Knospen und die andere nahe der Spitze (Abb. 3.61A,B). Die proximale Domäne bleibt über die gesamte Entwicklung hinweg erhalten, verlagert sich jedoch etwas nach distal und liegt schließlich an der Grenze zwischen Coxa und Trochanter. Die Coxa selbst zeigt ebenfalls eine diffuse Expression von *Cs-svp*. Das weitere Schicksal der distalen Domäne ist komplexer. Schon frühzeitig verbreitert sie sich und spaltet sich in zwei Expressionsringe, die zunächst noch ventral verbunden sind (Abb. 3.61C), sich schließlich aber ganz trennen (Abb. 3.61D). Dieser Vorgang läuft im Pedipalpus etwas später ab als in den Laufbeinen (Abb. 3.62F-I).

Im Pedipalpus liegen die zwei so entstandenen Ringe an der Grenze zwischen Femur und Patella bzw. Tibia und Tarsus. Die Expressionsstärke des distalen Rings beginnt ab etwa 170 hnE nachzulassen (Abb. 3.62J). Auch insgesamt ist eine Reduzierung der Expressionsstärke ab etwa 170 hnE festzustellen, wobei vor allem die innere mesodermale Expression nahezu vollständig verschwindet (Abb. 3.63D-F). Ab etwa 170 hnE erscheint de novo ein Expressionsring an der späteren Grenze zwischen Patella und Tibia (Abb. 3.62J), und schließlich erscheint gegen Ende der Embryonalentwicklung eine Expressionsdomäne an der Grenze zwischen Trochanter und Femur, die allerdings keinen Ring bildet, sondern sich auf den ventralen Teil beschränkt (Abb. 3.63F).

Die Laufbeine zeigen ein ähnliches Expressionsprofil. Nachdem sich die distale Domäne der frühen Beinknospen in zwei Ringe gespalten hat (Abb. 3.62K,L), läßt sich jedoch, im Gegensatz zum Expressionsprofil im Pedipalpus, ein weiteres Aufspaltungsereignis beobachten. Der distale der beiden Ringe verbreitert sich zunächst und spaltet dann einen relativ schwachen weiteren Ring ab (Abb. 3.62L-O). Dieser dritte Ring entfernt sich vom stärker exprimierten zweiten Ring und zeigt somit die Interkalierung des Metatarsus an. Während der dritte Ring sich infolge der Entstehung des Metatarsus nach distal verlagert, wird er stetig schwächer, bis er bei etwa 180 hnE völlig verschwunden ist (Abb. 3.62M-O, 3.63G-I). In den übrigen Aspekten gleicht das Expressionsprofil demjenigen des Pedipalpus, einschließlich der Reduzierung der mesodermalen Expression und des de novo Erscheinens der Expressionsdomänen an den Grenzen zwischen Trochanter und Femur bzw. Patella und Tibia.

### *Die Expression von Egfr in Cupiennius salei*

Der Epidermal Growth Factor Receptor (*Egfr*) aus *Drosophila* ist eine von vielen verschiedenen Rezeptor-Tyrosinkinasen (RTK) im Genom der Taufliege (z.B. Shilo, 2003). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Fragmente von insgesamt fünf verschiedenen RTK aus *Cupiennius* isoliert (Daten nicht gezeigt). Ein Fragment weist eine große Ähnlichkeit zu *Egfr* aus *Drosophila* auf und wurde daher als mögliches Homologon eingestuft. Um die Orthologie besser beurteilen zu können, wurde eine phylogenetische Analyse durchgeführt (Abb. 3.64). Diese schloß neben dem Fragment aus *Cupiennius* und weiteren *Egfr*-Genen aus verschiedenen Tierarten auch sämtliche RTK mit erkennbarer Sequenzähnlichkeit zu *Egfr* aus dem Genom von *Drosophila* ein. Wie bei einer Analyse von einer größeren Anzahl von Genen einer weitläufigeren Verwandtschaftsgruppe erwartet, ist das Phylogramm an den meisten Kanten nicht signifikant aufgelöst. Das Fragment aus *Cupiennius* bildet aber im Phylogramm eine Gruppe mit den *Egfr*-Genen aus unterschiedlichen Metazoen, die statistisch signifikant unterstützt ist (reliability value = 68).

*Cs-Egfr* ist im sich entwickelnden Zentralnervensystem in einem punktierten, dynamischen Muster exprimiert (Abb. 3.65A-D, 3.66A-D). Im Laufe der Embryonalentwicklung nimmt die Zahl der punktförmigen Expressionsdomänen zu und reflektiert damit die Zunahme der Invaginationstellen im Neuroektoderm. In älteren Stadien zeigt sich *Cs-Egfr* Expression in allen Invaginationstellen und zusätzlich in einer größeren Gruppe medianer Zellen in jedem Hemisegment (Abb. 3.66C,D). Das neuronale Expressionsmuster von *Cs-Egfr* gleicht damit weitgehend dem Muster der *Cs-Delta*-Gene (Stollewerk, 2002).

In den Gliedmaßen ist *Cs-Egfr* über einen längeren Zeitraum ubiquitär und relativ gleichmäßig exprimiert (Abb. 3.67A,D,G). Ab etwa 180 hnE zeigen sich vor allem im Pedipalpus und den Laufbeinen Stellen verstärkter Expression, die sich in der Nähe der Einschnürungen der zukünftigen Gelenke befinden und mit den Expressionsorten der *Cs-svp* Ringe zusammenfallen (Abb. 3.67E,H). Später lösen sich diese Banden verstärkter *Cs-Egfr* Expression in verschiedene Flecken stärkerer Expression auf, die wohl mit der Bildung des peripheren Nervensystems an diesen Stellen in Verbindung stehen (Abb. 3.67.F,I).



### **Abbildung 3.59**

Phylogenetische Analyse verschiedener Steroidrezeptoren aus der Gruppe der sog. Orphan-Receptor-Gene. Dargestellt ist das ungewurzelte majority-rule Konsensusphylogramm, das aus 1000 Zwischenbäumen errechnet wurde, die mit der Quartet Puzzling Methode nach Strimmer und von Haeseler (1996) erzeugt wurden. Die Zahlen an den Kanten geben die sog. reliability values an. Abkürzungen: siehe Abkürzungsverzeichnis S. 2-5.



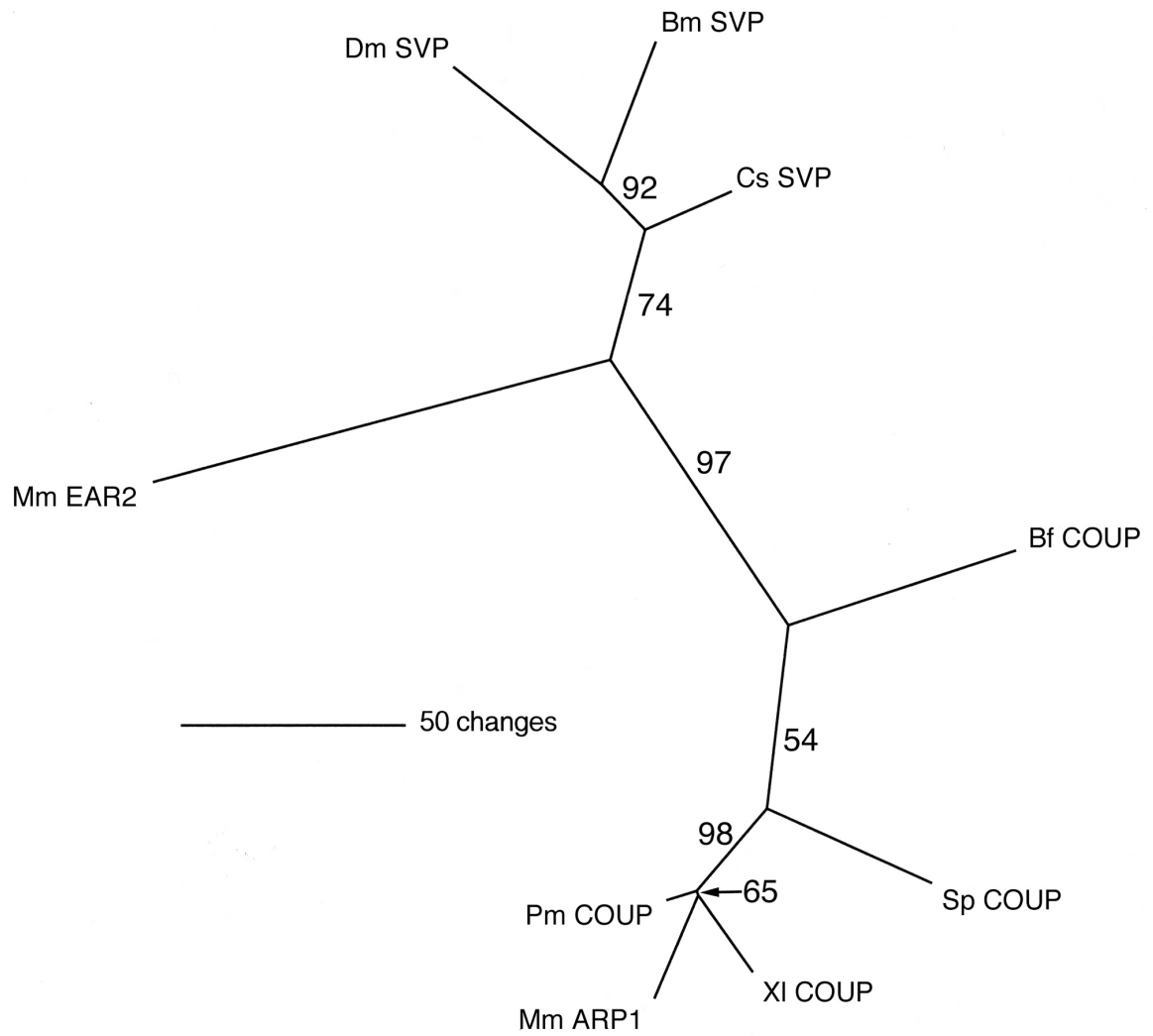


Abb. 3.59

### Abbildung 3.60

Expression von *Cs-svp* in *Cupiennius* Embryonen. (A,D) Embryo bei etwa 90 hnE. Ansicht des Opisthosomas (A) bzw. des Prosomas (D). (B,E) Embryo bei etwa 100 hnE. Ansicht des Opisthosomas (B) bzw. des Prosomas (E). (C,D) Embryo bei etwa 140 hnE. Ansicht des Opisthosomas (C) bzw. des Kopfes (F). Die Pfeile in C deuten auf die Knospen der Buchlungen, Tracheen und Spinnwarzen, die alle *Cs-svp* exprimieren. Die Pfeilköpfe in C deuten auf Expression im Neuroektoderm. Die Pfeile in F deuten auf die wabenartig erscheinende Expression im Gehirn. Abkürzungen: br, Gehirn; weitere Abkürzungen siehe Abkürzungsverzeichnis S. 2-5.

### Abbildung 3.61

Expression von *Cs-svp* in den Laufbeinen von *Cupiennius*. (A-D) Laufbein bei etwa 120, 125, 135, 140 hnE (von A nach D). Zwei Expressionsringe (gefüllter Kreis und Sternchen) sind zunächst vorhanden. Der mit (\*) gekennzeichnete Ring spaltet sich in zwei neue Ringe auf (Sternchen). Abkürzungen: siehe Abkürzungsverzeichnis S. 2-5.

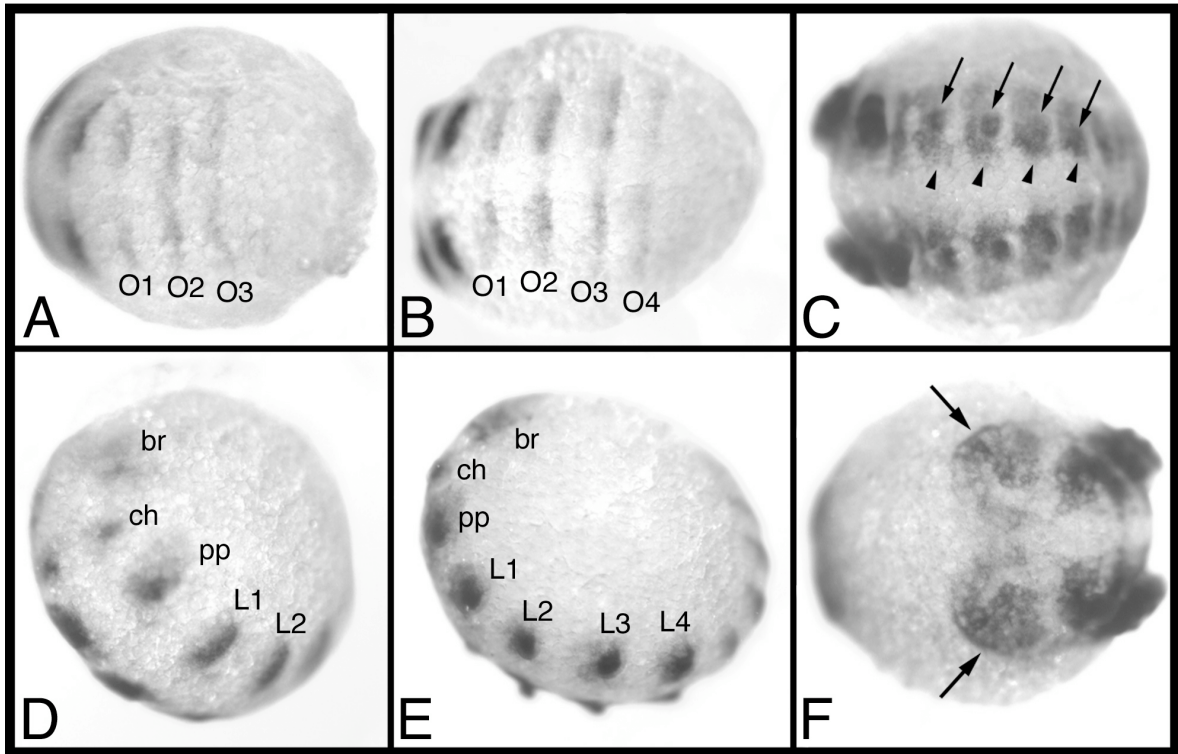


Abb. 3.60

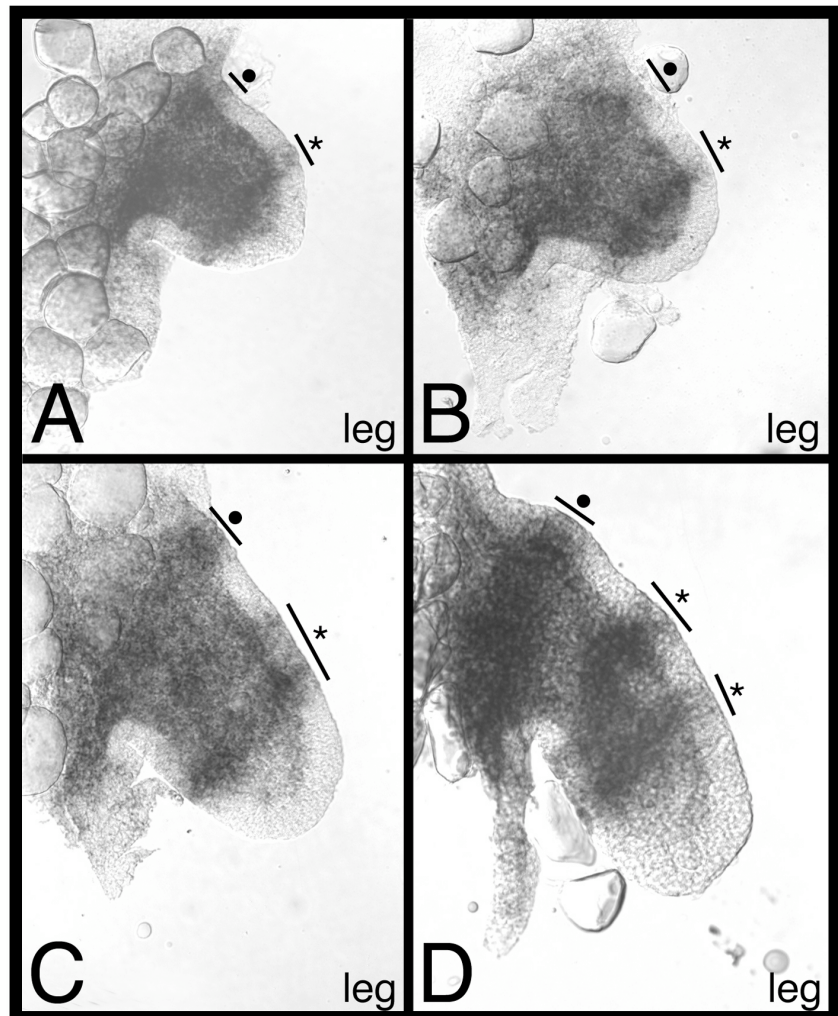


Abb. 3.61

### **Abbildung 3.62**

Expression von *Cs-svp* in den Gliedmaßen von *Cupiennius*. (A-E) Chelicere, (F-J) Pedipalpus und (K-O) Laufbein bei jeweils etwa 140, 145, 150, 160, 170 hnE (spaltenweise von links nach rechts). Im Pedipalpus vollzieht sich die Teilung des mit (\*) gekennzeichneten Rings etwas später als im Laufbein (vgl. Abb. 3.61). Bei etwa 170 hnE kommt ein weiterer Ring dazu (Pfeil in J). Im Laufbein teilt sich der distale mit (\*) gekennzeichnete Ring erneut (schließlich gibt es drei mit (\*) gekennzeichnete Ringe (siehe N,O), während es im Pedipalpus nur zwei sind). Bzgl. der Symbole vergleiche auch mit Abb. 3.61 und 3.63. Abkürzungen: siehe Abkürzungsverzeichnis S. 2-5.

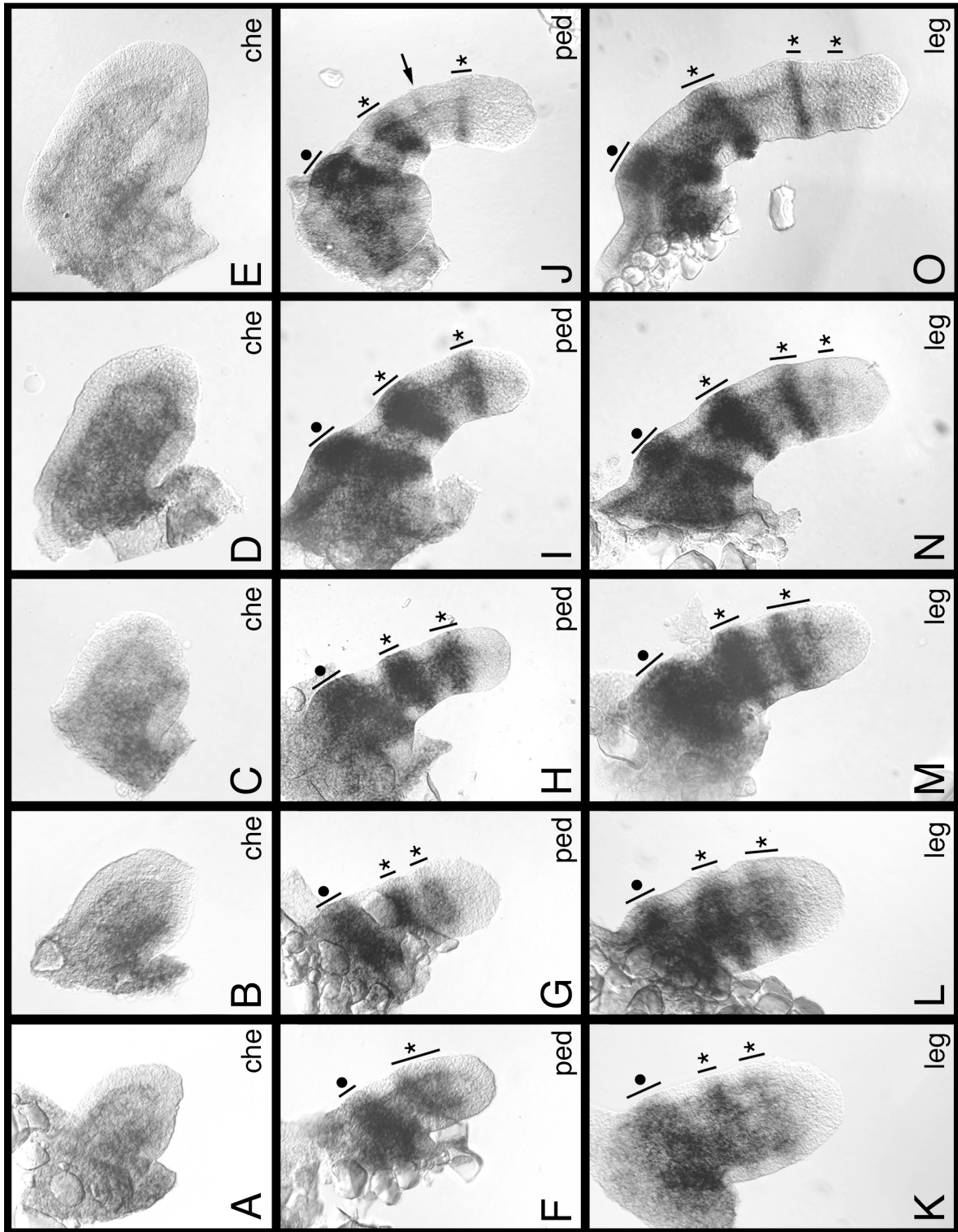


Abb. 3.62

### Abbildung 3.63

Expression von *Cs-svp* in den Gliedmaßen von *Cupiennius*. (A-C) Chelicere, (D-F) Pedipalpus und (G-I) Laufbein bei jeweils etwa 175, 180, 230 hnE (spaltenweise von links nach rechts). Die Symbole (gefüllter Kreis, Sternchen) kennzeichnen bereits vorhandene Expressionsringe (vgl. Abb. 3.61, 3.62). Der Pfeil in D-F und G-I kennzeichnet den de novo erscheinenden Ring auf Höhe der Patella. Dieser Ring erscheint in den Laufbeinen später als im Pedipalpus (vgl. dazu Abb. 3.62J). Der Pfeilkopf in F,I deutet auf die birnförmige, ventrale Expressionsdomäne auf der Höhe des Trochanters. Beachte auch, daß der distalste Ring im Laufbein wieder verschwindet (H,I).  
Abkürzungen: siehe Abkürzungsverzeichnis S. 2-5.

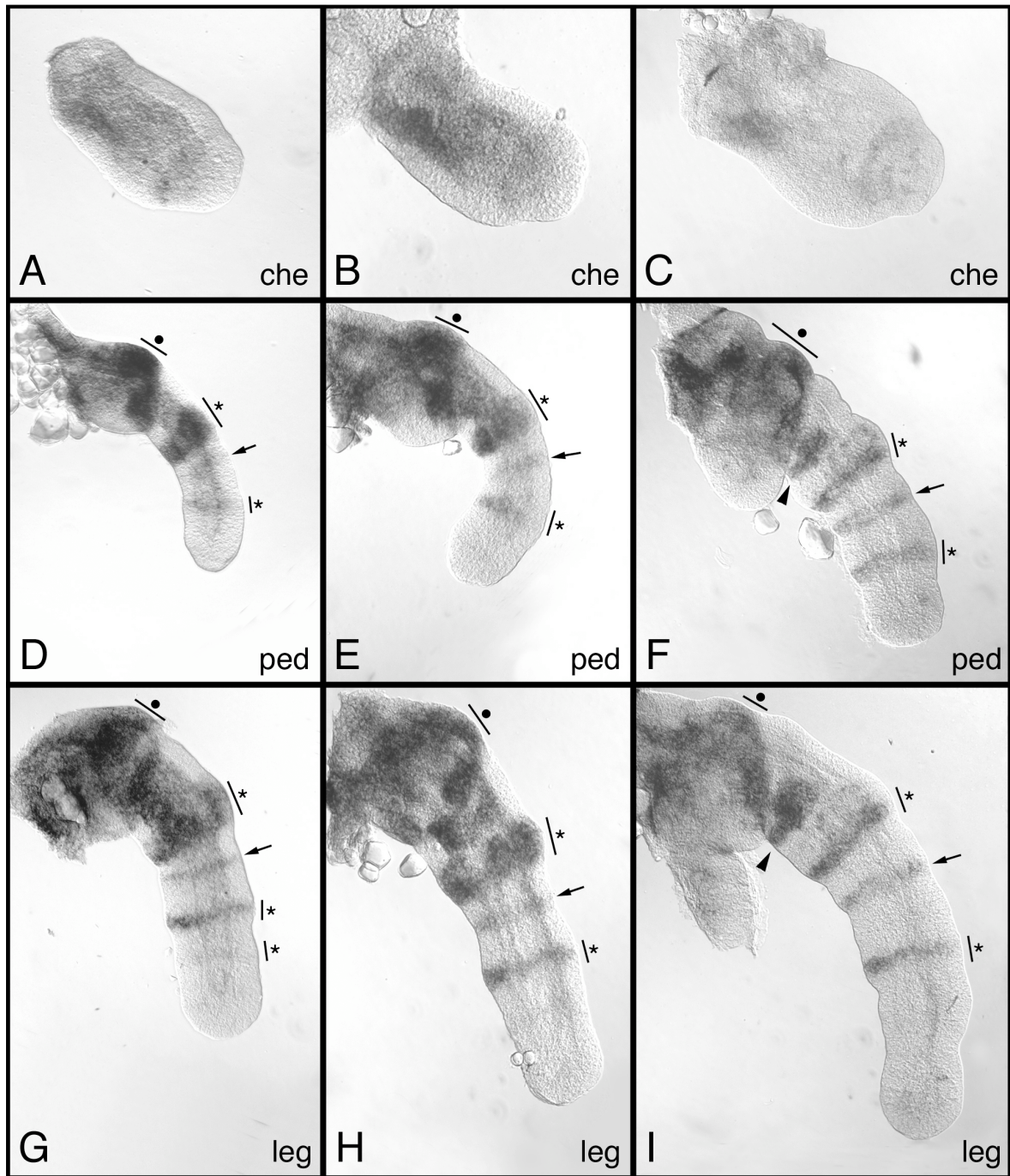


Abb. 3.63

### **Abbildung 3.64**

Phylogenetische Analyse von EGFR-Proteinen aus verschiedenen Tierarten und von ausgewählten Rezeptor-Tyrosinkinasen aus *Drosophila*. Dargestellt ist das ungewurzelte majority-rule Konsensusphylogramm, das aus 1000 Zwischenbäumen errechnet wurde, die mit der Quartet Puzzling Methode nach Strimmer und von Haeseler (1996) erzeugt wurden. Die Zahlen an den Kanten geben die sog. reliability values an. Abkürzungen: siehe Abkürzungsverzeichnis S. 2-5.



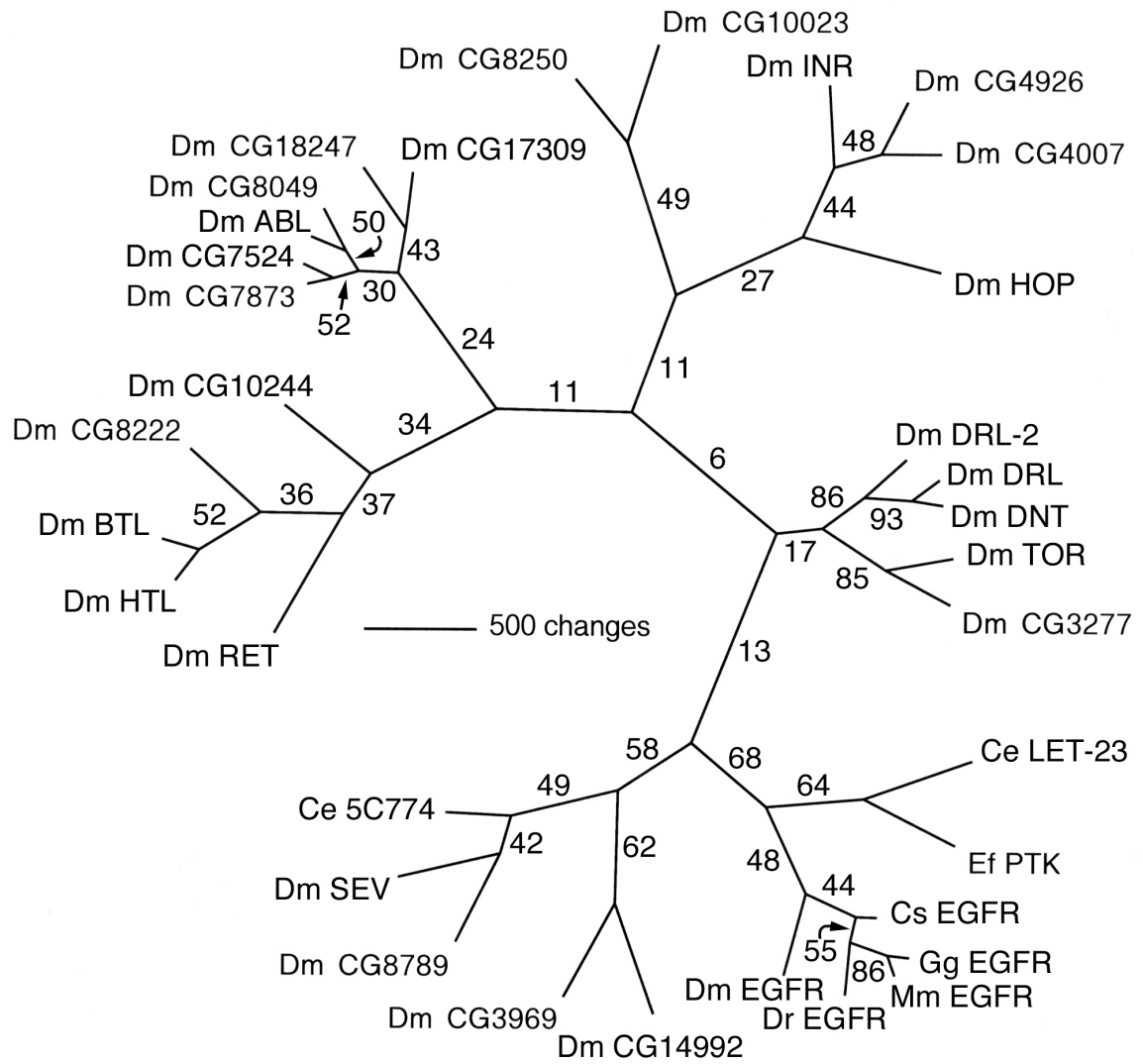


Abb. 3.64

### Abbildung 3.65

Expression von *Cs-Egfr* in *Cupiennius* Embryonen. (A) Embryo bei etwa 170 hnE. Ansicht des Kopfes. (B) Embryo bei etwa 190 hnE. Ansicht des Kopfes. Die Pfeile in A,B deuten beispielhaft auf Expression in den Invaginationsstellen im Neuroektoderm. Beachte die Zunahme von Expressionsorten von A nach B, welches die Zunahme der Zahl an Invaginationsstellen widerspiegelt. (C,D) Embryo bei etwa 200 hnE. (C) Ventralansicht des Prosomas. (D) Ventralansicht des Opisthosomas. Die Pfeile in C,D deuten auf Expression im Neuroektoderm. Abkürzungen siehe Abkürzungsverzeichnis S. 2-5.

### Abbildung 3.66

Expression von *Cs-Egfr* im Nervensystem von *Cupiennius*. (A-D) Embryo bei etwa 200 hnE. (A) Gesamtansicht (von ventral) des Präparats. Gliedmaßen links wurden entfernt. (B) Detail des Kopflappens. Der Pfeil deutet auf eine Grube unklarer Bedeutung, die sich am Vorderrand des Protocerebrums gebildet hat. Alle Invaginationsstellen des Kopflappens (auch diejenigen innerhalb der Grube (nicht im Fokus)) exprimieren *Cs-Egfr*. (C) Detail des Neuroektoderms des dritten und vierten Laufbein-Hemisegments. Die Pfeile deuten auf die Expression in einer größeren Zellgruppe nahe der ventralen Mittellinie. (D) Detail des Neuroektoderms des dritten Laufbein-Hemisegments. Der Pfeil deutet auf die größere Zellgruppe nahe der Mittellinie (siehe auch C). Der rote Kreis umgibt eine Invaginationsstelle. Es ist deutlich sichtbar, daß diese aus mehreren Zellen besteht, die alle *Cs-Egfr* exprimieren. Abkürzungen: siehe Abkürzungsverzeichnis S. 2-5.

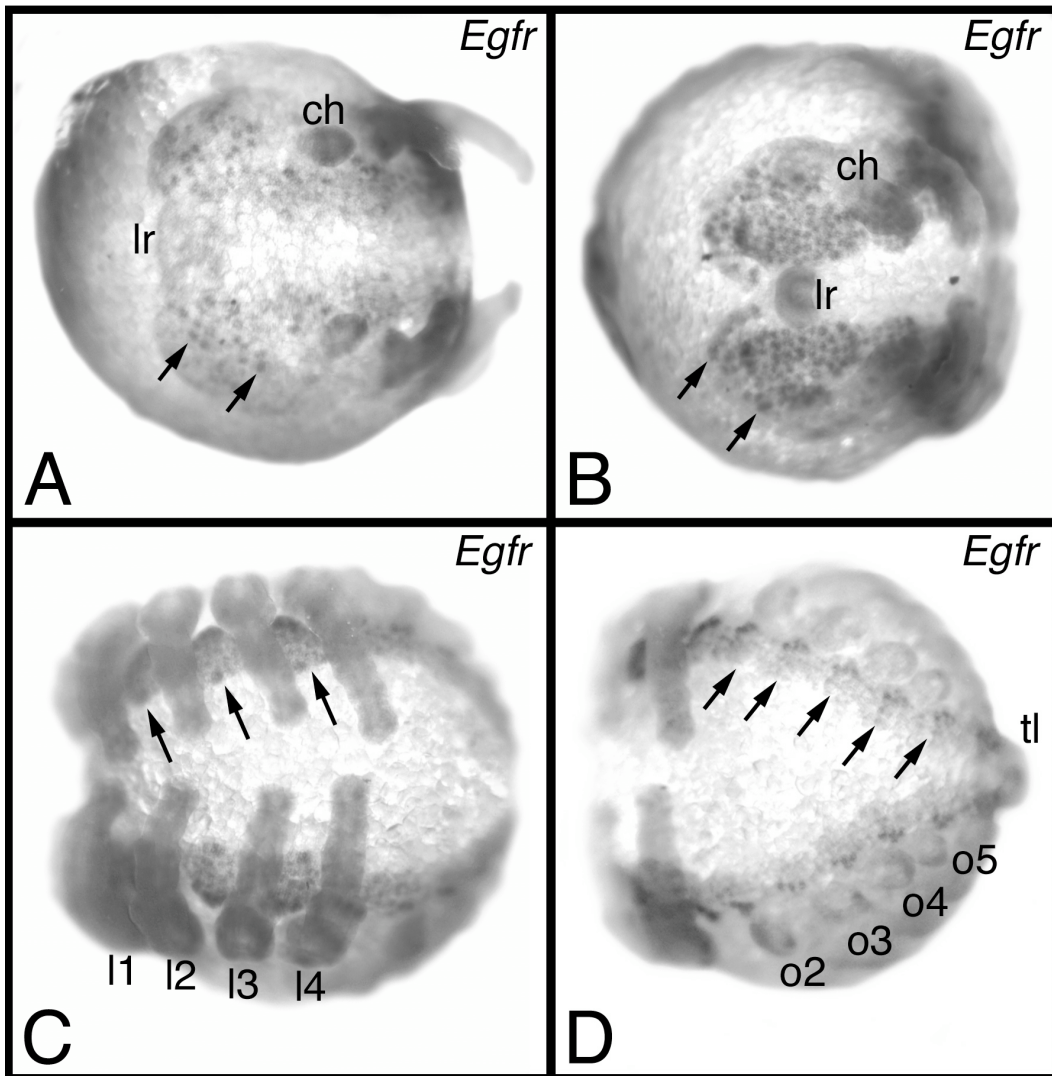


Abb. 3.65

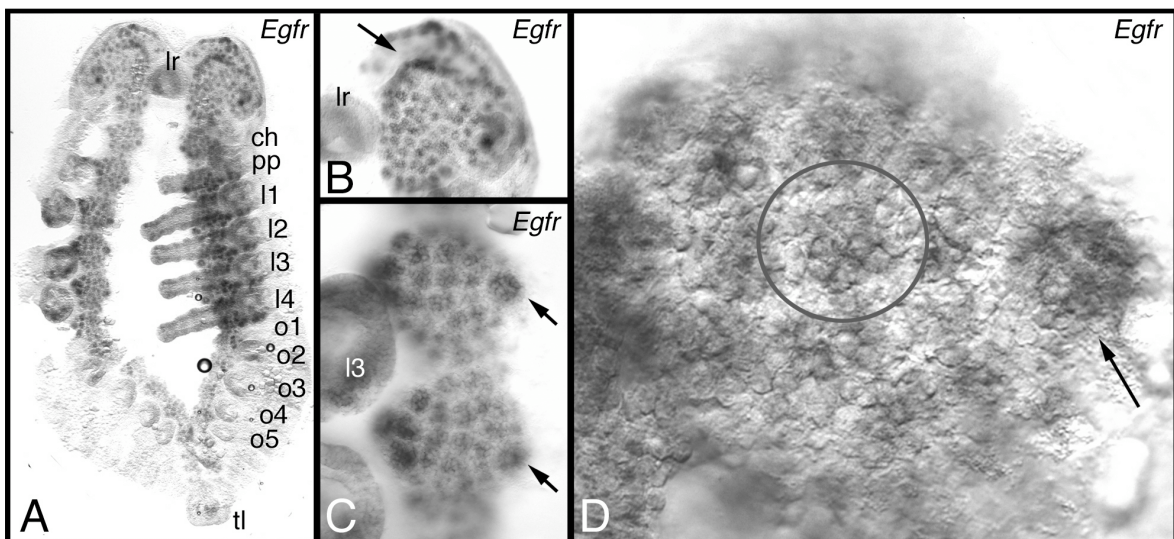


Abb. 3.66

### Abbildung 3.67

Expression von *Cs-Egfr* in den Gliedmaßen von *Cupiennius*. (A-C) Chelicere, (D-F) Pedipalpus und (G-I) Laufbein bei jeweils etwa 150, 180, 230 hnE (spaltenweise von links nach rechts). Die Pfeile in E,H deuten auf Ringe verstärkter Expression, die etwa ab diesem Alter das erste Mal auftreten. Die Pfeile in F,I deuten auf Flecken verstärkter Expression nahe den Gelenken. Das Sternchen in I kennzeichnet am Präparat verbliebenes Neuroektoderm (nicht mit dem Gnathenditen in F zu verwechseln!). Abkürzungen siehe Abkürzungsverzeichnis S. 2-5.

### Abbildung 3.68

Zellproliferation während der Entwicklung der Laufbeine von *Cupiennius*. (A-D) Nachweis von phosphoryliertem Histon 3 mittels Antikörper in Laufbeinen bei etwa 140, 160, 175, 230 hnE (von A nach D). (E) Einbau von BrdU über einen Zeitraum von etwa 15 Stunden (Injektion bei etwa 200 hnE und Fixierung bei etwa 215 hnE) und Nachweis mittels Antikörper. In der Nähe der Gelenke befinden sich schmale Bereiche in denen vermehrt BrdU inkorporiert wurde (Pfeile). Abkürzungen: siehe Abkürzungsverzeichnis S. 2-5.

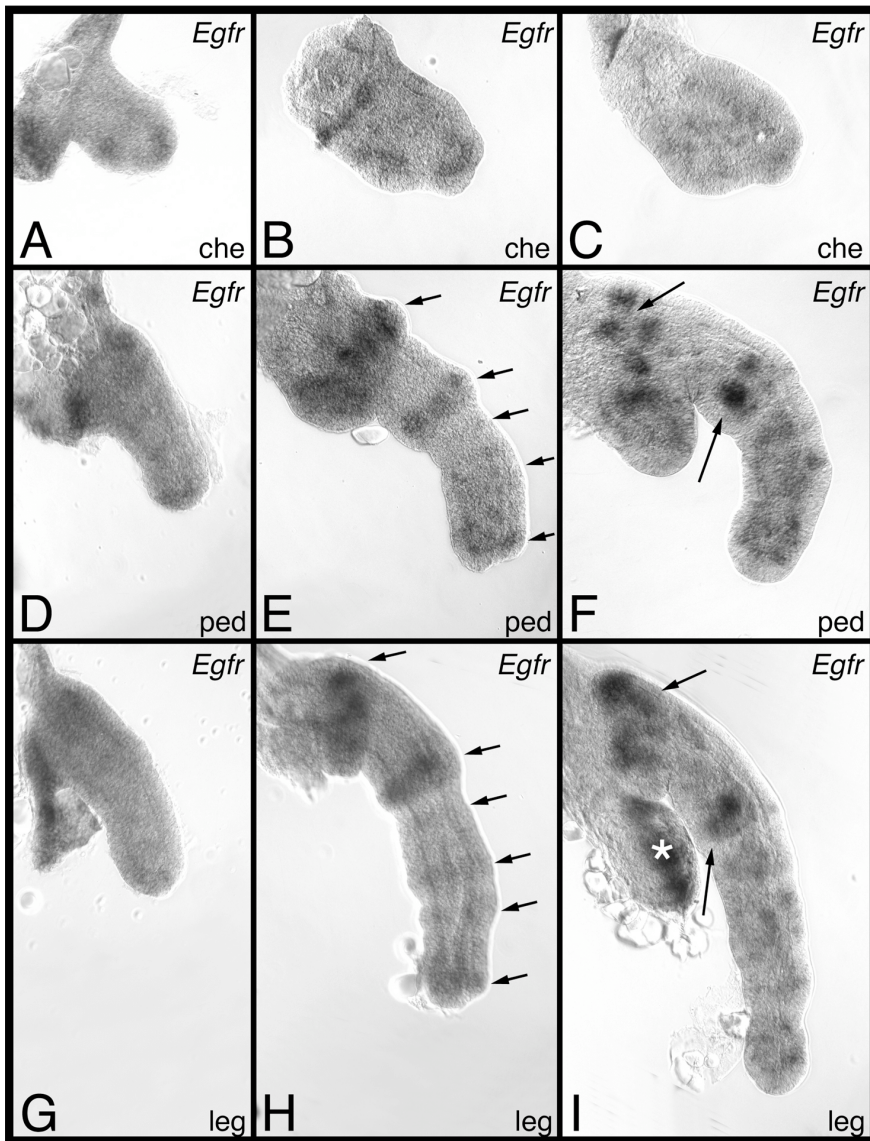


Abb. 3.67

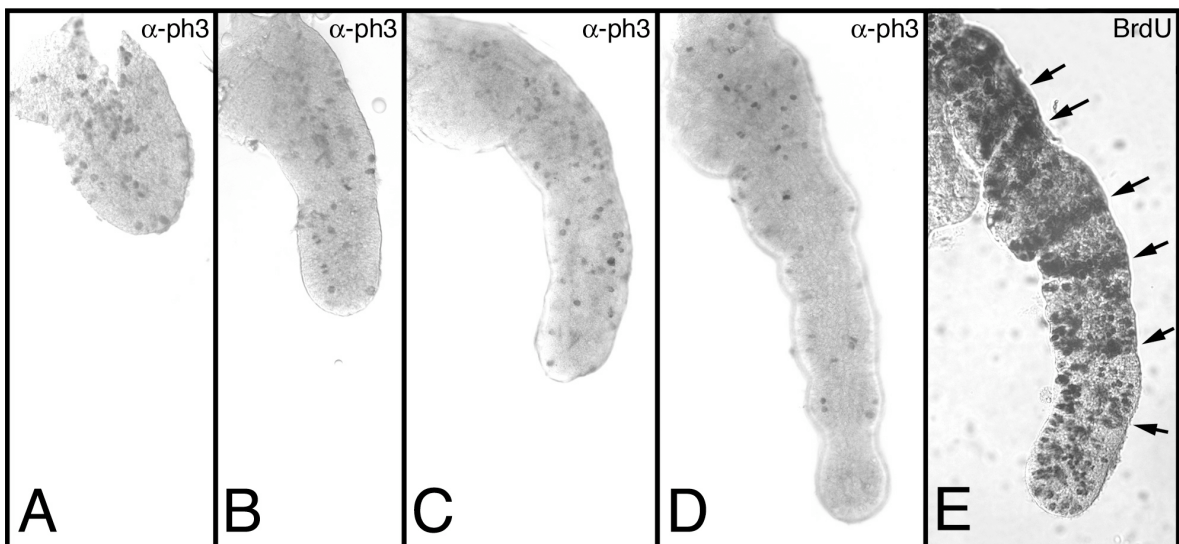


Abb. 3.68

### Abbildung 3.69

Nachweis fragmentierter DNA in normal entwickelten Embryos von *Cupiennius* mit der TUNEL Methode. Alle Embryos etwa 230 hnE. (A-E) TUNEL-behandelte Embryos aus verschiedenen Blickwinkeln um die einzelnen Aspekte des Zelltods während der normalen Embryonalentwicklung darzustellen. Zellen mit fragmentierter DNA erscheinen als schwarze Punkte. (A) Blick auf das Hinterende eines Embryos. Die Pfeilköpfe deuten auf TUNEL-markierte Zellen im Neuroektoderm des Opisthosomas. Der Pfeil zeigt TUNEL-Markierung im sich bildenden Herz an. (B,C) Ventralansicht des Prosomas. Die Pfeile deuten auf abgestorbene Zellen in den Spitzen der Beine. Die Pfeilköpfe deuten auf das Neuroektoderm des Opisthosomas. (D) Embryo in schräger Seitenlage. TUNEL-markierte Zellen im Neuroektoderm des Opisthosomas sind mit einem Pfeilkopf gekennzeichnet (nicht im Fokus). Im Neuroektoderm des Prosomas dagegen finden zu diesem Zeitpunkt in der Embryonalentwicklung offenbar keine Zelltodvorgänge statt (Pfeile). (E) Ansicht des Kopfes. Auch im Gehirn finden sich viele TUNEL-markierte Zellen. (F,G) Negativkontrolle ohne Zugabe der terminalen Transferase. In den Embryos (F, Seitenansicht; G, Frontansicht) sind keine TUNEL-markierten Zellen zu sehen. (H,I) Positivkontrolle nach Vorbehandlung mit DNase. In den Embryos (H, Seitenansicht; I, Frontalansicht) sind alle Zellkerne mit TUNEL markiert. (J-L) TUNEL-markierte Zellen in den Laufbeinen bei etwa 230 hnE. (J) Negativkontrolle: keine TUNEL-Markierung vorhanden. (K) Positivkontrolle: Alle Zellen wurden mit TUNEL markiert. (L) Normales Bein: Während dieses Stadiums scheinen nur vereinzelt Zellen abzusterben; lediglich im Tarsus sind mehrere Zellen offensichtlich tot. Erklärungen: (-)control bzw. (-)c: Negativkontrolle; (+)control bzw. (+)c: Positivkontrolle. Weitere Abkürzungen siehe Abkürzungsverzeichnis S. 2-5.

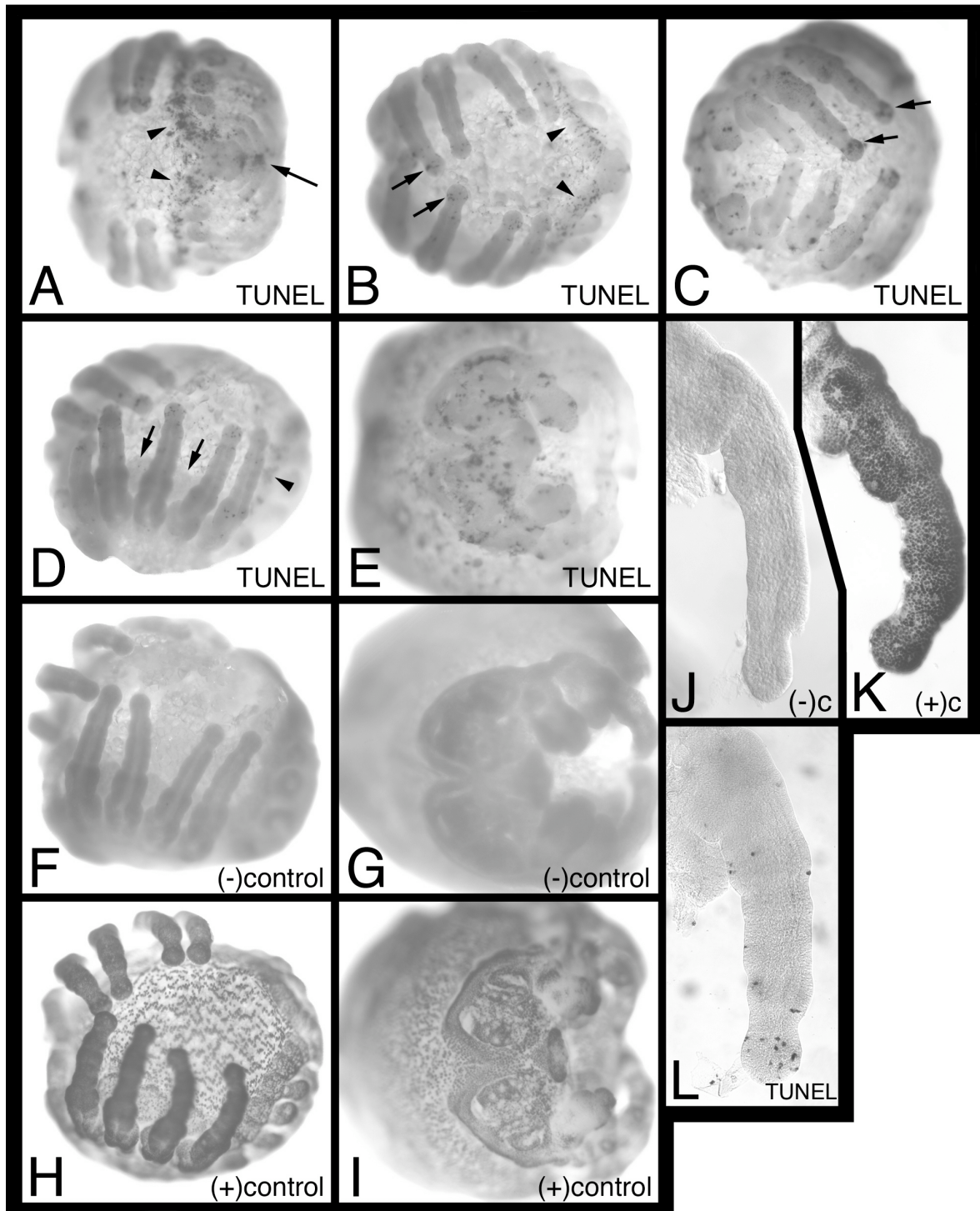


Abb. 3.69

### 3.2 Untersuchungen zur Beinmorphogenese und –segmentierung

#### 3.2.1 Über die Funktion von *seven-up* und die Rolle des EGF-Rezeptor Signalwegs

##### *Untersuchungen zur Funktion von Cs-svp*

Die Expression von *Cs-svp* in segmental wiederholten Ringen im Bein war überraschend, da aus *Drosophila* bislang keine Berichte über eine Funktion von *svp* bei der Beinentwicklung vorliegen. Die Funktion von *Cs-svp* während der Beinentwicklung sollte daher mittels RNAi (vgl. Material und Methoden) näher untersucht werden. Injektionen mit *Cs-svp* dsRNA führen tatsächlich zu Defekten der Gliedmaßenentwicklung (Anhang 3, Tabelle 1). Die behandelten Embryonen zeigen deutlich verkürzte Extremitäten. Abhängig von der Schwere der Phänokopie sind die Gliedmaßen nur mäßig betroffen (Abb. 3.70C) oder fast vollständig reduziert (Abb. 3.70D). Der Keimstreif selbst hat in den meisten Phänokopien kaum sonstige Defekte (Abb. 3.70B); in schwerer betroffenen Embryonen zeigt sich aber eine Unterentwicklung der Segmente (Abb. 3.70D). Wie auch bei den übrigen RNAi-Experimenten, die zu defekten Gliedmaßen führten (siehe nachfolgend) konnte nicht beurteilt werden, welche Beinanteile tatsächlich betroffen waren, weil dazu die Ausbildung der Kutikula abgewartet werden müsste, was derzeit technisch noch nicht möglich ist (siehe auch Diskussion).

Untersuchungen in *Drosophila* haben gezeigt, daß *svp* während der Entwicklung der Malpighischen Gefäße an der Regulation der Zellproliferation beteiligt ist (Kerber et al., 1998; Duronio, 1999; Sudarsan et al., 2002). Eine mögliche Ursache für die verkürzten Gliedmaßen in den *Cs-svp* RNAi Phänokopien war also eine Verminderung der Zellproliferation durch den teilweisen Wegfall von *Cs-svp*. Die Zellproliferations-Aktivität während der Beinentwicklung in *Cupiennius* wurde mittels Antikörper gegen phosphoryliertes Histon 3 (ph3) untersucht. Dabei zeigte sich zu jedem beliebigen Zeitpunkt der Beinentwicklung ein ungeordnet erscheinendes Muster (Abb. 3.68A-D). Anti-ph3 reaktive Zellen erscheinen zufallsmäßig über die gesamte Länge des Beins verteilt zu sein. Somit schien zunächst kein Zusammenhang zu bestehen zwischen der segmentalen Expression von *Cs-svp* und dem Muster der Zellproliferations-Aktivität. Allerdings liefert der Nachweis von ph3 nur eine Momentaufnahme eines sehr dynamischen Prozesses. Darüber hinaus verläuft das Wachstum der Beine in *Cupiennius* relativ langsam (etwa 5 bis 6 Tage bei Raumtemperatur). Es war daher wichtig eine



Nachweismethode einzusetzen, welche die Zellproliferations-Aktivität über einen längeren Zeitraum integrieren und kumuliert anzeigen konnte. Dies wurde mittels Einbau von BrdU erreicht (Abb. 3.68E). Eine BrdU-Pulsdauer von etwa 14 bis 16 Stunden bei Raumtemperatur führt zum Einbau von BrdU in Zellen überall im Bein; dies war auf Grund der Befunde mit anti-ph3 erwartet worden. Die Integration über mehrere Stunden deckt aber Bereiche erhöhter Zellproliferationstätigkeit auf. Diese sind segmental wiederholt und befinden sich in direkter Nachbarschaft zu den Einschnürungen der zukünftigen Gelenke. Ein gemeinsamer Nachweis von BrdU und *Cs-svp* RNA war technisch nicht möglich. Allerdings macht der Vergleich der Färbeorte anhand der morphologischen Landmarken (Einschnürungen der Gelenke) klar, daß die Expression von *Cs-svp* und die Bereiche erhöhter Zellproliferationstätigkeit zusammenfallen.

Der Einbau von BrdU in mit dsRNA behandelten Embryos konnte nicht untersucht werden, da hierzu zeitversetzte Injektionen notwendig wären. Dies ist technisch nicht möglich, da durch die erste Injektion der Innendruck der Embryos verlorengeht, was eine Zweitinjektion nahezu unmöglich macht. Darüber hinaus wird durch längere Lagerung der Embryos in Voltalef-Öl die Vitellinmembran sehr dehnbar und gummiartig, was eine Zweitinjektion zusätzlich erschwert. Alternativ wurde daher in RNAi Phänokopien der Nachweis von ph3 geführt. Dies gibt zwar keinen Aufschluß über das Proliferationsmuster in RNAi Phänokopien, läßt aber eine Aussage über die Anzahl der Mitosen zu. In den verkürzten Beinen von *Cs-svp* RNAi Phänokopien sind deutlich weniger anti-ph3 reaktive Zellen nachzuweisen als in den Beinen der Kontrollembryos (Abb. 3.71A-C).

Zusätzlich zur Zellproliferation wurde auch der Zelltod während der Beinentwicklung von *Cupiennius* untersucht. Hierzu kam die TUNEL Methode zum Einsatz, die fragmentierte DNA nachweist (Abb. 3.69; vgl. Material und Methoden). Zu jedem beliebigen Zeitpunkt der Beinentwicklung werden nur wenige Zellen mittels TUNEL farblich markiert. Absterbende Zellen finden sich vermehrt lediglich in der Beinspitze. Weitere Bereiche vermehrten Zelltods befinden sich im Gehirn, im Bauchmark des Opisthosomas und im Herzen (Abb. 3.69A-E). In den verkürzten Beinen von *Cs-svp* RNAi Phänokopien sind wesentlich mehr Zellen durch TUNEL angefärbt als in den Kontrollembryonen (Abb. 3.71D-G). Das deutet darauf hin, daß die Zelltodrate in den Beinen von *Cs-svp* RNAi Phänokopien deutlich höher ist als in normal entwickelten Beinen.

### *Untersuchungen zur Funktion von Cs-Egfr*

Im bereits erwähnten Kontext der Entwicklung der Malpighischen Gefäße in *Drosophila* unterliegt *svp* der Kontrolle durch den *Epidermal Growth Factor Receptor (Egfr)* Signalweg. Daher wurde auch aus *Cupiennius* ein zu *Egfr* homologes Gen isoliert. Die Aufregulierung der *Cs-Egfr* Expression über einen bestimmten Zeitraum genau an den Orten, an denen auch *Cs-svp* exprimiert ist (siehe weiter oben), war bereits ein deutlicher Hinweis auf einen Zusammenhang zwischen der *Egfr*-Signalgebung und der Expression von *Cs-svp*. Somit sollte der Wegfall von *Cs-Egfr* einen ähnlichen Effekt auf die Beinentwicklung haben wie der Wegfall von *Cs-svp*. Es zeigte sich, daß RNAi mittels *Cs-Egfr* (Anhang 3, Tabelle 2) größtenteils zu vergleichsweise milden Entwicklungsstörungen führt. Die am stärksten betroffenen Embryonen zeigten stark verkürzte Gliedmaßen, sowie Mißbildungen des Neuroektoderms (Abb. 3.72C). Der Großteil der erhaltenen Phänokopien zeigte allerdings lediglich verkürzte Gliedmaßen und der übrige Keimstreif wirkte weitgehend normal (Abb. 3.72B).

Des weiteren wurden auch in den *Cs-Egfr* Phänokopien Zellproliferation und Zelltod untersucht. Es zeigte sich, daß ganz ähnlich wie in den *Cs-svp* Phänokopien die Anzahl anti-ph3 reaktiver Zellen in den Beinen gegenüber den Kontrollembryonen deutlich erniedrigt ist, während die Zahl der TUNEL-markierten Zellen stark erhöht ist (Abb. 3.73A-F). Das läßt den Schluß zu, daß die RNA-Interferenz mit *Cs-svp* und die RNA-Interferenz mit *Cs-Egfr* zu ähnlichen Effekten führt, nämlich zu verminderter Zellproliferationsrate und erhöhter Zelltodrate und somit letztlich zu verkürzten Gliedmaßen.

Schließlich wurde die Expression von *Cs-svp* in *Cs-Egfr* Phänokopien untersucht (Abb. 3.74A-C). Ähnlich wie in den Beinen der Kontrollembryonen zeigen sich auch in den verkürzten Beinen mehrere Ringe von *Cs-svp* Expression. Allerdings ist die Expressionsstärke von *Cs-svp* in den *Cs-Egfr* Phänokopien schwächer als in den Kontrollembryonen. Alle in den verkürzten Beinen vorhandenen Expressionsringe lassen sich mit entsprechenden Ringen in den normal entwickelten Beinen in Beziehung setzen. Das deutet darauf hin, daß der teilweise Wegfall von *Cs-Egfr* nicht zu einer Veränderung im Expressionsmuster von *Cs-svp* führt, sondern lediglich zu einer Abschwächung der Expressionsstärke von *Cs-svp*. Somit scheinen in den betroffenen Beinen noch alle Beinsegmentanlagen vorhanden zu sein; sie sind aber alle wesentlich verkürzt.

### 3.2.2. Zur Rolle des *Notch*-Signalwegs und seiner möglichen Effektoren

#### *Untersuchungen zur Funktion zweier Bestandteile des Notch-Signalweges, Cs-Notch und Cs-Serrate*

In *Drosophila* ist gezeigt worden, daß der *Notch*-Signalweg am Wachstum und der Segmentierung der Beine beteiligt ist (z.B. Bishop et al., 1999; de Celis et al., 1998; Rauskolb und Irvine, 1999). Auch in *Cupiennius* sind inzwischen mehrere Bestandteile des *Notch*-Signalwegs bekannt. Im Rahmen der hier vorgestellten Arbeiten sollten erste Studien begonnen werden, welche die Untersuchung der Rolle des *Notch*-Signalweges bei der Beinentwicklung in *Cupiennius* zum Ziel hatten. Es wurden der Rezeptor *Cs-N* und einer seiner Liganden *Cs-Ser* ausgewählt. Um die beschriebenen schweren Entwicklungsdefekte bei der Injektion von *Cs-N* dsRNA (Stollewerk et al., 2003) zu vermeiden, wurde etwa 12 Stunden später als nach dem Standardverfahren üblich injiziert (Anhang 3, Tabelle 3). Damit konnte ein Einfluß der RNAi auf die Entwicklung der Segmente weitgehend vermieden werden, was zur Untersuchung der Beinentwicklung unbedingt notwendig war. Die Beinentwicklung ist ein später Prozess, der die Existenz normal entwickelter Segmente voraussetzt. Die erhaltenen Phänokopien zeigten verkürzte Beine und Deformationen des Neuroektoderms. Meistens waren die Beine deutlich deformiert, aber nur etwa um ein Viertel verkürzt (Abb. 3.75B,C). Die am schwersten betroffenen Phänokopien zeigen stark verkürzte Extremitäten (Abb. 3.75D). Der Effekt der RNAi auf die zellbiologischen Vorgänge in den Beinen wurde näher untersucht. Es zeigte sich, daß die Zellproliferationsrate in den betroffenen Beinen gegenüber den Kontrollembryonen herabgesetzt ist (Abb. 3.76A-C). Daneben ist die Anzahl absterbender Zellen deutlich erhöht (Abb. 3.76D-F).

Die gleichen Untersuchungen wurden auch mit dem Gen *Cs-Ser* durchgeführt. Die RNA Interferenz führte zu relativ leichten Phänotypen (Anhang 3, Tabelle 4). Die Gliedmaßen der *Cs-Ser* RNAi Phänokopien sind deutlich deformiert, aber gegenüber den Kontrollembryonen meist nur mäßig verkürzt (Abb. 3.77A-D). Die weiteren Untersuchungen zeigten, daß auch in diesem Fall die Zellproliferation beeinträchtigt (Abb. 3.78A-C), und die Zelltodrate erhöht ist (Abb. 3.78D-F).

Diese bislang erzielten Ergebnisse legen nahe, daß *Cs-N* und *Cs-Ser* zur normalen Entwicklung der Gliedmaßen benötigt werden. Wie in *Drosophila* scheinen sie das

Wachstum der Beine zu kontrollieren; eine Rolle bei der Gelenkbildung konnte jedoch nicht untersucht werden, da es, wie erwähnt, bislang noch nicht möglich ist, injizierte Embryonen bis zur Ausbildung einer Kutikula am Leben zu erhalten.

### *Untersuchungen zur Funktion eines ausgewählten möglichen Zielgens des Notch-Signalweges, Cs-AP-2*

Nachdem vergleichende Studien zur Funktion von Bestandteilen des *Notch*-Signalweges durchgeführt worden waren (siehe oben), sollte beispielhaft auch ein Zielgen dieses Signalweges untersucht werden. Die Wahl fiel dabei auf *AP-2*, welches in *Drosophila* der Kontrolle des *Notch*-Signalweges unterliegt und das eine wichtige Rolle bei der Beinentwicklung hat, wo es sowohl für das Wachstum der Beine gebraucht wird (daher der Name der *AP-2* Mutante: *stummelbein*), als auch für die Ausbildung der Gelenke vonnöten ist (Monge und Mitchell, 1998; Kerber et al., 2001; Monge et al., 2001). Wie erwähnt, kann die Gelenkbildung in *Cupiennius* derzeit nicht funktionell untersucht werden. Allerdings kann eine Rolle von *Cs-AP-2* beim Beinwachstum untersucht werden.

Die Funktion von *Cs-AP-2* wurde durch RNAi analysiert. Es zeigte sich, daß RNAi mittels *Cs-AP-2* dsRNA eine geringe Erfolgsquote hat (Anhang 3, Tabelle 5). Es ist für *Cupiennius* bekannt, daß für manche Gene die Behandlung mit dsRNA zu einer höheren Quote an Phänokopien führt als für andere Gene, und daß für wieder andere Gene eine RNA-Interferenz gar nicht möglich ist (Michael Schoppmeier, persönliche Mitteilung). Der Grund hierfür ist bislang unklar. Auch *Cs-AP-2* scheint für eine Interferenz mit dsRNA weniger empfänglich zu sein. Die meisten derjenigen Embryos die eine feststellbare Entwicklungsstörung aufweisen sind nur mäßig betroffen. Die Gliedmaßen sind etwa um 10% verkürzt und erscheinen leicht deformiert (Abb. 3.79D, 3.80B). In den am stärksten ausgeprägten Phänokopien sind die Beine stark verkürzt und erscheinen keulen- oder sackförmig (Abb. 3.79C, 3.80D). Der Nachweis von *Cs-AP-2* mRNA in den Phänokopien zeigt, daß durch die RNAi nicht die gesamte RNA ausgeschaltet werden kann. In den leicht betroffenen Phänokopien ist ein normales, aber schwächeres *Cs-AP-2* Expressionsmuster zu finden (Abb. 3.79B, 3.80B). Interessant ist, daß im Gehirn die Expression in den Zentren der Seitenaugen nahezu vollständig ausgelöscht werden kann, während die Expression in den Zentren der Medianaugen und im Zentralkörper kaum einen Unterschied zwischen Phänokopie und Kontrollembryo erkennen läßt (Abb. 3.79B). In den

Beinen der leicht betroffenen Phänokopien zeigt sich das normale Ringe-Muster, allerdings mit deutlich verminderter Expressionsstärke (Abb. 3.80B). In stärker betroffenen Phänokopien ist in den Beinen ebenfalls das normale Ringe-Muster zu sehen; die Expressionsstärke ist aber so weit herabgesetzt, daß bestimmte Ringe nicht mehr hervortreten (Abb. 3.80C). In den stärker betroffenen Phänokopien exprimieren nur noch einzelne, verstreute Zellen *Cs-AP-2* (Abb. 3.80D). Eine Einschätzung über deren Verhältnis zu den Ringen im normal entwickelten Bein ist auf Grund der gestörten Beinmorphologie nicht ohne weiteres möglich.

In den deformierten Beinen der Phänokopien wurden Untersuchungen zu Zellproliferation und Zelltod durchgeführt. Der Nachweis von ph3 zeigt, daß im Vergleich zu den Kontrollembryonen weniger anti-ph3 reaktive Zellen vorliegen (Abb. 3.81A-C). Der Nachweis absterbender Zellen durch TUNEL zeigt dagegen wesentlich mehr markierte Zellen in den verkürzten Beinen als in den Beinen der Kontrollembryonen (Abb. 3.81D-F). Dies deutet darauf hin, daß der partielle Wegfall von *Cs-AP-2* zur Beeinträchtigung der Zellproliferation und zu vermehrtem Zelltod führt.

Um eine Aussage über den Einfluß des *Notch*-Signalweges auf die Expression von *Cs-AP-2* treffen zu können, wurde die Expression von *Cs-AP-2* in *Cs-N* RNAi-Phänokopien untersucht. Wie bereits weiter oben erwähnt weisen starke Phänokopien von *Cs-N* schwere Defekte der Segmentbildung auf, so daß es gar nicht erst zu einem normalen Beginn einer Gliedmaßenentwicklung kommen kann. Die im Rahmen der hier vorgestellten Experimente erzeugten *Cs-N* Phänokopien sind daher wahrscheinlich als relativ schwache Phänokopien anzusehen. In den hierbei schwerer betroffenen Embryos sind die Beine deutlich verkürzt und deformiert (siehe auch oben). Das Expressionsmuster von *Cs-AP-2* in diesen Beinen ist desorganisiert. Während in den normal entwickelten Beinen das beschriebene Ringe-Muster zu sehen ist, ist in den verkürzten Beinen eine einzige, breite Expressionsdomäne zu finden oder in etwas weniger schwer verkürzten Beinen eine breite Domäne und ein zusätzlicher, schwach exprimierter Ring proximal davon (Abb. 3.82, Abb. 3.83B,C). Die breite Domäne ist in ihrer Zusammensetzung uneinheitlich; sie besteht aus einem distalen Abschnitt sehr starker Expression und einem proximalen Abschnitt schwächerer Expression. Insgesamt jedoch ist die Expression relativ stark- auch im Vergleich zu den Kontrollembryonen- so daß kein Anhaltspunkt vorliegt, der für eine Rolle von *Cs-Notch* bei der Aktivierung der *Cs-AP-2* Expression sprechen würde (vgl. Diskussion).

Die breite Domäne ist in ihrer proximal-distalen Ausdehnung deutlich länger als jede Ring-Domäne in den normal entwickelten Beinen, und das, obwohl die betroffenen Beine verkürzt sind. Das lädt zu der Interpretation ein, die breite Domäne in den verkürzten Beinen entspricht den zu einem einheitlichen Expressionsbereich verschmolzenen Ringen wie sie im normalen Bein ausgeprägt werden (Abb. 3.83B,C).



### **Abbildung 3.70**

Der Effekt von Injektionen von *Cs-svp* dsRNA. (A) Nicht mit dsRNA behandelter Embryo. (B-D) Die mit *Cs-svp* dsRNA behandelten Embryos zeigen verkürzte und mißgestaltete Extremitäten und in seltenen Fällen Mißbildungen der Segmente des Opisthosomas (D). Die Embryos wurden mit DAPI gefärbt. Alle Embryos in schräger Seitenlage und Ventralansicht. Abkürzungen siehe Abkürzungsverzeichnis S. 2-5.

### **Abbildung 3.71**

Zellproliferation und Zelltod in den Laufbeinen mit *Cs-svp* dsRNA behandelter Embryonen. (A-C) Nachweis von phosphoryliertem Histon 3 in Kontrollembryonen (A) und in mit dsRNA behandelten Embryonen (B,C). In B,C sind einige markierte Zellen beispielhaft mit einem Pfeil gekennzeichnet. Insgesamt sind es deutlich weniger markierte Zellen als in den Beinen der Kontrollembryonen. (D-G) Nachweis fragmentierter DNA mittels TUNEL in den Laufbeinen von Kontrollembryonen (D) und von mit dsRNA behandelten Embryonen (E-G). Da die Verkürzung der Beine als spezifische Phänokopie angesehen wurde (siehe auch Text und Anhang 3), werden die sukzessive kürzeren Beine von B nach C, bzw. von E nach G hier als schrittweise stärkere Phänokopien interpretiert. Abkürzungen: siehe Abkürzungsverzeichnis S. 2-5.



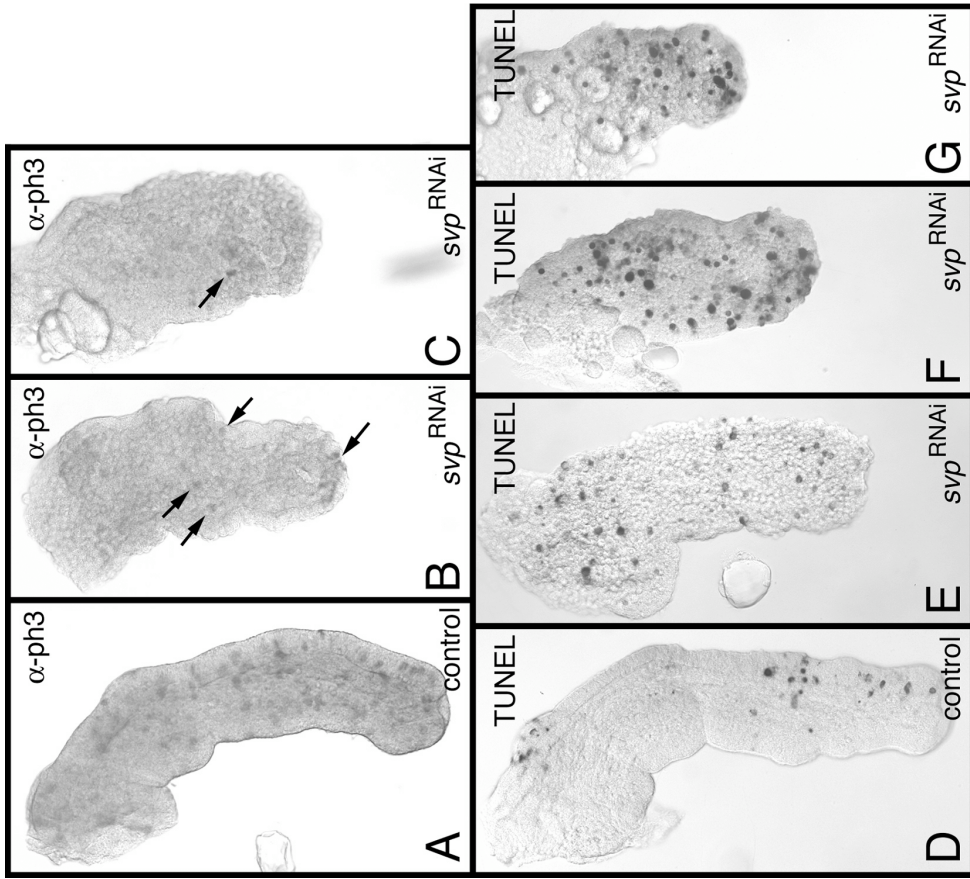


Abb. 3.71

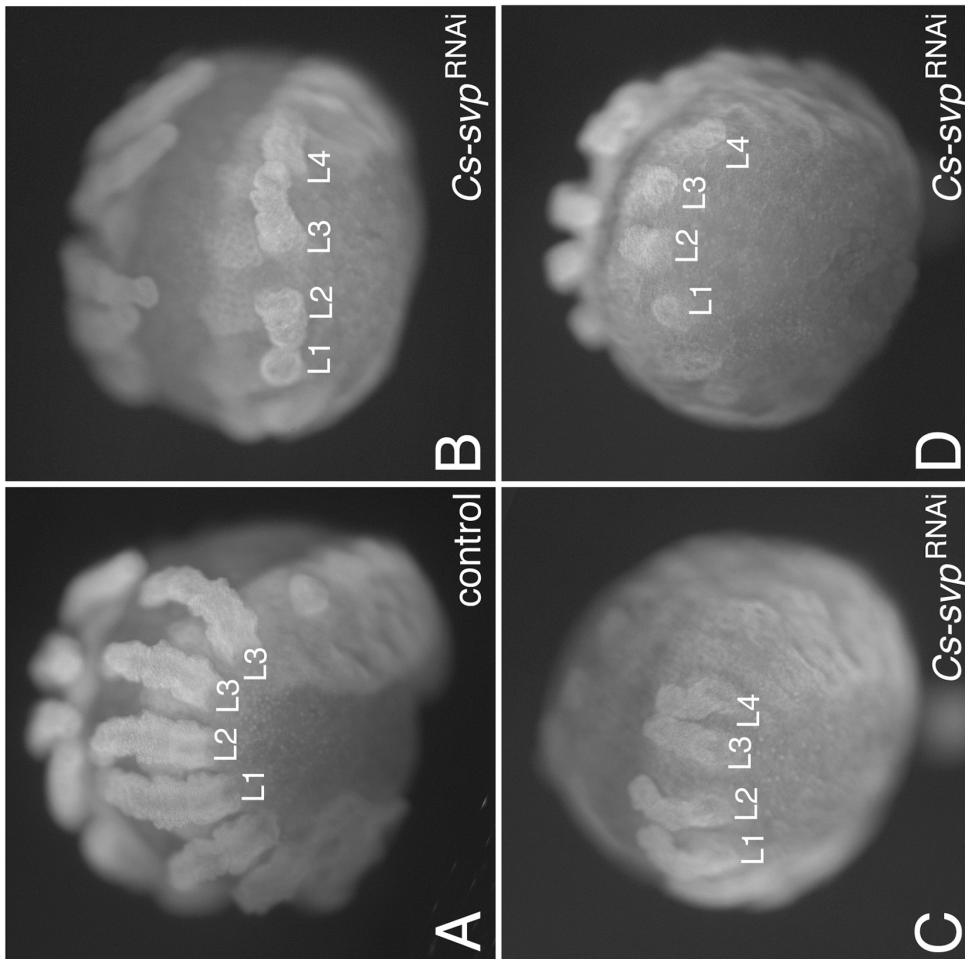


Abb. 3.70

### **Abbildung 3.72**

Der Effekt von Injektionen von *Cs-Egfr* dsRNA. (A) Nicht mit dsRNA behandelter Embryo. (B,C) Die mit *Cs-Egfr* dsRNA behandelten Embryos zeigen verkürzte und mißgestaltete Extremitäten und in manchen Fällen Mißbildungen des Neuroektoderms (C). Die Embryonen wurden mit DAPI gefärbt. Alle Embryos in schräger Seitenlage und Ventralansicht. Abkürzungen siehe Abkürzungsverzeichnis S. 2-5.

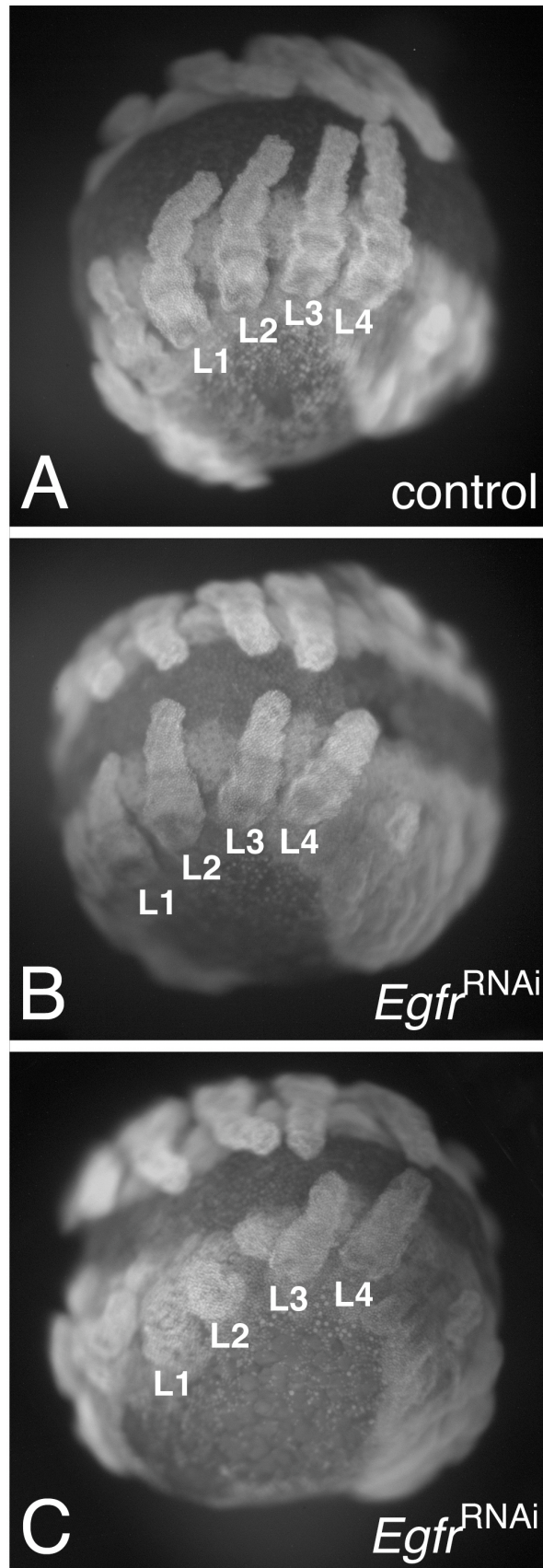


Abb. 3.72

### Abbildung 3.73

Zellproliferation und Zelltod in den Laufbeinen mit *Cs-Egfr* dsRNA behandelte Embryonen. (A-C) Nachweis von phosphoryliertem Histon 3 in Kontrollembryonen (A) und in mit dsRNA behandelten Embryonen (B,C). In B,C sind einige markierte Zellen beispielhaft mit einem Pfeil gekennzeichnet. Insgesamt sind es deutlich weniger markierte Zellen als in den Beinen der Kontrollembryonen. (D-F) Nachweis fragmentierter DNA mittels TUNEL in den Laufbeinen von Kontrollembryonen (D) und von mit dsRNA behandelten Embryonen (E,F). Da die Verkürzung der Beine als spezifische Phänokopie angesehen wurde (siehe auch Text und Anhang 3), werden die sukzessive kürzeren Beine von B nach C, bzw. von E nach F hier als schrittweise stärkere Phänokopien interpretiert. Abkürzungen: siehe Abkürzungsverzeichnis S. 2-5.

### Abbildung 3.74

Expression von *Cs-svp* in den Laufbeinen mit *Cs-Egfr* dsRNA behandelte Embryonen. (A) Bein eines Kontrollembryos (unbehandelt). Pfeil: Proximale Expressionsdomäne. Pfeilkopf: ventrale Domäne im Trochanterbereich. Sternchen und Rechteck: weitere Expressionsringe (vgl. auch Abb. 3.63). (B,C) Beine von mit dsRNA behandelten Embryonen. Die Expressionsdomänen des normalen *Cs-svp* Musters sind vorhanden (vgl. Zeichen und Symbole mit A), sind aber in ihrer Expressionsstärke abgeschwächt, so daß teilweise nicht mehr alle Ringe sichtbar sind (siehe C). Abkürzungen: siehe Abkürzungsverzeichnis S. 2-5.

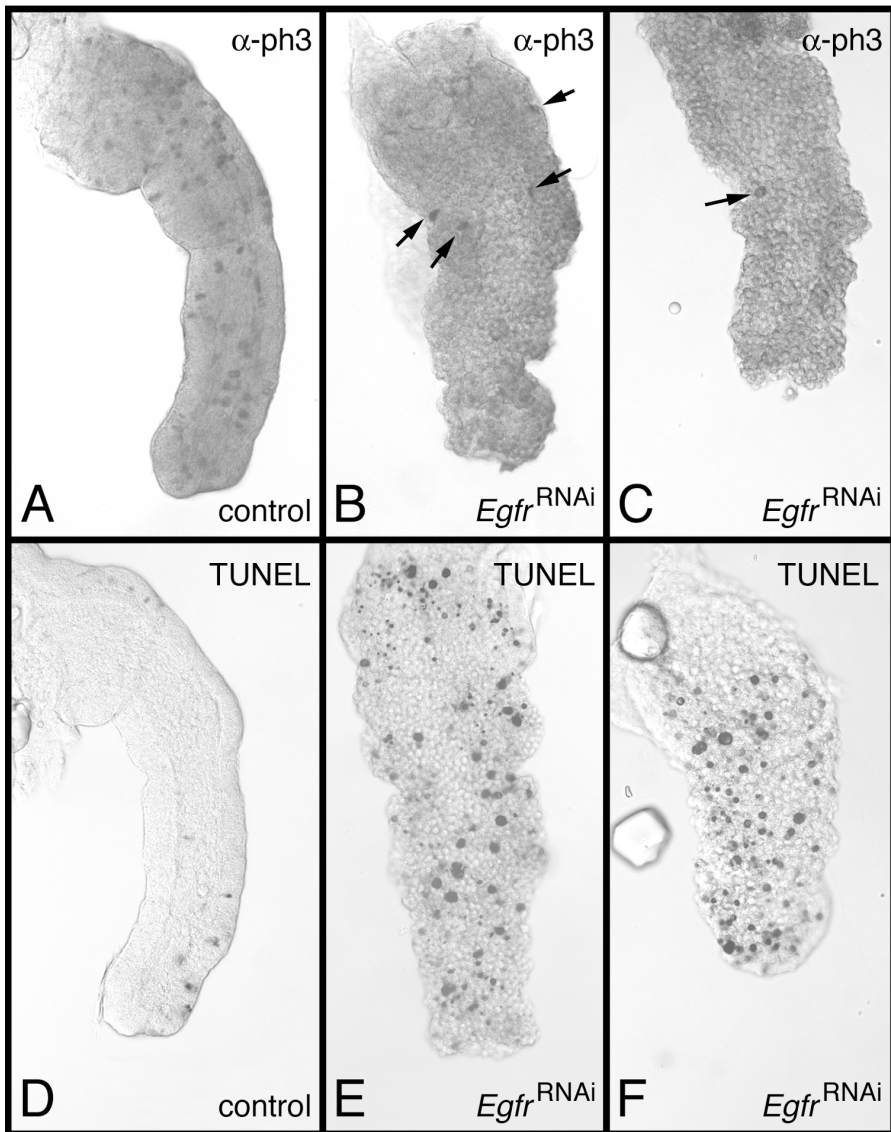


Abb. 3.73

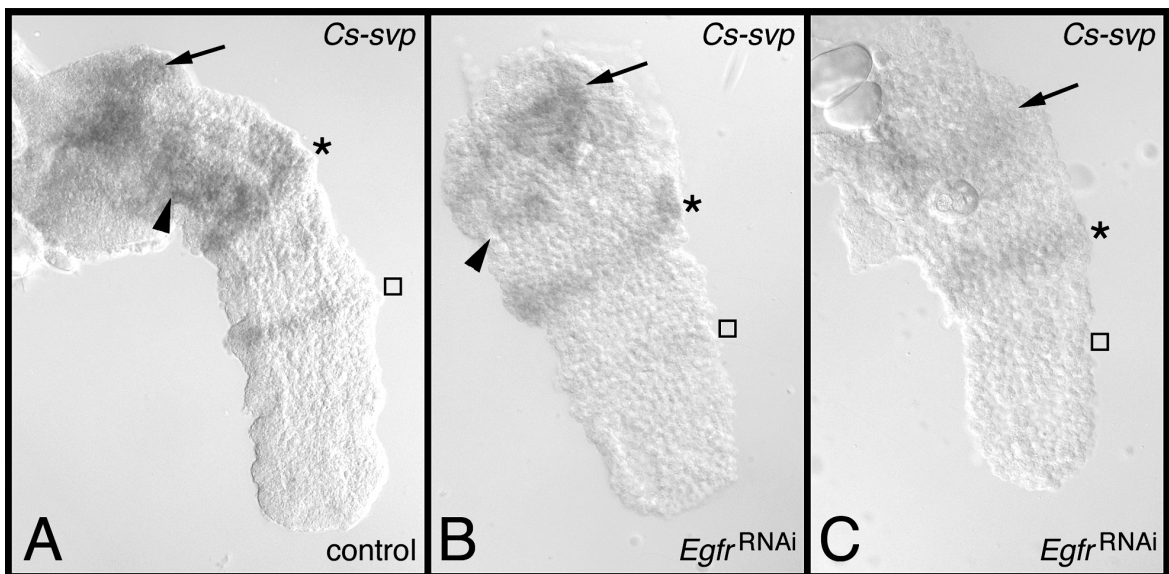


Abb. 3.74

### Abbildung 3.75

Der Effekt von Injektionen von *Cs-Notch* dsRNA. (A) Nicht mit dsRNA behandelter Embryo. (B-D) Die mit *Cs-N* dsRNA behandelten Embryos zeigen mißgestaltete, aber meist nur geringfügig verkürzte Extremitäten. In manchen Fällen ergaben sich Mißbildungen der Segmente und des Neuroektoderms und stark verkürzte Gliedmaßen (D). Die Embryonen wurden mit DAPI gefärbt. Alle Embryos in Ventralansicht. Abkürzungen siehe Abkürzungsverzeichnis S. 2-5.

### Abbildung 3.76

Zellproliferation und Zelltod in den Laufbeinen mit *Cs-N* dsRNA behandelten Embryonen. (A-C) Nachweis von phosphoryliertem Histon 3 in Kontrollembryonen (A) und in mit dsRNA behandelten Embryonen (B,C). In B,C sind einige markierte Zellen beispielhaft mit einem Pfeil gekennzeichnet. Insgesamt sind es weniger markierte Zellen als in den Beinen der Kontrollembryonen. (D-F) Nachweis fragmentierter DNA mittels TUNEL in den Laufbeinen von Kontrollembryonen (D) und von mit dsRNA behandelten Embryonen (E,F). Da die Verkürzung der Beine als spezifische Phänokopie angesehen wurde (siehe auch Text und Anhang 3), werden die sukzessive kürzeren Beine von B nach C, bzw. von E nach F hier als schrittweise stärkere Phänokopien interpretiert. Abkürzungen: siehe Abkürzungsverzeichnis S. 2-5.

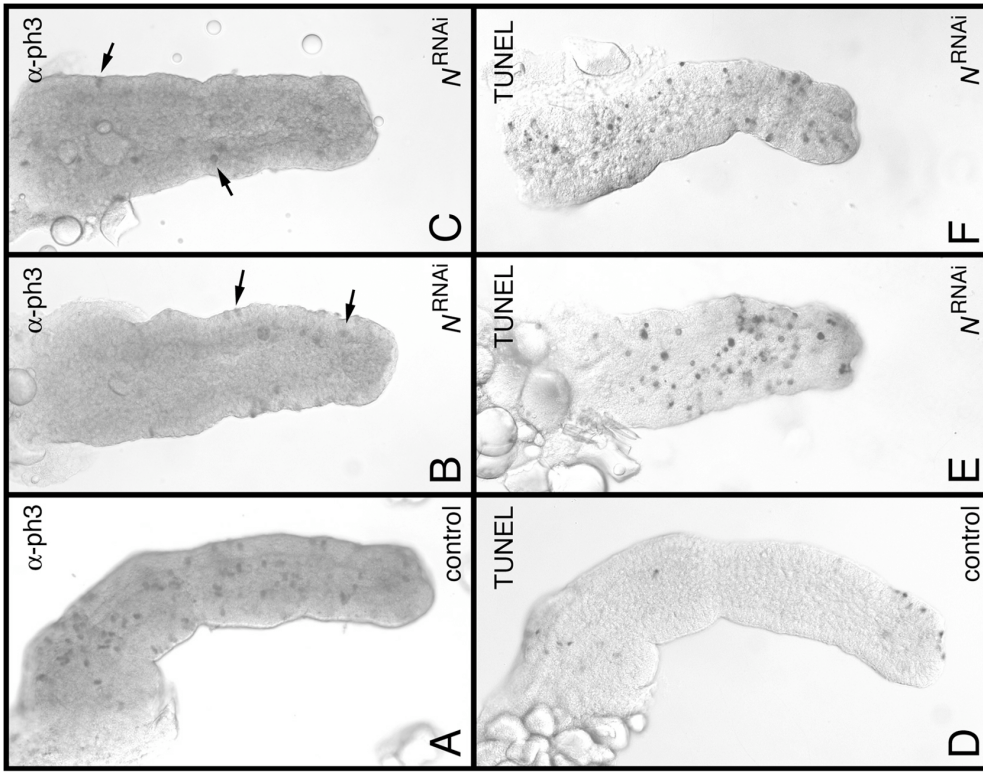


Abb. 3.76

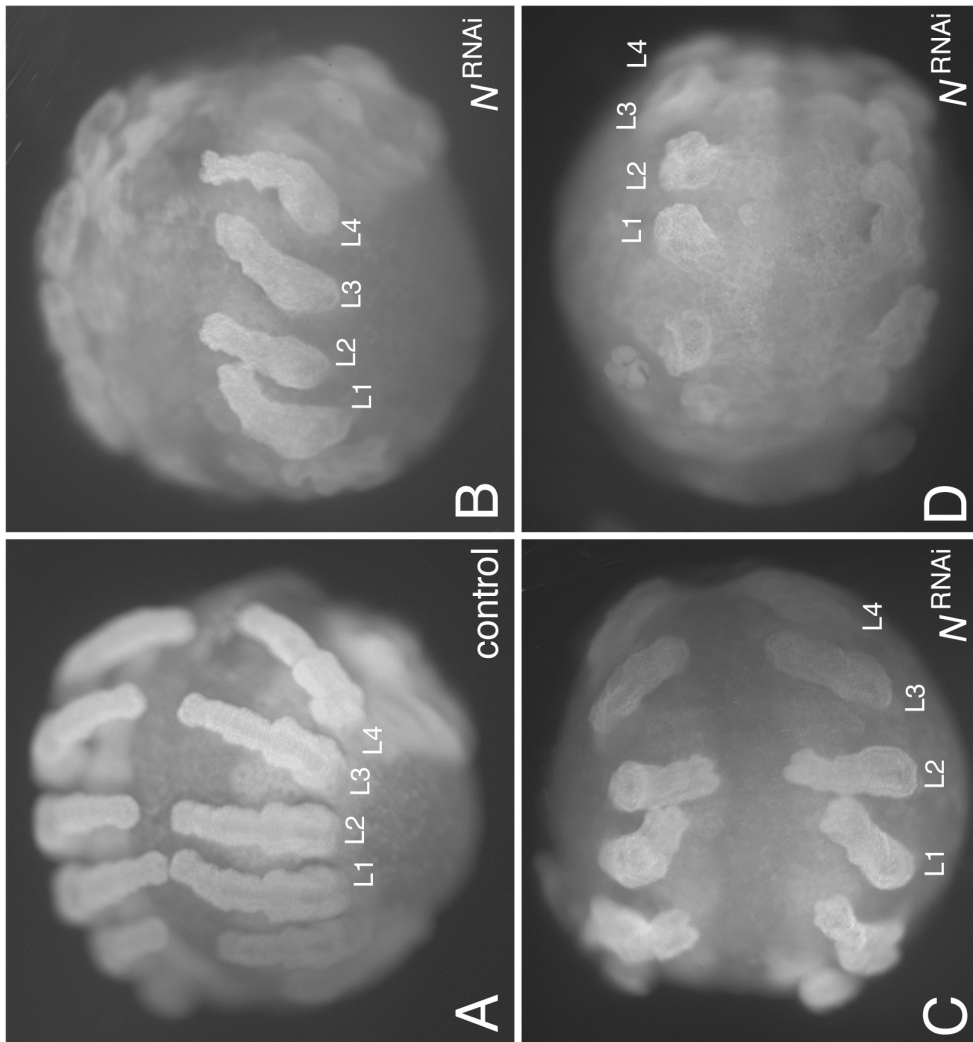


Abb. 3.75

### **Abbildung 3.77**

Der Effekt von Injektionen von *Cs-Ser* dsRNA. (A) Nicht mit dsRNA behandelter Embryo. (B-D) Die mit *Cs-Ser* dsRNA behandelten Embryos zeigen mißgestaltete und verschieden stark verkürzte Extremitäten. Die Embryonen wurden mit DAPI gefärbt. Alle Embryos in schräger Seitenlage und Ventralansicht. Abkürzungen: siehe Abkürzungsverzeichnis S. 2-5.

### **Abbildung 3.78**

Zellproliferation und Zelltod in den Laufbeinen mit *Cs-Ser* dsRNA behandelter Embryonen. (A-C) Nachweis von phosphoryliertem Histon 3 in Kontrollembryonen (A) und in mit dsRNA behandelten Embryonen (B,C). In den Beinen der behandelten Embryonen waren keine markierten Zellen zu finden. Dies deutet darauf hin, daß zum Zeitpunkt der Fixierung der Embryonen keine Zellproliferation in den Beinen mehr stattgefunden hat. (D-F) Nachweis fragmentierter DNA mittels TUNEL in den Laufbeinen von Kontrollembryonen (D) und von mit dsRNA behandelten Embryonen (E,F). Da die Verkürzung der Beine als spezifische Phänokopie angesehen wurde (siehe auch Text und Anhang 3), werden die sukzessive kürzeren Beine von B nach C, bzw. von E nach F hier als schrittweise stärkere Phänokopien interpretiert. Abkürzungen: siehe Abkürzungsverzeichnis S. 2-5.



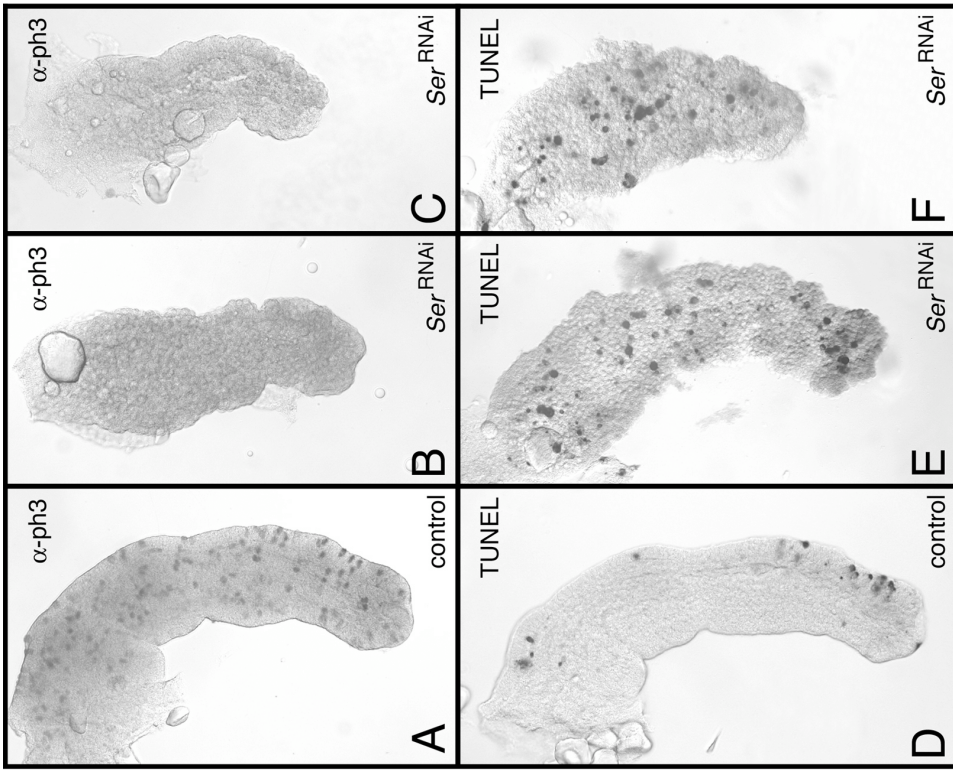


Abb. 3.78

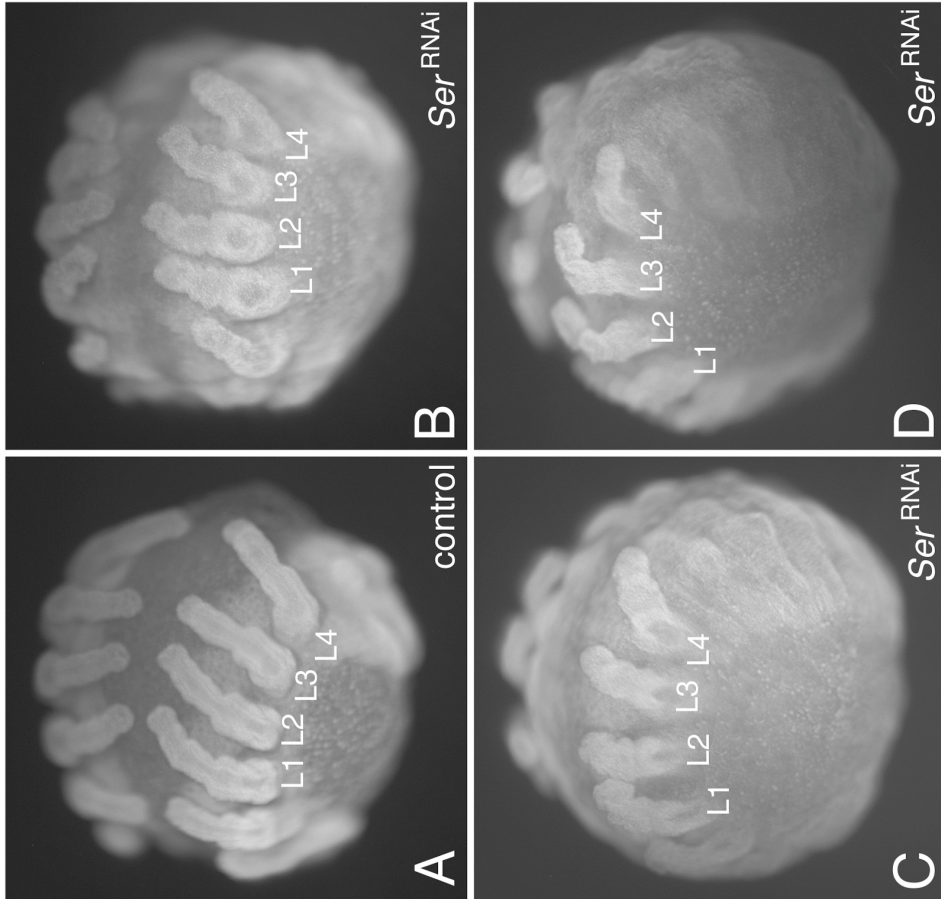


Abb. 3.77

### Abbildung 3.79

Der Effekt von Injektionen von *Cs-AP-2* dsRNA. (A) Nicht mit dsRNA behandelte Embryos in Frontalansicht. Die Expression von *Cs-AP-2* wurde mittels in situ Hybridisierung dargestellt. Pfeile: Expression in den Zentren der Medianaugen. Pfeilköpfe: Expression in den Zentren der Seitenaugen. Sternchen: Expression im Zentralkörper (siehe dazu auch Abb. 3.48). (B) Mit dsRNA behandelte Embryos in Frontalansicht und ebenfalls mit dem Nachweis für *Cs-AP-2* mRNA. Die Expression in den Gliedmaßen und in den Seitenaugenzentren (Pfeilköpfe) ist sichtbar schwächer, aber nicht völlig ausgelöscht. Beachte, daß die Extremitäten nur mäßig verkürzt sind (vgl. auch Abb. 3.80). Beachte auch, daß die Expression in den Medianaugenzentren (Pfeile) und im Zentralkörper (Sternchen) kaum abgeschwächt ist. (C,D) DAPI gefärbte Embryos, die mit *Cs-AP-2* dsRNA behandelt wurden. Ventralansichten. Beachte daß die Gliedmaßen in veränderlichem Maße verkürzt und mißgestaltet sind. Abkürzungen: siehe Abkürzungsverzeichnis S. 2-5.

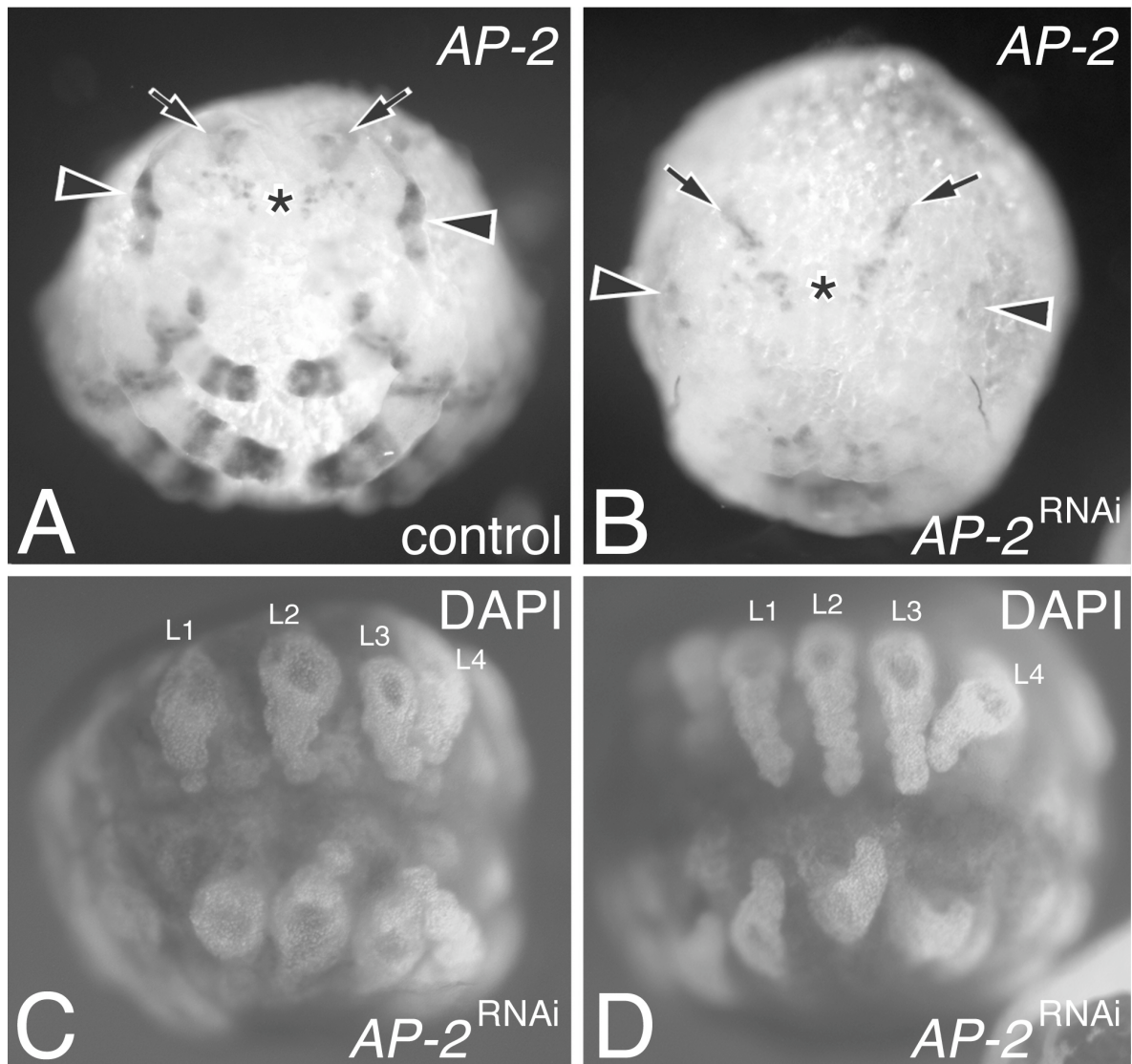


Abb. 3.79

### Abbildung 3.80

Expression von *Cs-AP-2* in den Laufbeinen mit *Cs-AP-2* dsRNA behandelter Embryonen. (A) Bein eines Kontrollembryos (unbehandelt). (B-D) Beine mit dsRNA behandelter Embryonen. In den meisten Fällen ist das normale Expressionsmuster abgeschwächt noch erhalten und die Beine sind nur mäßig fehlentwickelt (B). Bei weiterer Abschwächung der Expressionsstärke treten manche Ringe (z.B. die proximalen; Pfeil in C) nicht mehr hervor und die Beine sind stärker verkürzt (C). In wenigen Fällen exprimieren nur noch wenige, verstreute Zellen (Pfeile in D) *Cs-AP-2* und die Beine sind stark verkürzt und deformiert. Abkürzungen: siehe Abkürzungsverzeichnis S. 2-5.

### Abbildung 3.81

Zellproliferation und Zelltod in den Laufbeinen mit *Cs-AP-2* dsRNA behandelter Embryonen. (A-C) Nachweis von phosphoryliertem Histon 3 in Kontrollembryonen (A) und in mit dsRNA behandelten Embryonen (B,C). In B,C sind einige markierte Zellen beispielhaft mit einem Pfeil gekennzeichnet. Insgesamt sind es weniger markierte Zellen als in den Beinen der Kontrollembryonen. (D-F) Nachweis fragmentierter DNA mittels TUNEL in den Laufbeinen von Kontrollembryonen (D) und von mit dsRNA behandelten Embryonen (E,F). Da die Verkürzung der Beine als spezifische Phänokopie angesehen wurde (siehe auch Text und Anhang 3), werden die sukzessive kürzeren Beine von B nach C, bzw. von E nach F hier als schrittweise stärkere Phänokopien interpretiert. Abkürzungen: siehe Abkürzungsverzeichnis S. 2-5.

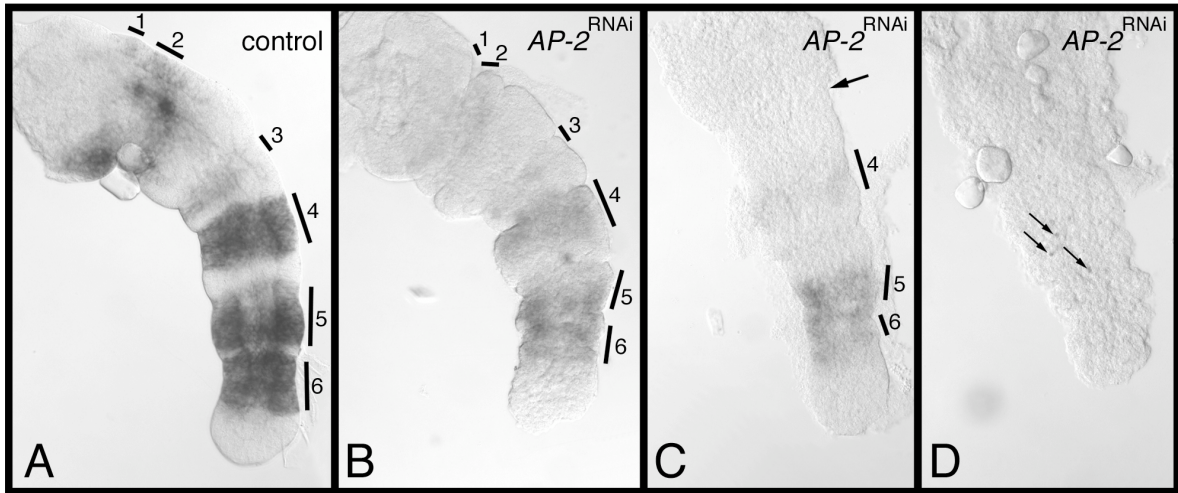


Abb. 3.80

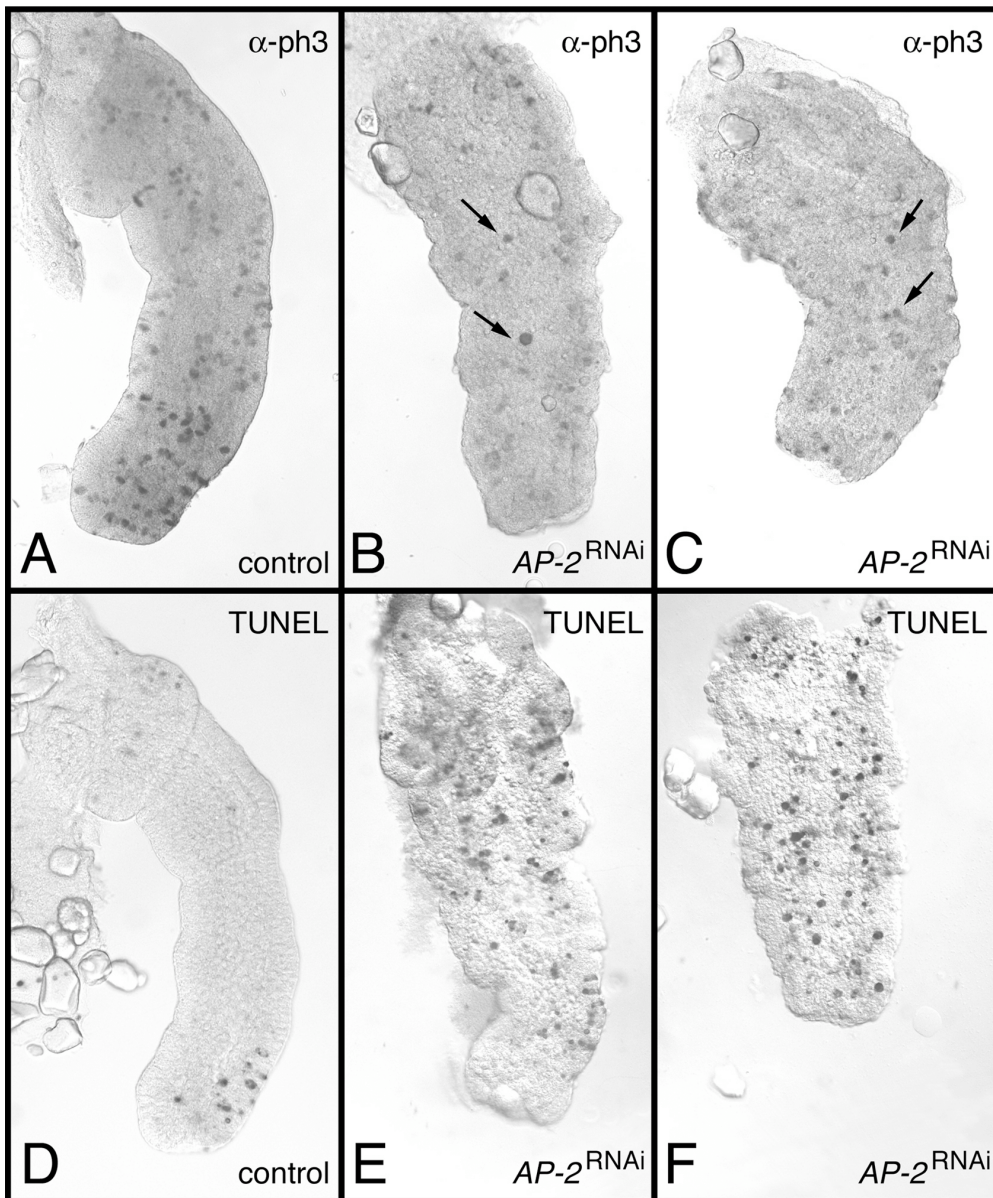


Abb. 3.81

### Abbildung 3.82

Expression von *Cs-AP-2* in mit *Cs-N* dsRNA behandelten Embryonen. (A,B) DAPI gefärbte Embryonen unter UV-Strahlung und (A',B') dazugehöriges lichtmikroskopisches Bild. In mit dsRNA behandelten Embryonen zeigen sich Entwicklungsdefekte der Gliedmaßen (siehe auch Abb. 3.75). In den betroffenen Beinen wird *Cs-AP-2* in einer breiten Bande exprimiert, die aus einem distalen Teil (starke Expression; Pfeil) und einem proximal davon gelegenen Teil (schwächere Expression; Pfeilkopf) besteht (vgl. Abb. 3.83). Die Sternchen in A' kennzeichnen nicht im Fokus liegende Beine, für die jedoch das gleiche gilt. (C,C') Ein Kontrollembryo. Es zeigt sich das normale Muster der *Cs-AP-2* Expression. Alle Embryos in Ventralansicht. Abkürzungen siehe Abkürzungsverzeichnis S. 2-5.

### Abbildung 3.83

Expression von *Cs-AP-2* in den Laufbeinen mit *Cs-N* dsRNA behandelter Embryonen. (A) Laufbein eines Kontrollembryos (unbehandelt). Das normale Expressionsmuster von *Cs-AP-2* ist zu sehen. (B,C) Laufbeine von behandelten Embryonen. Die meisten Ringe scheinen eine geschlossenen Bande zu bilden. Abkürzungen: siehe Abkürzungsverzeichnis S. 2-5.

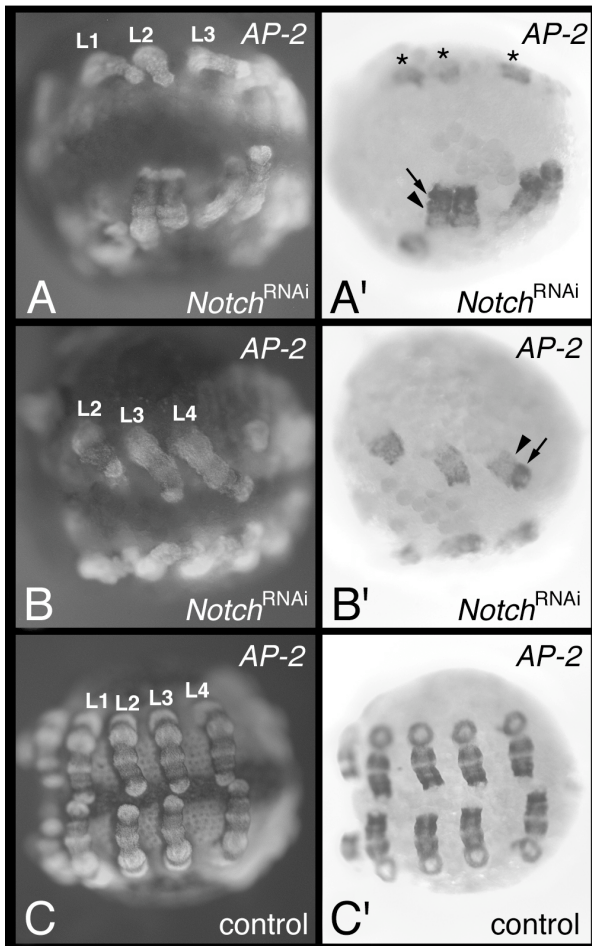


Abb. 3.82

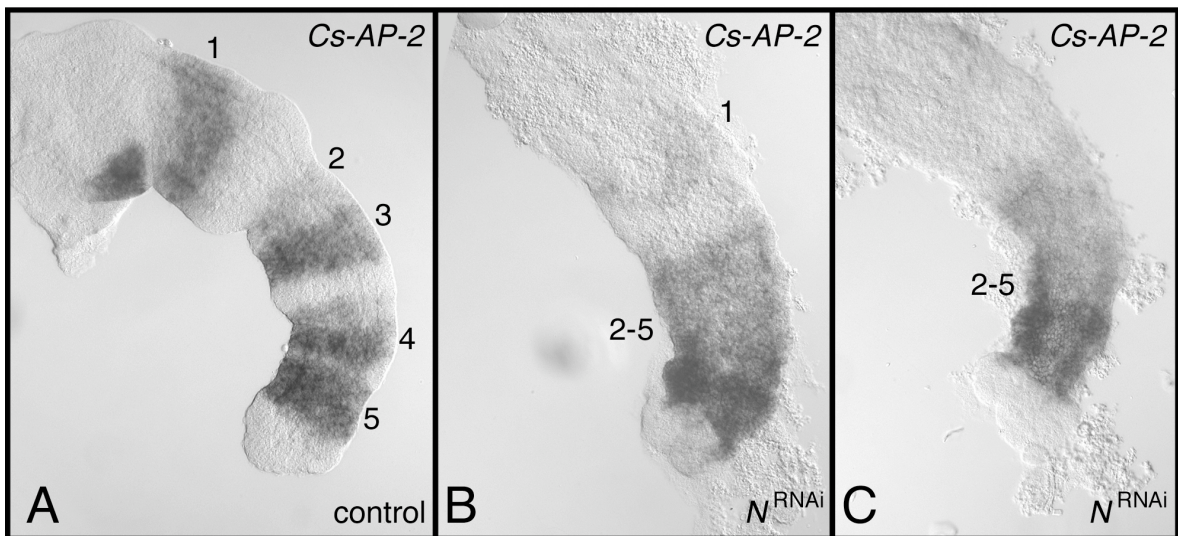


Abb. 3.83





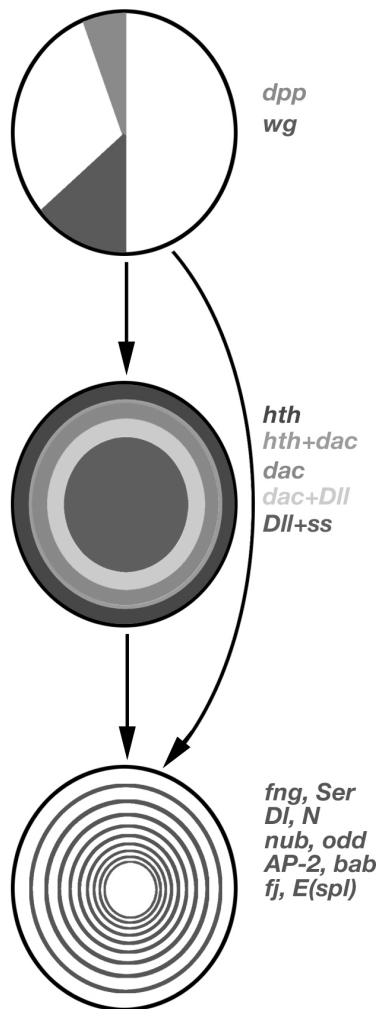
### 4. Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit sind eine Reihe von Genen in einem Tausendfüßler und einer Spinne untersucht worden. Es soll nun diskutiert werden, ob die bis dato gewonnenen Daten einen Beitrag zur Kenntnis der Evolution der Gliedmaßen bei Arthropoden leisten können.

#### 4.1 Zur evolutionären Konservierung der Musterbildungskaskade im Bein

Schon seit längerem ist bekannt, daß in *Drosophila* eine hierarchische Genkaskade die Unterteilung des Körpers in Segmente steuert (zur Übersicht siehe Rivera-Pomar und Jäckle, 1996; Klingler und Tautz, 1999). Auf der obersten Stufe stehen Gene, deren Genprodukte bereits im Ovar der Mutter ins Ei eingelagert werden, sogenannte maternale Faktoren. Diese bilden im Ei Gradienten mit größerer Reichweite und aktivieren eine Reihe zygotischer Faktoren, zu denen zunächst die Gap-Gene („Lückengene“) gehören. Diese richten sich in ihrer Expression nach dem Gradientensystem, das von den maternalen Faktoren vorgegeben wird und sind in großflächigen, aber scharf umrissenen Domänen exprimiert. Ihr Name rührt daher, daß bei ihrem Ausfall in Mutanten die jeweiligen Körperregionen fehlen, in denen das betreffende Gap-Gen exprimiert ist. Eine sukzessive weitere Unterteilung des Fliegenkörpers wird in der Folge von den Paarregel- und Segmentpolaritätsgenen erreicht, die teilweise von den Gap-Genen kontrolliert werden oder sich untereinander regulieren. Das Ergebnis ist ein vollständig segmentierter Körper, wie er für Arthropoden typisch ist.

Interessanterweise haben jüngst Untersuchungen der Beinentwicklung in *Drosophila* gezeigt, daß auch hier eine Genkaskade aktiv ist, die das Bein in die richtige Anzahl von Beinsegmenten, die sogenannten Podomere, unterteilt (Rauskolb und Irvine, 1999; Abb. 4.1). Ganz ähnlich wie bei der Körpersegmentierung stehen auch hier Gene an



**Abbildung 4.1**

Schematische Darstellung der Bein-Segmentierungskaskade in *Drosophila* Beinscheiben nach Rauskolb und Irvine (1999). Die oberste Ebene bilden die Gene *dpp* und *wg*. Sie steuern die nächsten Ebenen der Bein-Gap-Gene (Mitte) und Bein-Segmentierungsgene (unten). Abkürzungen siehe Verzeichnis S. 2-5.

oberster Position, die weitreichende Gradienten ausbilden.

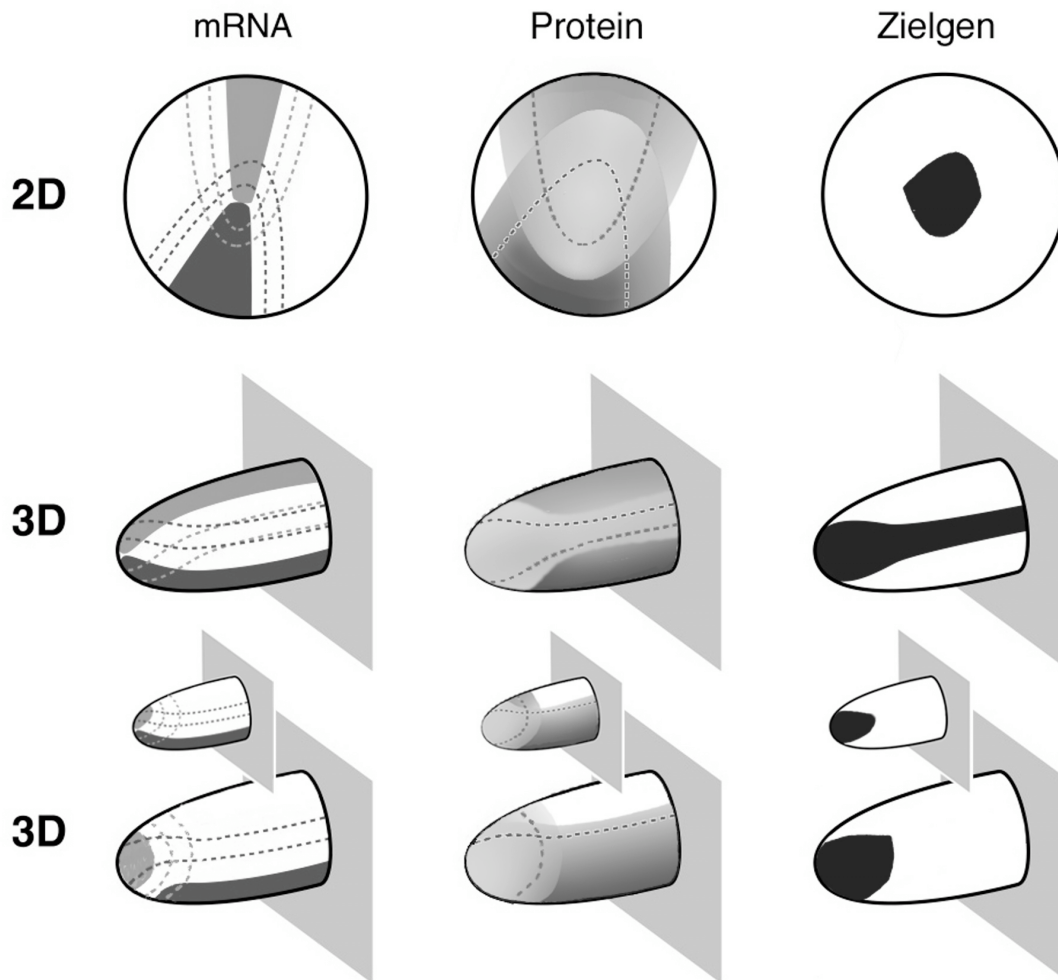
Bei diesen Genen handelt es sich um die Morphogene *dpp* und *wg* (z.B. Diaz-Benjumea et al., 1994). Wie bei der Segmentierungskaskade im Körper wo die Gap-Gene sich nach den Gradienten der zygotischen Gene orientieren, werden die Positionsinformationen im *dpp/wg*-Gradienten von einer Reihe nachgeschalteter Gene genutzt, um in breiten, aber scharf abgegrenzten Domänen exprimiert zu werden (z.B. Lecuit und Cohen, 1997). Interessanterweise ist für einige dieser Gene (z.B. *extradenticle*, *homothorax*, *dachshund* und *Distal-less*), gezeigt, daß bei ihrem Ausfall auch der ihrer Expressionsdomäne entsprechende Teil des Beines fehlt (Cohen et al., 1989; Mardon et al., 1994; Rauskolb et al., 1995; Gonzalez-Crespo und Morata, 1995; Wu und Cohen, 2000). Aufgrund dieser Ähnlichkeiten zu den Gap-Genen werden sie kollektiv als Bein-Gap-Gene bezeichnet (Rauskolb, 2001). Schließlich mehren sich die Hinweise, daß die Bein-Gap-Gene eine Vielzahl nachgeschalteter Gene kontrollieren, die für die Bildung der Gelenke verantwortlich sind (Rauskolb und Irvine, 1999; Rauskolb, 2001). Diese Gene, zu denen vor allem Teile des *Notch*-Signalwegs und dessen Zielgene gehören (z. B. *Notch*, *Serrate*,

*Delta*, *Enhancer of split*, *odd-skipped* u.a.), bestimmen letztlich die Lage der Segmentgrenzen und können somit zusammenfassend als Beinsegmentierungsgene bezeichnet werden. Es soll nun zunächst um die Frage gehen, ob sich Anzeichen finden lassen, daß diese Beinsegmentierungskaskade innerhalb der Arthropoden konserviert ist.

### 4.1.1 Die Ebene der Morphogen-Gradienten

Die Morphogene *dpp* und *wg* sind in der Beinscheibe von *Drosophila* in einem dorsalen bzw. ventralen Sektor exprimiert (z.B. Campbell et al., 1993). Während die Expression von *wg* weitgehend konserviert erscheint (siehe dazu auch Damen, 2002; Janssen et al., 2004), gilt das Gegenteil für die Expression von *dpp*: in *Cupiennius* und zum größten Teil auch in *Glomeris* ist *dpp* an der Spitze der Beine exprimiert. Auch in anderen Arthropoden zeigt sich ein ähnliches Bild. Während *wg* in den Extremitäten meist in einem ventralen Streifen exprimiert ist, ist *dpp* auf die Gliedmaßenspitze beschränkt (z.B. Nulsen und Nagy, 1999; Hughes und Kaufman, 2002; Sanchez-Salazar et al., 1996; Niwa et al., 2000; Jockusch et al., 2000; Yamamoto et al., 2004; Akiyama-Oda und Oda, 2003). Das könnte also ein Hinweis sein, daß bereits die Ebene der Morphogen-Gradienten innerhalb der Arthropoden nur teilweise oder gar nicht konserviert ist. Ich möchte hier aber die Gegenthese vertreten, die besagt, daß die Expression an der Spitze der Beine die notwendige Voraussetzung dafür ist, daß in den stabförmigen embryonalen Beinen von z.B. *Cupiennius* und *Glomeris* die gleichen Musterbildungsprozesse ablaufen können, wie sie in der flachen Imaginalscheibe *Drosophilas* stattfinden.

Den Podomeren des Beines adulter Fliegen entsprechen in den Beinscheiben konzentrische Ringe (Schubiger, 1968; Fristrom und Fristrom, 1975, 1993; Condic et al., 1991). Somit müssen auch die Gene, welche für die Spezifikation der Podomere zuständig sind in der Beinscheibe in ring- oder kreisförmigen Domänen exprimiert sein. Das wird durch einen besonderen Mechanismus erreicht, der die beiden Morphogene *dpp* und *wg* involviert (Abb. 4.2, obere Reihe; nach Lecuit und Cohen, 1997; Jiang und Struhl, 1996). Beide Gene werden in schmalen Sektoren exprimiert, *dpp* auf der dorsalen, *wg* auf der ventralen Seite (Fig. 4.2, obere Reihe links; z. B. Campbell et al., 1993). Die Zellen die *dpp* oder *wg* mRNA exprimieren, akkumulieren auch größere Mengen an DPP oder WG Protein, welches die Zellen verläßt und forttransportiert wird (dieser Vorgang ist



**Abbildung 4.2**

Divergentes distales Morphogen-Signalsystem in Imaginalscheiben und embryonalen Beinauswüchsen (zweidimensionale bzw. dreidimensionale Musterbildung). Die linke Spalte zeigt die mRNA Expression von *dpp* (grün) und *wg* (rot). In diesen Bereichen wird DPP bzw. WG Protein produziert und in benachbarte Bereiche transportiert. Je zwei verschiedene Grenzwerte an Proteinkonzentration sind durch die gestrichelten Linien dargestellt. Die resultierenden Proteingradienten sind in der mittleren Spalte dargestellt (Überschneidung ist gelb). Ein Beispiel-Zielgen (blau, rechte Spalte) soll überall dort aktiviert werden, wo die Konzentration beider Morphogene über einem gewissen Schwellenwert (gestrichelte Linien, mittlere Spalte) liegt. Die obere Reihe zeigt die Verhältnisse in *Drosophila*. In der mittleren Reihe sind die *Drosophila* Muster unverändert auf ein typisches embryonales Bein übertragen. Es resultiert keine geeignete Zielgenexpression. Die untere Reihe zeigt die vorgeschlagenen Verhältnisse für *Cupiennius* (große Abbildungen) und *Tribolium*, *Gryllus*, *Schistocerca* (kleinere Abbildungen; nach mehreren Quellen: siehe Text). Die kleinen Unterschiede zwischen den Expressionsmustern beeinflussen das Ergebnis nicht. Siehe auch Text.

vornehmlich in Flügelscheiben untersucht worden; es wird aber angenommen, daß er ganz ähnlich auch in Beinscheiben und in embryonalen Geweben abläuft; Van den Heuvel et al., 1989; Struhl und Basler, 1993; Lecuit et al., 1996; Nellen et al., 1996; Zecca et al., 1996;

Teleman und Cohen, 2000; Greco et al., 2001). Auf diesem Weg entstehen zwei hyperbelförmige und teilweise überlappende Gradienten abnehmender Proteinkonzentration (Fig. 4.2, obere Reihe Mitte). Diese dienen zur Aktivierung oder Reprimierung einer Zahl von Zielgenen in einer Schwellenwert-abhängigen Weise (z.B. Brook und Cohen, 1996; Lecuit und Cohen, 1997). Allerdings benötigen die meisten Zielgene zu ihrer Aktivierung (oder Reprimierung) ganz bestimmte Mindest- bzw. Höchstkonzentrationen nicht nur eines sondern beider Morphogene (Lecuit und Cohen, 1997). Somit wird die Fläche in der sie aktiviert werden stets der Schnittmenge der von den Grenzwerten abgesteckten Teilflächen der WG und DPP Gradienten entsprechen. Da diese Grenzwerte, ebenso wie die WG und DPP Gradienten, hyperbelförmig sind, werden ihre Schnittmengen immer mehr oder weniger kreisförmige Flächen abstecken (Fig. 4.2, obere Reihe rechts). Unter der Verwendung zweier Grenzwerte können zusätzlich auch ringförmige Domänen ausgewiesen werden (siehe Almirantis und Papageorgiou (1999) bezüglich einer detaillierten Beschreibung der Schnittmengenbildung innerhalb von Morphogengradienten). Zusammenfassend gesagt führt das Zusammenwirken der Morphogene WG und DPP zur Aktivierung von Zielgenen in konzentrischen, ring- oder kreisförmigen Domänen.

Die Entwicklung der Beine aus flachen, praktisch zweidimensionalen Imaginalscheiben stellt innerhalb der Arthropoden die Ausnahme dar. Die meisten Arthropoden entwickeln ihre Beine direkt als dreidimensionale Auswüchse. Kann der Modus der Morphogengradienten von der zweidimensionalen Beinscheibe direkt auf den dreidimensionalen Beinauswuchs der übrigen Arthropoden übertragen werden? Dazu müßte in einem Beinauswuchs *dpp* entlang der dorsalen Seite und *wg* entlang der ventralen Seite exprimiert sein (Fig. 4.2, mittlere Reihe). Das Gedankenexperiment in Fig. 4.2 zeigt, daß durch die dritte Dimension die Grenzwerte innerhalb der Morphogengradienten nicht mehr hyperbelförmig, sondern sattelförmig sind und somit nicht mehr kreisförmige Domänen abgrenzen, sondern Flächen die sich seitlich das Bein entlangziehen. Diese Expressionsdomänen wären wohl kaum geeignet die Podomerspezifikation zu kontrollieren. Kreisförmige Domänen wie in den Beinscheiben resultieren in den dreidimensionalen Beinen erst dann, wenn entweder *dpp* oder *wg* Expression auf die Spitze beschränkt bleibt (Fig. 4.2, untere Reihe).

Auf der Basis dieser Überlegungen erscheint es wahrscheinlich, daß die Aktivierung von Zielgenen durch die Kombination von WG und DPP Gradienten in *Cupiennius* und *Glomeris* konserviert ist. Die Expression von *dpp* ist auf die Beinspitze

beschränkt, da sonst keine kreis- oder ringförmigen Zielgenexpressionen generiert würden. Eine Vorhersage dieser Hypothese ist, daß auch in anderen Arthropoden mit dreidimensionalen Beinknospen die Expression eines der beiden Morphogene auf die Beinspitze beschränkt sein sollte. In guter Übereinstimmung mit dieser Vorhersage ist die Expression von *dpp* in *Tribolium*, *Gryllus*, *Schistocerca*, *Athalia* und einer weiteren Spinnenart (*Achaearanea tepidariorum*) auf die Spitze der Beine beschränkt (Sanchez-Salazar et al. 1996; Niwa et al., 2000; Jockusch et al., 2000; Yamamoto et al., 2004; Akiyama-Oda und Oda, 2003). Eine experimentelle Prüfung der Hypothese wäre die erzwungene Expression von *dpp* entlang der ganzen dorsalen Beinseite in einer Art in der *dpp* normalerweise nur an der Spitze der Beine exprimiert ist, und die anschließende Beobachtung der Zielgenexpressionsmuster. Solche Manipulationen sind derzeit nicht möglich; jedoch erscheint vor allem *Tribolium* als aussichtsreicher Kandidat bei dem solche Versuche vielleicht bald möglich sein werden.

Obwohl die Quelle für DPP Protein auf die Beinspitze beschränkt ist, ist es trotzdem möglich, daß DPP die Musterbildung auch proximaler Beinbereiche organisiert. Studien in Flügelscheiben aus *Drosophila* haben gezeigt, daß DPP noch Zellen in einer Entfernung von 20 bis 25 Zelldurchmessern von der DPP Quelle beeinflussen kann (Nellen et al., 1996; Lecuit et al., 1996; Entchev et al., 2000). Das wäre völlig ausreichend für die sehr kurzen Beine von *Glomeris* und auch für Beinknospen und junge Beine in *Cupiennius*. In *Cupiennius* nimmt die Expression in der Spitze in älteren Stadien dann auch ab; möglicherweise ist *dpp* für die Musterbildung in älteren Stadien nicht mehr notwendig, weil nachgeschaltete Systeme die Aufrechterhaltung der Distalisierungsfunktion von *dpp* übernehmen. Ähnliches ist jüngst für *Drosophila* bekanntgeworden (Galindo et al., 2002; Campbell, 2002).

### 4.1.2 Die Bein-Gap-Gene

In *Drosophila* orientieren sich die Expressionsdomänen der Bein-Gap-Gene an den Gradienten von WG und DPP (z.B. Lecuit und Cohen, 1997). Höhere WG/DPP Konzentrationen finden sich im distalen Bereich und aktivieren die Expression von *Dll*. Niedrigere Konzentrationen führen dagegen zur Aktivierung von *dac* in einer breiten mittigen Expressionsdomäne. Schließlich führt unter anderem der Einfluß von WG und DPP zur Reprimierung von *hth*, welches daher nur proximal exprimiert wird, wo der

Einfluß der Morphogene am geringsten ist (z.B. Abu-Shaar und Mann, 1998). Somit sorgt der WG/DPP Gradient in der Anfangszeit der Beinscheibenentwicklung vereinfachend dargestellt für eine grobe Einteilung des Beines in einen proximalen Teil (mit *hth* Expression), einen mittleren Teil (mit *dac* Expression) und einen distalen Teil (mit *Dll* Expression). In der Folge wird diese Unterteilung aufrechterhalten, indem sich *hth*, *dac* und *Dll* gegenseitig beeinflussen und ihre Grenzen somit selbständig ohne den ständigen Input des WG/DPP Gradienten festigen (Abu-Shaar und Mann, 1998; Wu und Cohen, 1999). Eine Hauptrolle kommt hierbei dem *dac* Gen zu, das als Antagonist sowohl zu *hth* als auch zu *Dll* auftritt. Es definiert dadurch nicht nur den mittleren Bereich des Beines als eigenständigen Entwicklungsbereich, sondern trennt gleichzeitig auch den proximalen und den distalen Teil sehr scharf voneinander. Genetische Experimente in *Drosophila* zeigen, daß diese Tripartie eine Grundeigenschaft des Beines in *Drosophila* ist, ohne die die Entstehung einer normalen Laufbeinmorphologie nicht möglich ist (Dong et al. 2000, 2001, 2002). Es stellt sich daher die Frage ob der Laufbeinmorphologie anderer Arthropoden eine ähnliche Tripartie zu Grunde liegt.

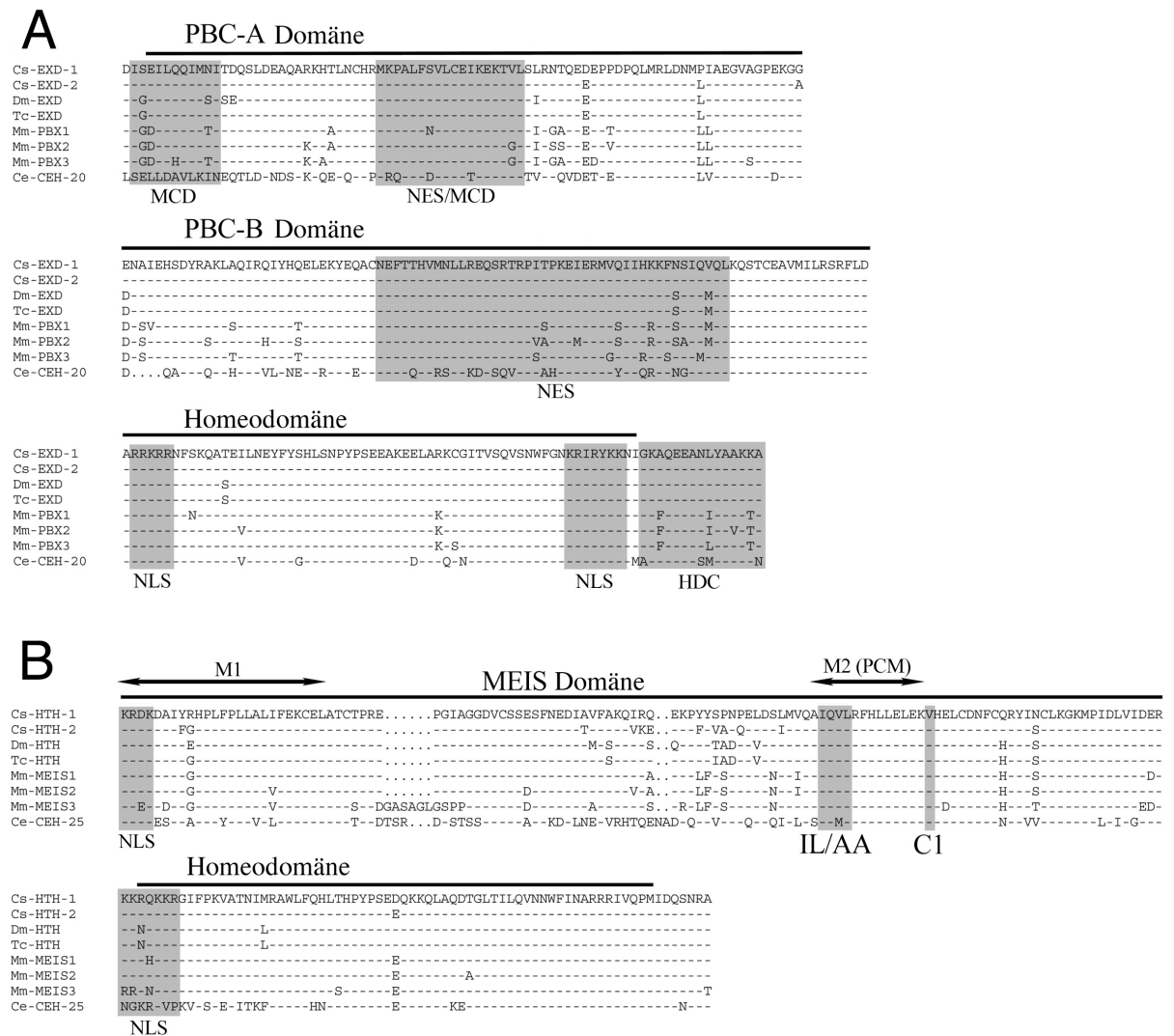
Was die Gene *dac* und *Dll* betrifft, so widersprechen die Expressionsmuster sowohl in *Cupiennius* als auch in *Glomeris* nicht der Annahme, daß die Tripartie konserviert ist. Das *dac* Gen ist jeweils in einem Ring etwa auf halber Höhe im Bein exprimiert und *Dll* ist im gesamten distalen Bereich der Beine exprimiert. Zusätzlich haben RNAi-Experimente mit *Dll* in *Cupiennius* gezeigt, daß die Interferenz mit *Dll* zu Störungen in der Beinentwicklung führt, wenngleich leider nicht nachgewiesen werden konnte, welcher Anteil des Beines (der distale Teil?) tatsächlich betroffen war (Schoppmeier und Damen, 2001). Soweit die Expression von *dac* und *Dll* in den Laufbeinen anderer Arthropodenarten untersucht wurde, stimmen die Ergebnisse mit den hier gezeigten überein (z.B. Abzhanov und Kaufman, 2000; Prpic et al., 2001; Inoue et al., 2002) und unterstützen zusätzlich die These, daß die Tripartie eine Eigenschaft der Laufbeine aller Arthropoden ist.

Ganz anders verhält es sich mit der Expression von *hth*. Weder in *Cupiennius* noch in *Glomeris* ist die Expression von *hth* auf proximale Beinanteile beschränkt und die Expression von *hth* überschneidet sich großzügig mit derjenigen der beiden anderen Bein-Gap-Gene. Ist das ein Hinweis, daß die Tripartie in Wahrheit nicht konserviert ist? Ich meine nein. Die Grundlage für diese These ist die Funktionsweise von *hth* in *Drosophila*. Das HTH Protein ist nämlich auf einen Kofaktor angewiesen, der vom Gen *exd* kodiert wird (Rauskolb et al., 1995; Rieckhof et al., 1997). EXD besitzt sowohl nukleäre Export-

als auch Importsignale (NES, NLS). Es wird also nach seiner Synthese im Zytoplasma in den Kern transportiert, aber sofort auch wieder exportiert (z.B. Berthelsen et al., 1999; Abu-Shaar et al., 1999). Auf diese Weise kann es seine Funktion als Transkriptionsfaktor nicht erfüllen. HTH dagegen scheint mehrere Importsignale zu besitzen, doch in der Normalkonfiguration des Proteins sind sie für die nukleären Importmechanismen nicht zugänglich und das HTH Protein verbleibt größtenteils im Zytoplasma (Rieckhof et al., 1997; Pai et al., 1998; Jaw et al., 2000). Somit ist auch HTH nicht in der Lage seine Funktion als Transkriptionsfaktor wahrzunehmen. Erst wenn beide Proteine im Zytoplasma Heterodimere bilden, d.h. sie müssen in der selben Zelle koexprimiert sein, werden durch die Dimerisierung Konformationsänderungen hervorgerufen, die offenbar die NES von EXD maskieren und gleichzeitig die NLS von HTH zugänglich machen (Berthelsen et al., 1999; Abu-Shaar et al., 1999). Obwohl noch einige Fragen bezüglich der Funktionsweise von HTH und EXD ungeklärt sind (Affolter et al., 1999), so ist gesichert, daß sich der funktionelle Bereich von *exd* und *hth* auf das Gebiet ihrer Koexpression beschränkt. Es genügt dem Organismus also einen der beiden Faktoren in seiner Expression auf die Gebiete zu beschränken, in denen die Funktion erwünscht ist; der zweite Faktor kann dann theoretisch ubiquitär exprimiert sein, weil er in Bereichen in denen sein Kofaktor nicht exprimiert ist, automatisch nicht funktionell ist. Eben dieses ist in *Drosophila* zu beobachten: *exd* ist in der gesamten Beischiibe exprimiert, wohingegen die Expression von *hth* auf die proximalen Beinanteile beschränkt wird.

Nehmen wir nun an, daß der für *Drosophila* beschriebene Mechanismus in *Cupiennius* und *Glomeris* der gleiche ist. Bei der Betrachtung der Expressionsmuster von *hth* und *exd* fällt dann sofort auf, daß auch in diesen zwei Arten trotz der gravierenden Unterschiede in den Mustern der einzelnen Gene, die Koexpression ebenfalls nur in den proximalen Beinanteilen zu finden ist. Die Muster in *Drosophila* auf der einen Seite und *Cupiennius*/*Glomeris* auf der anderen Seite scheinen also funktionell gleichwertig zu sein. Diese Annahme kann zusätzlich gestützt werden: Untersuchungen in *Drosophila* haben in den EXD und HTH Proteinen mehrere Bereiche identifiziert, die entweder für die Interaktion der Proteine mit den nukleären Export-/Importmechanismen notwendig sind oder für die Interaktion der beiden Proteine bei der Dimerisierung verwendet werden (Abu-Shaar et al., 1999; Ryoo et al., 1999; Knoepfler et al., 1997; Berthelsen et al., 1999; Jaw et al., 2000; Kurant et al., 2001). Alle bisher identifizierten Bereiche sind in den Proteinen aus *Cupiennius* und *Glomeris* hochkonserviert (Fig. 4.3 und Daten nicht gezeigt).





**Abbildung 4.3**

Sequenzalignement der konservierten Bereiche in EXD/PBX (A) und HTH/MEIS (B) Proteinen. Striche bedeuten identische Aminosäuren. Punkte bedeuten Lücken. Grau unterlegt sind Bereiche, die nach anderen Untersuchungen für nukleären Ex-/Import oder für Protein-Protein Interaktionen gebraucht werden (M1, M2, IL/AA, C1: siehe Knoepfler et al., 1997; Jaw et al., 2000; Kurant et al., 2001). MCD, MEIS cooperativity domain; PCM, PBX cooperativity domain; HDC, Helix C-terminal von der Homeodomäne. Weitere Abkürzungen s.S. 2-5.

### 4.1.3 Die Bein-Segmentierungsgene

In *Drosophila* sind immer wieder Gene bekannt geworden, die in segmental wiederholten, konzentrischen Kreisen in den Beinscheiben exprimiert werden. Als Beispiele seien hier genannt: *N*, *Dl*, *Ser*, *E(spl)*, *AP-2*, *nub* und *odd*, aber es gibt noch viele weitere solcher Gene. Im Vergleich zu den weiter oben beschriebenen Genen wurde diesen Genen relativ

wenig Aufmerksamkeit geschenkt, was wohl hauptsächlich mit der komplizierten Architektur der in Falten gelegten Beinscheibe von *Drosophila* zu tun hat. Auf Grund der Faltungen sind die einzelnen Expressionsringe optisch nur schwer voneinander zu trennen und das räumliche und zeitliche Expressionsprofil ist somit nur mit großem Aufwand zu bestimmen. Das Expressionsmuster dieser Gene legt aber bereits nahe, daß sie etwas mit der Gelenkbildung und somit etwas mit der Beinsegmentierung zu tun haben. Erst in jüngerer Zeit sind einige von diesen Genen näher untersucht worden. Dabei zeigte sich zum einen, daß die meisten dieser Bein-Segmentierungsgene entweder Teile des *Notch*-Signalweges sind oder von diesem kontrolliert werden. Zum anderen erbrachte vor allem die Arbeit von Cordelia Rauskolb die Einsicht, daß die Bein-Segmentierungsgene der übergeordneten Kontrolle der Bein-Gap-Gene unterliegen (Rauskolb und Irvine, 1999; Rauskolb, 2001).

### *Mitglieder des Notch-Signalwegs*

Als erster Schritt zu einer Beurteilung ob diese unterste Ebene in der Bein-Segmentierungs-Kaskade innerhalb der Arthropoden konserviert ist, wurde die Expression einer Reihe von homologen Genen aus *Cupiennius* untersucht. Aus dem *Notch*-Signalweg waren dies *Cs-N*, *Cs-Dl-1* und *Cs-Ser*. Ebenso wie in *Drosophila* (z.B. de Celis et al., 1998; Bishop et al., 1999; Rauskolb und Irvine, 1999; Mishra et al., 2001) zeigen sich segmental wiederholte, ringförmige Expressionsdomänen in den Beinen. Diese Ähnlichkeit legt eine Konservierung ihrer Aufgabe bei der Beinentwicklung zumindest nahe. RNAi mit *Cs-N* und *Cs-Ser* zeigt zusätzlich, daß diese Gene eine Rolle bei der Beinmorphogenese spielen (siehe unten). Eine Rolle bei der Bildung der Segmente konnte allerdings nicht untersucht werden, da dazu die injizierten Embryos bis zur Ausbildung der Kutikula am Leben erhalten werden müßten, was derzeit noch nicht möglich ist. In *Drosophila* dienen *Dl* und *Ser* als Liganden für den Rezeptor *N* (zur Übersicht siehe Fleming (1998); Klueg und Muskavitch, 1999). *Dl* und *Ser* exprimierende Zellen und Zellen mit erhöhter Zahl von *N* Rezeptoren liegen deshalb meist dicht nebeneinander und unterhalten eine intensive Zell-Zell-Kommunikation. Die Grenze zwischen diesen Zellen könnte daher für die Beinsegmentierung eine ähnliche Bedeutung haben wie die Parasegmentgrenze bei der Körpersegmentierung. Für eine Diskussion der Beziehung zwischen *N*, *Dl* und *Ser* in *Cupiennius* ist die bisher vorliegende Datenbasis noch nicht ausreichend. Auf der Basis der

mRNA Expressionsmuster (die nicht unbedingt mit der Verteilung der entsprechenden Proteine übereinstimmen müssen) sieht es tatsächlich so aus, als wären die Ringe von *Cs-Ser* auf der einen Seite und *Cs-N* auf der anderen Seite zumindest teilweise komplementär, wie man es erwarten würde, wenn *Cs-Ser* ein Ligand für *Cs-N* ist.

### *Potentielle Zielgene des Notch-Signalweges*

Die Expression der Gene der *E(spl)*-Gruppe aus *Drosophila* dient meist als Indikator für die Aktivität des *Notch*-Signalweges (de Celis et al, 1998; Bishop et al., 1999; Kerber et al., 2001). Wie bereits erwähnt, ist die Schnittstelle zwischen *Dl/Ser* exprimierenden und *N* exprimierenden Zellen ein Ort erhöhter Aktivität des *Notch*-Signalwegs und folglich sind manche *E(spl)*-Gene in Ringen im Bein exprimiert, die mit den Orten erhöhter *N* Expression zusammenfallen (de Celis et al., 1996; 1998; Bishop et al., 1999). *E(spl)* ist Mitglied einer großen Familie von Paraloga in *Drosophila* (insgesamt 13 Gene), zu denen auch das Segmentierungsgen *hairy (h)* gehört. Das *h* Gen ist allerdings nicht in Ringen im Bein exprimiert (Carroll und Whyte, 1989). In *Cupiennius* konnte bislang nur ein einziges Mitglied dieser Gengruppe isoliert werden. Es ist wie *Drosophila h* im Keimstreif in segmentalen Streifen exprimiert und gruppiert auch in der phylogenetischen Analyse mit *h*. Es wurde daher als *Cs-h* bezeichnet. Überraschenderweise ist es aber im Bein in Ringen exprimiert, die sehr gut mit den Ringen der *Cs-N* Expression übereinstimmen und ähnelt darin eher *E(spl)* als *h*. Da offenbar in *Cupiennius* nur dieses eine Gen der *h/E(spl)* Gengruppe existiert, liegt die Vermutung nahe, daß *Cs-h* die Funktionen von *h* und *E(spl)* in sich vereint. In diesen Punkten-Expression in Ringen und Verbindung zum *Notch*-Signalweg- sind sich also *E(spl)* und *Cs-h* ähnlich. Über die Tatsache hinaus, daß *E(spl)* ein Zielgen des *Notch*-Signalweges ist, ist über seine genaue Funktion während der Beinentwicklung in *Drosophila* aber nichts bekannt, und somit können auch weitergehende Vergleiche zwischen *Drosophila* und *Cupiennius* noch nicht angestellt werden.

Gleiches gilt auch für das Gen *nubbin*. In den Beinen von *Drosophila* ist *nub* in segmentalen Ringen exprimiert (Ng et al., 1995; Rauskolb und Irvine, 1999; Mirth und Akam, 2002). Darüber hinaus ist seine Funktion während der Beinentwicklung noch nicht untersucht worden. Allerdings hat sich in einem anderen Zusammenhang, nämlich während der Flügelentwicklung, gezeigt, daß auch *nub* offenbar der Kontrolle des *Notch*-

Signalweges unterliegt und es darf vermutet werden, daß in der Beinscheibe ähnliche Verhältnisse vorliegen (Neumann und Cohen, 1998). In *Cupiennius* ist das entsprechende Gen *Cs-nub* ebenfalls in Ringen exprimiert, die allerdings nicht mit den *Cs-N* Ringen sondern eher (aber mit Ausnahmen!) mit den Ringen der *Notch*-Liganden zusammenfallen. Zumindest die Expression in Ringen ist daher als konserviert anzusehen. Daten aus anderen Arthropoden, nämlich Crustaceen, belegen die Expression in Ringen auch dort, was deutlich dafür spricht, daß *nubbin* eine evolutionär konservierte Rolle in der Beinentwicklung spielt (Averof und Cohen, 1997). Welche das ist, bleibt noch zu klären.

Auch vom Gen *odd* war lange Zeit nicht mehr bekannt, als daß es in segmentalen Ringen in der Beinscheibe exprimiert ist (Cohen, 1993). Auch in *Cupiennius* konnte ein *odd* Homologon isoliert werden, *Cs-odd-1*, das in segmentalen Ringen im Bein exprimiert ist. Jüngst sind mehrere Studien der *odd* Funktion in *Drosophila* erschienen, die allerdings nicht mehr für die in dieser Arbeit vorgestellten Experimente berücksichtigt werden konnten (Hao et al., 2003; de Celis Ibeas et al., 2003). Somit bleibt auch für *Cs-odd-1* und *odd* noch zu klären, ob eine evolutionäre Konservierung ihrer Rolle über die Expression in Ringen hinausgeht.

Abschließend soll hier das *AP-2* Gen behandelt werden. Über seine Funktion in *Drosophila* lagen zu Beginn der hier zusammengefaßten Arbeiten bereits detaillierte Untersuchungen vor (Monge und Mitchell, 1998; Kerber et al., 2001; Monge et al., 2001), weswegen es auch für die vergleichende Analyse herangezogen wurde. Neben seiner Expression in Ringen ist beschrieben worden, daß es ein Zielgen des *Notch*-Signalweges ist und einerseits für die Ausbildung der Gelenke gebraucht wird, andererseits aber auch bei seinem Ausfall zu einer starken Verkürzung der Beine führt und somit wohl auch Vorgänge wie Zellteilung und Zelltod beeinflusst. In *Cupiennius* ist *Cs-AP-2* ebenfalls in Ringen exprimiert. Allerdings sind diese Ringe im Gegensatz zu *Drosophila* sehr breit und nicht nur auf die Zellen in der direkten Nähe zum Gelenk beschränkt. Die einzelnen Ringe der *Cs-AP-2* Expression gehen im Laufe der Beinentwicklung fast alle durch Spaltung auseinander hervor. Somit exprimieren nahezu alle Zellen der Beine zu irgendeinem Zeitpunkt einmal *Cs-AP-2*, auch wenn sie die Expression in der Folge einstellen. Fast alle Zellen scheinen also *Cs-AP-2* zu brauchen. Die Aufgabe von *Cs-AP-2* liegt offenbar bei der Aufrechterhaltung der Zellproliferation, da *Cs-AP-2* Phänokopien deutlich erniedrigte anti-ph3 Reaktivität in den Beinen zeigen. Dadurch daß die Zellen sich nicht ordnungsgemäß teilen können, scheinen sie, wie das meist bei Störungen des normalen Zellebens der Fall ist, den Weg in die Apoptose zu gehen (siehe Milan et al., 2002), wofür

die Erhöhung der TUNEL-markierten Zellen ein deutlicher Hinweis ist. Da wie erwähnt in *Drosophila* *AP-2* nur in schmalen Ringen exprimiert wird und eine Aufspaltung oder sonstige Dynamik des *AP-2* Expressionsprofils noch nicht beschrieben worden ist, würde man für *AP-2* lediglich eine Rolle bei der Gelenkbildung erwarten. Allerdings weist *stummelbein*, die *AP-2* Mutante, neben fehlenden Gelenken auch stark verkürzte und deformierte Beine auf (Kerber et al., 2001; Monge et al., 2001), was stark an die Phänokopien in *Cupiennius* erinnert. Für *Drosophila* wird deshalb bislang noch angenommen, daß die *AP-2* exprimierenden Zellen die Produktion eines diffundierenden Wachstumsfaktors stimulieren, der das Überleben derjenigen Zellen sichert, die *AP-2* nicht exprimieren (Kerber et al., 2001). Damit würden beim Ausfall von *AP-2* nicht nur die wenigen *AP-2* exprimierenden Zellen sterben, sondern auch die meisten anderen, was den Phänotyp von *stummelbein* erklären würde. Dieser indirekte Wirkmechanismus in *Drosophila* wäre sehr verschieden von der direkten Wirkweise, wie sie auf Grund der vorliegenden Ergebnisse für *Cupiennius* angenommen werden kann. Allerdings zeigen noch unveröffentlichte Nachuntersuchungen in *Drosophila*, wie sie von Thomas Klein, Köln (persönliche Mitteilung) durchgeführt wurden, daß bestimmte Aspekte der veröffentlichten Daten über *AP-2* in *Drosophila* nicht richtig interpretiert worden sind, was wieder an der komplex gefalteten Architektur der Imaginalscheiben liegt. Die Wirkweise in *Drosophila* scheint nach den neueren Untersuchungen derjenigen in *Cupiennius* doch sehr ähnlich zu sein, wobei natürlich die Veröffentlichung der neuen Daten aus *Drosophila* noch weitere Klarheit bringen dürfte.

Ein Aspekt der Regulation von *AP-2* gilt jedoch als gesichert: *AP-2* unterliegt der Steuerung durch den *Notch*-Signalweg (Kerber et al., 2001). Deshalb sollte auch in *Cupiennius* der Einfluß von *Cs-Notch* auf *Cs-AP-2* untersucht werden. Dazu wurde die Expression von *Cs-AP-2* in den Gliedmaßen von *Cs-N* Phänokopien analysiert. Experimente dieser Art sind jedoch mit großer Vorsicht zu betrachten. Bei den untersuchten *Cs-N* Phänokopien kann der Grad der RNA Interferenz nur geschätzt werden. Frühzeitige Injektion führt ja bekanntlich zu schweren Entwicklungsdefekten und Beine werden meist gar nicht mehr angelegt (Stollewerk et al., 2003). Inwieweit die vorliegenden Phänokopien den tatsächlichen Ausfall von *Cs-N* in den Beinen wiedergeben ist also, redlich betrachtet, unbekannt. Desweiteren kann der wirkliche Einfluß des injizierten Gens auf das mit in situ Hybridisierung nachgewiesene Gen nur unter Umständen beurteilt werden. Ein Beispiel, wie ein RNAi Versuchsergebnis zu einer falschen Schlußfolgerung führen kann, ist nachfolgend gegeben. Es könnte zum Beispiel vermutet werden, daß das

Gen *dac* durch das Gen *Dll* aktiviert wird. Im Versuch wird nun die *Dll* Funktion durch RNAi gestört und anschließend die Expression von *dac* untersucht. Wird *dac* von *Dll* aktiviert, sollte sich in den *Dll* Phänokopien keine *dac* Expression mehr nachweisen lassen. Andererseits sollte die *dac* Expression noch vorhanden sein, falls die Ausgangsvermutung falsch ist und *dac* nicht von *Dll* aktiviert wird. Das Ergebnis des Versuchs zeigt, daß *dac* nicht mehr exprimiert ist. Die Schlußfolgerung, daß *dac* von *Dll* aktiviert wird, ist trotzdem falsch. Der Grund dafür ist, daß der Ausfall von *Dll* zum Ausfall fast des gesamten Beins führt. Es sind schlicht und einfach keine Zellen vorhanden, die *dac* exprimieren könnten. Es ist bei allen Untersuchungen dieser Art also stets daran zu denken, daß die Manipulation der Funktion eines Gens oft auch zu dramatischen Organveränderungen führt, die dann zu falschen Schlußfolgerungen führen können. Im Fall der *Cs-AP-2* Expression in *Cs-N* RNAi Phänokopien konnte in noch halbwegs entwickelten Beinen keine Abschwächung der *Cs-AP-2* Expression beobachtet werden. Vielmehr erschienen alle Ringe der normalen *Cs-AP-2* Expression zu einem breiten Band verschmolzen zu sein. Das mag nun daran liegen, daß die Interferenz mit *Cs-N* dazu führt, daß die einzelnen Beinsegmente nicht richtig wachsen und sich somit die *Cs-AP-2* Ringe zwar bilden, aber nicht voneinander trennen, wie sie es während des normalen Beinwachstums tun. Dafür spricht, daß in den Beinen der *Cs-N* RNAi Phänokopien tatsächlich eine verringerte Zellproliferationsrate und eine erhöhte Zelltodrate festzustellen ist. Dagegen spricht, daß das gleiche auch auf die Beine von *Cs-AP-2* RNAi Phänokopien zutrifft, in denen das *Cs-AP-2* Expressionsmuster aber normal erscheint, abgesehen von der starken Reduzierung der Expressionstärke. Es besteht also Grund zu der Vermutung, daß die Desorganisation des *Cs-AP-2* Musters in *Cs-N* RNAi Phänokopien in der Tat eine direkte Folge der gestörten Regulation durch *Cs-N* ist und nicht etwa indirekt durch Störungen in der Organentwicklung hervorgerufen wird.

### 4.1.4 Ausblick

Wie oben diskutiert wurde, lassen sich tatsächlich zu allen drei Ebenen der Bein-Segmentierungskaskade in *Drosophila* Hinweise in den Beinen anderer Arthropodenarten finden, die sich dahingehend auslegen lassen, daß die Kaskade innerhalb der Arthropoden konserviert ist. Doch im Verlauf der Diskussion ist ebenfalls klar geworden, daß die hier

vorgestellten Arbeiten nur ein allererster Schritt zu einem besseren Verständnis der Evolution der Gliedmaßen bei Arthropoden sind.

So sind zu jeder einzelnen Ebene wichtige Fragen offen, die meist jedoch zu ihrer Klärung die Herstellung neuartiger Materialien oder die Entwicklung neuer Methoden erfordern würden. Auf der Ebene der Morphogen-Gradienten liefern die Expressionsmuster erste Daten, die zur Aufstellung einer Hypothese befähigen. Danach soll die Quelle eines der beiden Morphogene WG und DPP auf die Bein Spitze beschränkt sein, damit in dreidimensionalen Beinen dieselben Aktivitätsgradienten entstehen können, wie in der zweidimensionalen Beinscheibe *Drosophila*. Ein erster Schritt zur Prüfung der Hypothese wäre natürlich der Nachweis der Proteinexpressionsmuster, ob wirklich Gradienten vorliegen. Dies hat sich jedoch schon in *Drosophila* als schwierig erwiesen; der Grund dafür ist, daß die Morphogene zu ihrem Transport kleine Membranvesikel, sog. Argosomen, benutzen, die ihre Reise sowohl intra- als auch extrazellulär absolvieren (z.B. Greco et al., 2001). Daher hat erst die subzelluläre Untersuchung des Proteinexpressionsmusters zu ihrer Entdeckung geführt. Eine derartig genaue Auflösung ist in *Cupiennius* und *Glomeris* zur Zeit noch nicht erreichbar. Wie bereits weiter oben erwähnt, wäre auch die experimentelle Manipulation von *dpp* ein wichtiger Test, da sich dadurch die Expression der Zielgene wie z.B. *Dll* oder *dac* verändern müßte. Die Expression von *dpp* entlang der dorsalen Beinseite könnte zum Beispiel unter der Kontrolle des *omb*-Promotors geschehen. Ebenso ist an eine Expressionsanalyse des *Drosophila*-Gens z. B. in transgenen *Tribolium* zu denken, wobei interessant wäre, ob das *Drosophila*-Gen in *Tribolium* wie in *Drosophila* reguliert wird (also entlang der dorsalen Seite exprimiert wäre), oder ob es wie das endogene *Tc-dpp* auf die Spitze der Beine beschränkt bliebe (Sanchez-Salazar et al., 1996). Solche Manipulationen werden aber wohl leider auf längere Sicht nicht durchführbar sein.

Auf der Ebene der Bein-Gap-Gene wäre natürlich zunächst zu klären, ob auch in anderen Arthropoden ein Gap-Phänotyp dieser Gene existiert. In *Cupiennius* könnte zumindest mittels RNAi die Funktion von *exd*, *hth*, *dac* und *Dll* gestört werden. Allerdings ist es bislang in den Phänokopien nicht möglich zu beurteilen, welche Beinanteile fehlen. Dazu müßte man bis zur Ausbildung der Kutikula warten. Durch die Lagerung in Voltalef-Öl während und nach der Injektion ist es aber derzeit noch nicht gelungen, injizierte Embryonen bis zum Nymphenstadium am Leben zu erhalten. Zum zweifelsfreien Nachweis eines Gap-Phänotyps ist dies aber zwingend notwendig. Auch der gegenseitige Antagonismus, wie er für die *Drosophila* Bein-Gap-Gene beschrieben worden ist, bedarf

eines Nachweises in anderen Arthropoden. Ohne Analyse induzierter Zellklone, wie sie bislang nur in *Drosophila* möglich ist, dürfte das aber sehr schwierig sein.

Schließlich sind auch auf der Ebene der Bein-Segmentierungsgene noch viele Fragen ungeklärt. Sind *Dl* und *Ser* auch in anderen Arten tatsächlich Liganden für *N*? Wie sieht das Proteinexpressionsmuster dieser Gene aus? Und auch für die übrigen potentiellen Zielgene des *Notch*-Signalweges stehen weitere Untersuchungen aus, zumindest in dem Rahmen, wie sie exemplarisch für *Cs-AP-2* durchgeführt worden sind. Interessant sind auch jüngste Ergebnisse aus *Drosophila*, die zeigen, daß in den sich entwickelnden Gelenken scharf geschiedene Zellpopulationen existieren, die sich durch ihre Zellmorphologie und ihr Schicksal innerhalb des Gelenks unterscheiden (Mirth und Akam, 2002). Es konnte gezeigt werden, daß die Bein-Segmentierungsgene, die auf den ersten Blick alle recht ähnlich exprimiert sind, in Wirklichkeit auf einzelne dieser Zellpopulationen beschränkt sind oder zumindest nur teilweise überlappen. Ein Vergleich der aus *Cupiennius* vorgestellten Bein-Segmentierungsgene legt bereits nahe, daß auch die Expressionsringe in *Cupiennius* nicht alle an der gleichen Stelle liegen, sondern teilweise bis vollständig komplementär sind. Allerdings zeigt fast jedes zukünftige Gelenk in *Cupiennius* eine eigene Kombination der Genexpressionen, etwas das sich ebenso in *Drosophila* findet. Da jedes Gelenk unterschiedlich gebaut ist und unterschiedliche Bewegungseigenschaften, Muskulatur und Innervierung besitzt, liegt die Vermutung nahe, daß die verschiedenen Expressionsmuster mit den verschiedenen gestalteten Gelenken in Verbindung stehen, möglicherweise sogar gelenkspezifische untergeordnete Gene aktivieren, deren Identität noch nicht bekannt ist. Ein erster Schritt diese Frage zu beantworten wäre die genaue Analyse der relativen Lage der Expressionsringe zueinander. Ein Doppelfärbungsprotokoll liegt zwar vor, allerdings ist eine wichtige Komponente (das Biotinyltyramid-Signalverstärkungssystem) nicht mehr in der ursprünglichen Form zu erwerben (siehe Material und Methoden). Mit dem Ersatzprodukt waren keine vergleichbaren Ergebnisse mehr zu erzielen: während Doppelfärbungen mit den sehr stark exprimierten Genen *dac* und *Dll* zumindest in einigen Fällen erzielt werden konnten (siehe Ergebnisse), gelang dies mit den Bein-Segmentierungsgenen nicht (Daten nicht gezeigt). Aber selbst bei einem optimalen Ergebnis dieser Methode ist eine Überlappung zweier Expressionsdomänen nur unzureichend charakterisierbar. Was gebraucht würde sind fluoreszente Färbungen, die eine Untersuchung im konfokalen Mikroskop zulassen und somit eine Überlappung von Genexpressionen auf Zellebene auflösen können. Ein fluoreszenter Nachweis von mRNA ist jedoch in *Cupiennius* bislang nicht geglückt und für



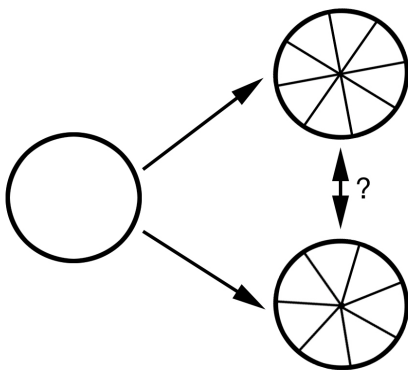
den alternativen Nachweis der Proteinexpression fehlen noch die entsprechenden Antikörper.

Neben der Frage ob die einzelnen Ebenen der Kaskade konserviert sind, steht natürlich die übergeordnete Frage im Raum, ob die Verbindungen zwischen diesen Ebenen konserviert sind. Hierzu können die bisher vorgelegten Ergebnisse kaum eine Aussage treffen. Es mag logisch erscheinen, daß, nachdem viele Indizien für die Konservierung der einzelnen Ebenen sprechen, auch die Interaktionen zwischen den Ebenen konserviert sein sollten. Trotzdem dürfte die Entwicklung geeigneter Experimente zur Bearbeitung dieser Frage in der zukünftigen Erforschung der Beinentwicklung der Arthropoden einen sehr wichtigen Platz einnehmen. Die bisher zur Verfügung stehenden Methoden können leider kaum helfen, diese Frage anzugehen. Soll zum Beispiel der Einfluß von WG und DPP auf die Ebene der Bein-Gap-Gene untersucht werden, wäre eine Möglichkeit die Expression von *wg* und/oder *dpp* mittels RNAi zu stören. Allerdings ist dabei zu erwarten, daß die Beinentwicklung in einem solchen Maße gestört wird, daß weitere Analysen verhindert werden. Ähnliches ist zu erwarten, wenn beispielsweise der Einfluß der Bein-Gap-Gene wie *dac* oder *Dll* auf die Bein-Segmentierungsgene untersucht werden soll; es wird nicht genug von einem Bein übrig sein, um darin noch Expressionsstudien mit Bein-Segmentierungsgenen durchzuführen. Obwohl natürlich solche Experimente trotzdem versucht werden müssen, ist schon jetzt klar, daß auch neue Methoden herangezogen werden müssen. Gerade bei der Analyse der Regulation einer Ebene durch eine andere wären Promotoranalysen ein Mittel der Wahl. Es wird sich zeigen müssen, ob in geeigneten Systemen wie z.B. *Tribolium* vergleichende Studien in dieser Richtung durchgeführt werden können.

### **4.1.5 Implikationen für die Homologie von Beinsegmenten**

Wie bereits in der Einleitung erwähnt, schürte die Entdeckung von Genen, die im Bein von *Drosophila* ganz spezifisch Beinsegmente oder Gruppen von Beinsegmenten festlegen, die Hoffnung die seit mehr als hundert Jahren offene Frage nach der Homologie der Beinsegmente bei Arthropoden zu klären. Schnell wurde allerdings klar, daß auch die Ergebnisse der Expressionsmuster-Analyse zu widersprüchlichen Homologie-Hypothesen führen und somit ebenfalls die Homologie-Frage nicht lösen können (Abzhanov und Kaufman, 2000).

Ich möchte hier die These vertreten, daß diese Frage tatsächlich gar nicht beantwortet werden kann. Der Grund hierfür ist die oben beschriebene Bein-Segmentierungskaskade. In *Drosophila* hat sich gezeigt, daß die Expressionsringe der Bein-Segmentierungsgene keineswegs in einer regelmäßigen Reihenfolge erscheinen, also etwa von proximal nach distal oder umgekehrt. Stattdessen erscheinen die Ringe in einer komplexen Reihenfolge und manche Ringe gehen sogar auseinander hervor (Kojima et al., 2000; Galindo und Couso, 2000; Rauskolb, 2001). Das gleiche Phänomen ist in Schaben (Norbeck und Denburg, 1991) und in *Cupiennius* zu beobachten, wo im Extremfall sogar fast alle Ringe in einer komplexen Reihenfolge auseinander hervorgehen (z.B. *Cs-AP-2* oder *Cs-odd-1*). Die Ursache für die Komplexität der Reihenfolge liegt bei *Drosophila* in der Weise wie die Expressionsringe der Bein-Segmentierungsgene aktiviert werden, nämlich durch die Bein-Gap-Gene (Rauskolb, 2001). Diese zeigen ein sehr dynamisches Expressionsprofil mit ständig wechselnder Lage relativ zueinander. Diese Dynamik bestimmt wann, wo und wieviel Expressionsringe eines nachgeschalteten Bein-Segmentierungsgens ausgeprägt werden. Auch in *Cupiennius* und *Glomeris* zeigen die bisher bekannten Bein-Gap-Gene ein dynamisches Expressionsprofil, daß sich allerdings von dem in anderen Arthropoden unterscheidet und das auch zwischen den zwei Arten Unterschiede zeigt. Ist die Bein-Segmentierungskaskade, wie oben angenommen wurde, konserviert, so heißt das, daß in den einzelnen Arthropodenarten die Ausprägung der Bein-Segmentierungsgene und somit die Lage der Gelenke zwar von einem homologen Mechanismus bestimmt wird, die Lage der Segmentgrenzen allerdings nicht homolog ist. Ich möchte das an einem Beispiel verdeutlichen: die Tortengrafiken in Abb. 4.4 stellen Geburtstagstorten dar, die in Analogie zum Arthropodenbein in einzelne Stücke (Segmente) aufgeteilt werden sollen. Die obere Torte wird in acht Stücke unterteilt. Die untere Torte wird ebenfalls in Stücke aufgeteilt. Dabei werden durch ein Mißgeschick



**Abbildung 4.4**

Einteilung einer Tortengrafik in unterschiedliche Segmentzahlen und anschließender Zuordnungsversuch. Erklärung siehe Text.

allerdings nur sieben, nicht acht Stücke eingeteilt. Der Versuch die Stücke der oberen Torte 1 denen der unteren Torte 2 zuzuordnen stellt sich als schwierig heraus. Natürlich könnte man beginnen zu argumentieren, daß die Stücke der Torte 2 einem ganzen plus einem anteiligen Stück der Torte 1 entsprechen, doch die Zuordnung der ganzen und anteiligen Stücke wird notwendigerweise völlig subjektiv sein; jeder der es versucht, wird seine eigene Zuordnung finden. Wieder zurück bei den Beinen der Arthropoden führt uns eine ganz ähnliche Zuordnungsdebatte in ein völlig neues Gebiet der Philosophie der Homologie und zu der Frage: kann es sein, daß das Ganze homolog ist, seine Teile aber nicht?

Ich möchte an dieser Stelle dieser Debatte nur insofern vorgreifen, daß ich behaupte, die Beschäftigung mit der Ursache des Problems (der Dynamik der Bein-Gap-Gene) wird wohl eher zu phylogenetischen Erkenntnissen führen, als die Beschäftigung mit dem Problem selbst (der Homologisierbarkeit der Beinsegmente). Die Evolution der Dynamik der Bein-Gap-Gene kann durch weitergehende vergleichende Untersuchungen rekonstruiert werden und schon jetzt lassen die vorliegenden Daten einen Ausblick darauf zu, wie nützlich diese Forschung für die Aufstellung von phylogenetischen Stammbäumen sein könnte (siehe Kapitel 4.3.1).

### 4.1.6 Appendix: Dorso-ventrale Musterbildung im Bein

In *Drosophila* organisieren *wg* und *dpp* nicht nur die Musterbildung entlang der proximal-distalen Achse, sondern auch entlang der dorsal-ventralen Achse. Zwei Gene, die hierbei eine Rolle zu spielen scheinen sind *omb* und *H15* (Brook und Cohen, 1996; Wilder und Perrimon, 1995; Maves und Schubiger, 1998). Das Gen *omb* wird direkt von *dpp* aktiviert und ist in einem dorsalen Sektor der Beinscheibe exprimiert; das Gen *H15* dagegen wird von *wg* aktiviert und ist folglich in einem ventralen Sektor aktiviert. Ergänzend zu den Arbeiten zur PD-Achse wurden auch diese beiden DV-Faktoren untersucht. Das *omb* Gen ist sowohl in *Cupiennius* als auch in *Glomeris* ganz deutlich auf die Dorsalseite beschränkt und zeigt an der Beinspitze eine faszinierend klare Grenze zum ventralen Gewebe; das ist umso erstaunlicher, da ja der vermeintliche Aktivator *dpp* zumindest in *Cupiennius* nicht auf die Dorsalseite beschränkt ist. Dies mag ein (wenngleich sehr schwacher) Hinweis sein, daß das Verhältnis von *dpp* und *omb* nicht konserviert ist, die Rolle als dorsaler Faktor scheint für *omb* aber auf jeden Fall evolutionär konserviert zu sein. Die Rolle von

*H15* ist schwerer zu beurteilen. In *Cupiennius* konnte kein *H15*-ähnliches Gen identifiziert werden, das anhand seiner Expression als ventraler Faktor angesprochen werden könnte. Die beiden *Cupiennius*-Gene sind nur in einem Teil des ventralen Bereichs der Beine exprimiert und unterscheiden sich somit deutlich von *H15* und *CG6634* aus *Drosophila*. Andererseits konnte in *Tegenaria* ein *H15*-Gen gefunden werden, das nahe legt, daß auch die Rolle von *H15* evolutionär konserviert ist. Die Unsicherheiten in *Cupiennius* beruhen sicher darauf, daß noch nicht alle *H15*-artigen Gene dieser Art isoliert werden konnten (siehe Kapitel 4.3.3). Unklar ist auch die Situation in *Glomeris*. Das Gen *Gm-H15-1* ist zwar in einem deutlich größeren ventralen Bereich exprimiert als die *H15*-Gene in *Cupiennius*, reicht aber nicht bis in die Spitze der Beine, wie das in *Drosophila* und *Tegenaria* der Fall ist. Das Ausmaß der Expression von *Gm-H15-1* mag nun trotzdem ausreichend sein, um die Ventralseite der Beine zu bestimmen, oder aber auch in *Glomeris* existiert noch ein weiteres *H15*-Gen, dessen Expression die gesamte Ventralseite einnimmt.

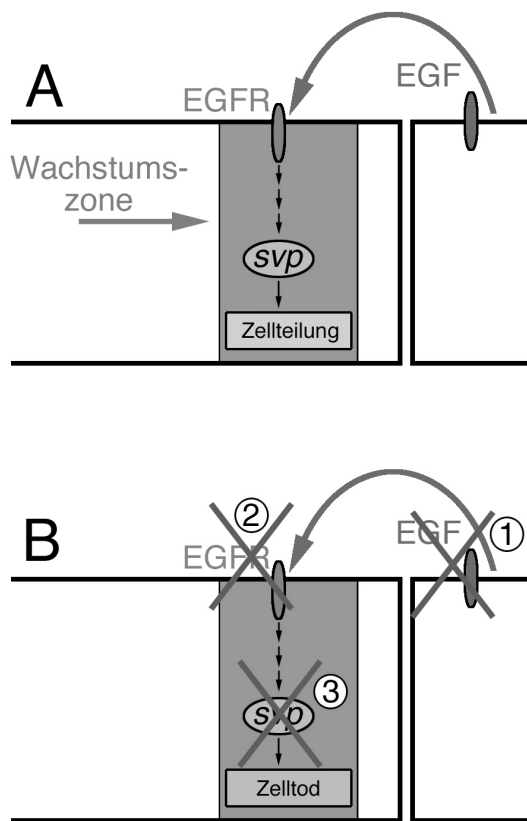
Diese Schwierigkeiten die bereits bei der Betrachtung von nur zwei DV-Faktoren auftreten, erlauben es derzeit also noch nicht, Aussagen über die Konservierung oder Nicht-Konservierung des DV-Musterbildungssystems zu treffen. Während also bei der Erforschung der Evolution der Musterbildung entlang der PD-Achse schon gewisse Fortschritte erzielt werden konnten, stehen die Arbeiten zur DV-Achse noch am Anfang.

## 4.2 Zur Existenz morphogenetischer Zentren

### 4.2.1 Entdeckung von segmental wiederholten Wachstumszonen in den Beinen

Mittels des Einbaus von BrdU konnten in der Nähe der sich bildenden Gelenke in *Cupiennius* Zonen erhöhter Zellproliferationsaktivität nachgewiesen werden. Diese segmental wiederholten Bereiche werden im Folgenden als Wachstumszonen bezeichnet. Daneben konnte eine größere Anzahl von Genen gefunden werden, die ebenfalls ein segmental wiederholtes Expressionsmuster in Ringen aufweisen. Diese Gene waren einerseits Teile oder potentielle Zielgene des *Notch*-Signalweges und andererseits das Gen *Cs-svp*. Besonders das Muster von *Cs-svp* stimmt sehr gut mit dem Muster erhöhter Zellproliferation überein, während die anderen Gene nur teilweise direkt im Bereich höherer Proliferationsaktivität exprimiert sind. Dennoch kann auf Grund des segmentalen

Expressions-mustern aller Gene vermutet werden, daß sie direkt oder indirekt mit der Regulierung der Zellproliferation in den Wachstumszonen in Verbindung stehen. Tatsächlich führt die RNA Interferenz mit ausgewählten Vertretern dieser Gene zu verminderter Zellproliferation in den Beinen. Ein besonderer Verdacht fiel auf das Gen *Cs-svp*: in *Drosophila* ist bekannt, daß es für die Zellproliferation in den Malpighischen Gefäßen gebraucht wird (Kerber et al., 1998; Sudarsan et al., 2002). Das Homologon aus *Drosophila* ist also bereits direkt mit der Aufrechterhaltung von Zellproliferation in Verbindung gebracht worden; das gleiche ist somit auch in *Cupiennius* denkbar. RNAi gegen *Cs-svp* führt zu verkürzten Beinen. Diese Phänokopie resultiert, wie Untersuchungen mittels anti-ph3 und TUNEL nahelegen, offenbar daraus, daß sich durch den Wegfall von *Cs-svp* weniger Zellen teilen und statt dessen mehr Zellen sterben. Die Daten aus *Drosophila* deuten an, daß *svp* in der Rangfolge der Gene, die die Zellproliferation steuern, sehr weit unten steht und direkt an der Regulation der Zellteilung beteiligt ist (möglicherweise durch einen direkten Einfluß auf Zykline oder Thyrosin-Phosphatasen; Kerber et al., 1998). Das gibt zu der Überlegung Anlaß, daß auch in *Cupiennius* *Cs-svp* weit unten in einer Hierarchie stehen könnte, wobei natürlich das Augenmerk sofort auf den *Notch*-Signalweg und seine möglichen Zielgene fällt: sie sind im Bereich der *Cs-svp* Expression ausgeprägt und führen nach RNAi ebenso wie *Cs-svp* zu verminderter Zellproliferation und erhöhtem Zelltod. Allerdings unterliegt *svp* in *Drosophila* im erwähnten Zusammenhang der Entwicklung der Malpighischen Gefäße der Kontrolle eines anderen wichtigen Signalwegs: des *Egfr*-Signalwegs. Auch in *Cupiennius* konnte eine Verbindung zwischen *Cs-svp* und dem *Egfr*-Signalweg wahrscheinlich gemacht werden. *Cs-Egfr* Expression ist zu gewissen Zeiten an den Stellen heraufreguliert, an denen auch *Cs-svp* exprimiert ist, und nach RNAi gegen *Cs-Egfr* ist die Expression von *Cs-svp* in seiner Intensität herabgesetzt. Natürlich ist der Vergleich der Stärke von in situ Hybridisierungs-Signalen nicht das Mittel der Wahl um Expressionsstärken miteinander zu vergleichen; dennoch dürfen die vorgestellten Ergebnisse als erster Hinweis gewertet werden, daß der *Egfr*-Signalweg über das Zielgen *Cs-svp* die Proliferationsaktivität der Wachstumszonen bestimmt. Als Arbeitshypothese kann folgendes aufgestellt werden (Abb. 4.5): Die Zellen in den Wachstumszonen präsentieren in erhöhtem Maße den *Egfr*-Rezeptor. Dieser wird durch einen Liganden stimuliert was zur Auslösung der Signalkaskade und schließlich auch zur Aktivierung von *Cs-svp* (und somit zu Zellproliferation) führt (Abb. 4.5A). Die Identität und Quelle des Liganden für *Egfr* ist völlig ungeklärt. Allerdings sind in der Embryonalentwicklung immer wieder Gewebe- oder



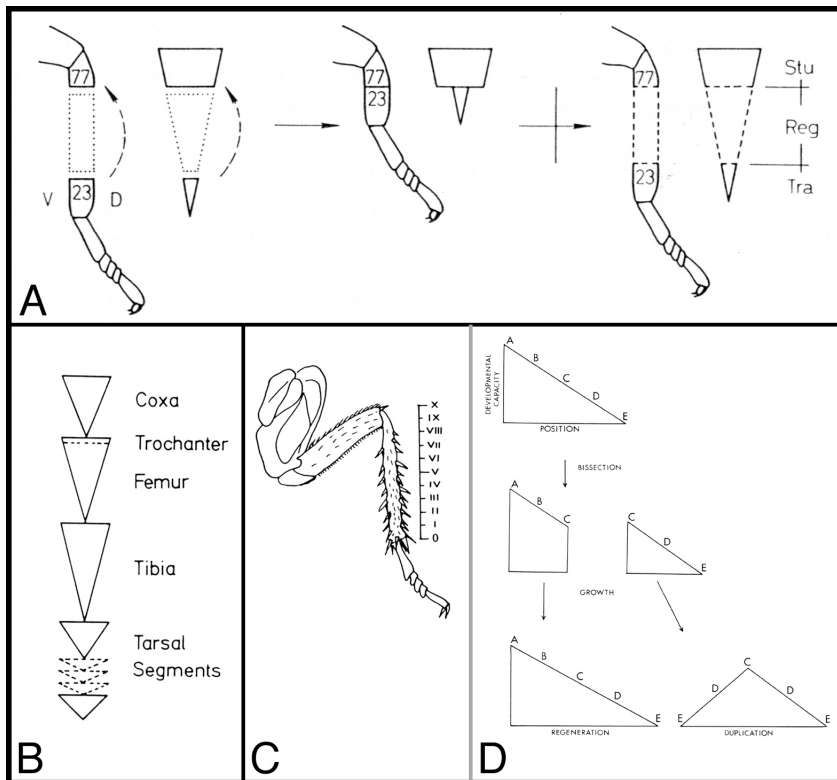
**Abbildung 4.5**

Hypothese zu den molekularen Mechanismen der segmentalen Wachstumszonen (grün). Beinsegmente sind durch unvollständige Rechtecke dargestellt. EGF von der distalen Gelenkseite migriert nach proximal und bindet an seinen Rezeptor (EGFR). Dadurch wird eine Signalkaskade ausgelöst, die über das Zielgen *svp* zu Zellproliferation führt. (A) normaler Ablauf. (B) Störung des Vorgangs bei der Segregation von EGF (1), der Rezeption (2) oder beim Zielgen (3) führt zum gleichen Ergebnis: Zelltod. Weitere Erklärungen siehe Text. Abkürzungen s.S. 2-5.

Kompartimentgrenzen der Ausgangspunkt für die Ausschüttung von Botenstoffen oder Wachstumsfaktoren; direkt in der Nachbarschaft der Wachstumszonen befinden sich solche Grenzen- die zukünftigen Gelenke. Darüber hinaus werden an dieser Grenze eine Reihe von Genen ausgeprägt (*Cs-N*, *Cs-Ser*, *Cs-Dl-1*), die durchweg mehrere EGF Motive beinhalten und somit als Ligand für den *Egf*-Rezeptor in Frage kommen. Der Gedanke, daß in den Wachstumszonen, die letztlich die Morphogenese der Beine steuern und somit mit gutem Recht als morphogenetische Zentren angesehen werden können, zwei der wichtigsten Signalwege, der *Notch*- und der *Egfr*-Signalweg, zusammenwirken, ist überaus spannend (ähnliches ist im Flügel von *Drosophila* bereits bekannt (zur Übersicht siehe de Celis, 2003)). Das Zusammenwirken der beiden Signalwege könnte auch die Ähnlichkeit der RNAi Effekte erklären. Egal an welcher Stelle ein Eingriff vorgenommen wird, das Ergebnis wäre stets, daß die Zellen in der Wachstumszone kein Signal ihres Wachstumsfaktors mehr erhalten (Abb. 4.5B). Wie es meist der Fall ist, wenn Zellen ein Wachstumsfaktor vorenthalten wird, schlagen sie den Weg in die Apoptose ein, was die Zunahme TUNEL-markierter Zellen erklären würde.

### 4.2.2 Evidenzen für evolutionäre Konservierung der Wachstumszonen

Die in Kapitel 4.2 vorgestellten und diskutierten Ergebnisse sind die ersten ihrer Art und somit noch mit vielen offenen Fragen und Unsicherheiten behaftet. Besonders wichtig ist im Rahmen der Fragestellung dieser Dissertation natürlich die Frage der evolutionären Konservierung der Wachstumszonen und der postulierten genetischen Mechanismen. Dazu liegen noch keine Ergebnisse aus anderen Arthropoden vor. Allerdings können vereinzelte Berichte aus der Vergangenheit dahingehend interpretiert werden, daß segmental wiederholte Wachstumszonen in den Beinen aller Arthropoden vorkommen. In der älteren Literatur finden sich vereinzelt Hinweise auf „Differentiationszentren“, die in der Nähe der Gelenke liegen sollen (Kim, 1959; Kuske et al., 1961). Zum anderen führt auch in *Drosophila* der Ausfall von *Notch*-Signalweg-Komponenten oder Zielgenen, neben der Störung der Gelenkbildung, auch zu Wachstumsstörungen (z.B. Speicher et al., 1994; Villano und Katz, 1995; Rauskolb und Irvine, 1999; Baonza und Garcia-Bellido, 2000; Kerber et al., 2001; Buckles et al., 2001). Wegen dieser Verbindung zwischen Gelenkbildung und Beinwachstum ist bereits postuliert worden, daß die Beinsegmente als Einheiten der Wachstumkontrolle („units of growth control“) fungieren (Milan und Cohen, 2000). Dies würde durch die vorliegenden Ergebnisse aus *Cupiennius* unterstützt. Des weiteren ist eine Rolle des *Egfr*-Signalweges jüngst auch während der *Drosophila*-Beinentwicklung beschrieben worden (Campbell, 2002; Galindo et al., 2002). Allerdings betrifft sie offenbar nur die Entwicklung des Tarsus. Weitere Untersuchungen sind jedoch nötig, da der Tarsus, wegen der schon mehrfach erwähnten komplizierten Faltung der Beinscheiben, der zugänglichste Teil des Beines ist und deshalb auch immer bevorzugt untersucht wird, wohingegen den übrigen Beingelenken meist keine Aufmerksamkeit geschenkt wird. Der interessanteste Hinweis auf eine Konservierung der Wachstumszonen leitet sich von Regenerationsexperimenten an den Beinen von Schabenlarven her. Obwohl es sich hierbei natürlich um postembryonale Entwicklungsvorgänge handelt, gibt es überzeugende Hinweise, daß die molekularen Mechanismen bei der Beinregeneration dieselben sind wie bei der Embryonalentwicklung der Beine (Brook et al., 1993; Marsh und Theisen, 1999; Mito et al., 2002). Die Regenerationsexperimente veranlaßten Bohn (1970a,b, 1976) und andere Autoren (Bulliere, 1971; Bryant, 1971) zu dem Postulat segmental wiederholter Gradienten eines unbekanntes Stoffes in den Beinen der Schabenlarven (Abb. 4.6). Die höchste Konzentration sollte sich dabei im Bereich der Gelenke befinden und dann stetig bis zum nächsten Gelenk abnehmen. Die vorliegenden



**Abbildung 4.6**  
 Postulierte Gradienten eines Stoffes der positionale Informationen vermittelt. Bei der Regeneration wird der Informationsgradient genutzt, um verlorengangene Beinteile wieder einzufügen. (A) aus Bohn (1970a). (B) aus Bohn (1976). Fast jedes Segment hat seinen eigenen Gradienten. (C) aus Bulliere (1971). (D) aus Bryant (1971). Beachte, daß jeder Autor die höchste Konzentration in den proximalen Teil jedes Segments legt. Weitere Erklärungen siehe Text.

Daten aus *Cupiennius* lassen die Vermutung zu, daß es sich bei dem von Bohn postulierten Stoff um einen EGF handeln könnte.

### 4.3 Zur Verwendbarkeit der Expressionsdaten für die phylogenetische Forschung

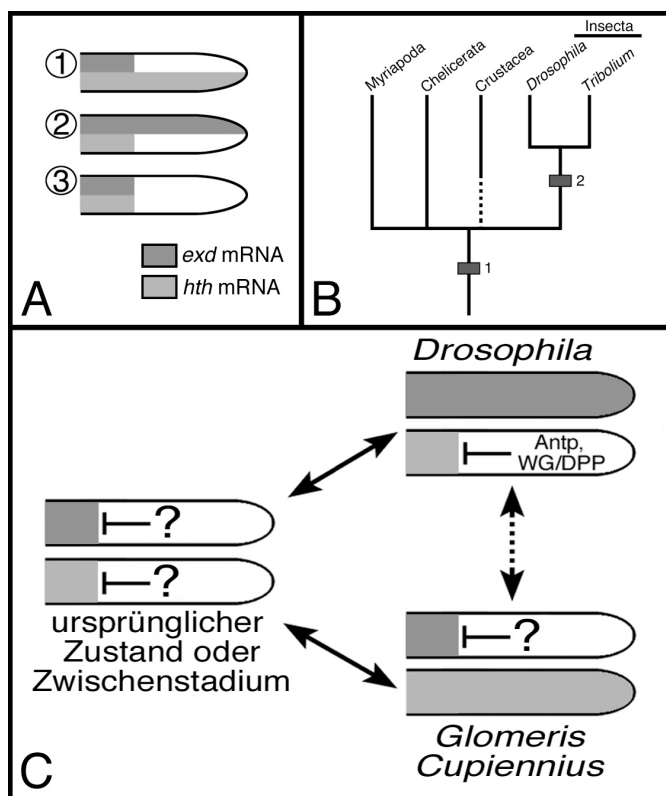
Die bisherige Diskussion hat einerseits zwar nahegelegt, daß einige Aspekte der Beinentwicklung innerhalb der Arthropoden konserviert sind, hat aber andererseits noch keine Merkmale zu Tage gefördert, die für eine Stammbaumrekonstruktion genutzt werden können. Insbesondere mußte der Idee eine Absage erteilt werden, daß die Beinsegmente der verschiedenen Arthropodenklassen miteinander homologisiert werden können. In diesem Abschnitt sollen daher speziell diejenigen Ergebnisse diskutiert werden, die für eine phylogenetische Analyse von Nutzen sein können.



### 4.3.1 Homologe Merkmale für die kladistische Rekonstruktion

#### Umkehrung der *hth/exd* Expression als mögliche Autapomorphie der Insekten

Wie bereits weiter oben diskutiert, hat sich bei der Expressionsanalyse ergeben, daß die Muster von *hth* und *exd* unterschiedlich sind, aber eine Koexpression der beiden Gene stets auf den proximalen Teil des Beines beschränkt ist. Diese proximale Koexpression ist nach aller Wahrscheinlichkeit für die ordnungsgemäße Funktion der beiden Gene unerlässlich. Nun gibt es drei verschiedene Möglichkeiten dieses zu erreichen (Abb. 4.7A): entweder



**Abbildung 4.7**

Musterumkehr der Expression von *exd* und *hth*. (A) Drei Möglichkeiten der Expression von *exd* und *hth* um Koexpression im proximalen Teil zu erreichen. Möglichkeit (1) findet sich in ähnlicher Form in *Cupiennius* und *Glomeris*, (2) ist bei Insekten verwirklicht, (3) ist bislang hypothetisch. (B) Wird Möglichkeit (1) als plesiomorph angesehen (rote Box 1), dann stellt die Situation in Insekten eine Autapomorphie für diese dar (rote Box 2). (C) Evolution der Musterumkehr. Erklärung siehe Text.

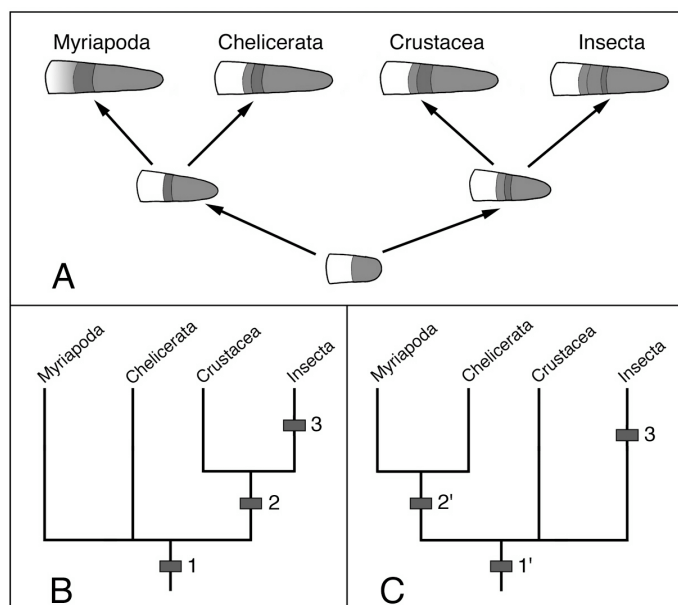
beide Gene sind auf den proximalen Teil des Beines beschränkt, oder nur jeweils eines ist proximal exprimiert, während das andere über einen größeren Bereich des Beines exprimiert sein darf. In *Drosophila* und *Tribolium* ist *hth* auf den proximalen Teil beschränkt, während es umgekehrt in *Cupiennius* und *Glomeris* *exd* ist, dessen Expression nur proximal zu finden ist. In der Zwischenzeit haben weitere Studien in anderen Insekten gezeigt, daß auch dort *hth* der proximale Faktor ist (Inoue et al., 2002), während in Crustaceen erste Ergebnisse vorliegen, die belegen, daß zumindest *exd* auf den proximalen

Anteil der Beine beschränkt ist (Williams et al., 2002); über *hth* in Crustaceen ist leider noch nichts bekannt. Es ist auffällig, daß es in allen bislang untersuchten Insekten nicht das *exd* Gen, sondern das *hth* Gen ist, das im proximalen Teil exprimiert ist. Obwohl noch Daten aus Crustaceen fehlen, kann schon jetzt vermutet werden, daß diese Umkehr des *hth/exd* Expressionsmusters eine Autapomorphie der Insekten darstellt (Fig. 4.7B). Autapomorphien für die Insecta sind besonders wertvoll, da in der letzten Zeit nahezu alle bislang gültigen Apomorphien in Frage gestellt worden sind (zur Übersicht siehe Klass und Kristensen (2001)). Über die Evolution einer solchen Musterumkehr kann noch nichts endgültiges ausgesagt werden (Abb. 4.7C). Zum einen ist es denkbar, daß es einen Urzustand gab, bei dem beide Gene proximal exprimiert waren. Die Verhältnisse in Myriapoden und Cheliceraten (und Crustaceen?) auf der einen Seite und Insekten auf der anderen Seite können dann unabhängig voneinander aus dem Urzustand abgeleitet werden. Alternativ kann auch jeder der beiden bislang bekannten Expressionsmustertypen der Urzustand sein. Der Urzustand aus der vorhergehenden Alternative wäre nun ein Zwischenstadium, das durchlaufen wird, da die direkte Musterumkehr hochgradig unwahrscheinlich ist. Immerhin müßte hierzu die Regulation beider Gene gleichzeitig und aufeinander abgestimmt geändert werden.

### *Die Evolution der zeitlichen Dynamik von *dac* und *Dll**

Wie oben bereits diskutiert verhindert die Dynamik des Expressionsprofils der Bein-Gap-Gene eine Zuordnung homologer Beinsegmente auf der Basis von molekularen Markern. Andererseits kann die Dynamik selbst zum Gegenstand von phylogenetischen Hypothesen werden. Das nachfolgende Beispiel mit *dac* und *Dll* soll das verdeutlichen. Die Dynamik dieser beiden Gene ist in dem Insekt *Tribolium* genauer untersucht worden (Prpic et al., 2001). Dabei sind Unterschiede zu den Berichten aus *Drosophila* gefunden worden, die hier nicht weiter berücksichtigt werden sollen. Es existieren nämlich Studien, die nahelegen, daß zwischen *Tribolium* und *Drosophila* keine Unterschiede bestehen und die scheinbaren Differenzen wieder einmal durch die Besonderheit *Drosophilas* Beinscheiben zu entwickeln hervorgerufen werden (Weigmann und Cohen, 1999). *Tribolium* soll deshalb bis auf weiteres erst einmal als Verteter für die Insekten gelten. Für Crustaceen liegt eine Studie von Abzhanov und Kaufmann (2000) vor, und für Myriapoden und Cheliceraten wurden die Ergebnisse im Rahmen dieser Dissertation erarbeitet. Es zeigt sich nun, daß in

der Dynamik zunächst Unterschiede bezüglich des Erscheinens der *dac* Expression bestehen (Abb. 4.8A). In *Tribolium* und in *Porcellio* (dem Vertreter der Crustaceen) wird *dac* inmitten der *Dll*-Domäne aktiviert. In *Tribolium* wird dort in der Folge *Dll* zum Großteil herabreguliert, so daß das typische „Ring-und-Socke-Muster“ der *Dll*-Expression in Insekten entsteht. Daß dieses höchstwahrscheinlich eine Autapomorphie für die Insekten darstellt, ist bereits vorgeschlagen worden (Mittmann und Scholtz, 2001). In *Porcellio* geschieht diese *Dll*-Herabregulierung offenbar nicht. Ein ganz anderes Erscheinen zeigt *dac* in *Cupiennius* und *Glomeris*, wo *dac* am proximalen Ende der *Dll*-Domäne auftaucht. In *Cupiennius* verschieben sich die zwei Domänen dann zusätzlich. In *Glomeris* konnte das so nicht beobachtet werden- hier scheint die *dac*-Expression in späteren Stadien schwach auf den proximalen Beinanteil überzugreifen. Der so gewonnene ontogenetische Baum (Abb. 4.8A) zeigt mögliche Apomorphien auf, die direkt für die Rekonstruktion eines phylogenetischen Baums genutzt werden können (Abb. 4.8B,C).



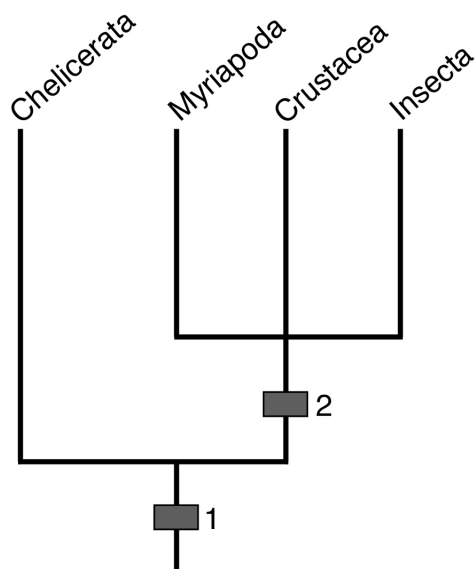
**Abbildung 4.8**

Evolution der Dynamik des *Dll/dac* Expressionsprofils. (A) Ontogenese des *Dll/dac* Musters in allen vier Arthropodenklassen. *Dll*, blau; *dac*, pink; Koexpression, violett. Erklärung im Text. (B,C) Zwei alternative phylogenetische Bäume auf der Basis der *Dll/dac* Dynamik. (B) Das Erscheinen der *dac*-Domäne am proximalen Ende der *Dll*-Domäne wird als plesiomorph angesehen (rote Box 1). Dann ist das Erscheinen der *dac*-Domäne innerhalb der *Dll*-Domäne abgeleitet und eine Synapomorphie der Crustacea und Insecta (rote Box 2).

Die Herabregulierung von *Dll* in der Mitte der Beine die zum sog. Ring-und-Socke-Muster führt, ist dann eine Autapomorphie der Insekten (rote Box 3). (C) Das Erscheinen der *dac*-Domäne innerhalb der *Dll*-Domäne wird als plesiomorph angesehen (rote Box 1'). Das Erscheinen der *dac*-Domäne am proximalen Ende der *Dll*-Domäne ist dann eine Synapomorphie der Myriapoda und Chelicerata (rote Box 2'). Rote Box 3: siehe B.

### *Die Mandibelmorphologie in Relation zur Expression von *dac**

Der Expressionsort innerhalb der Extremitäten mancher der untersuchten Gene macht deutlich, daß die Expression in den Gliedmaßen nicht immer etwas mit der Achsenbildung zu tun haben muß. So manches Gen scheint mehrere Funktionen zu besitzen, auch in den Gliedmaßen. Als Beispiele seien hier genannt: Das Gen *Dll*, das sowohl für distale Strukturen notwendig ist, aber auch in Sinnesorganen exprimiert ist (siehe nächstes Kapitel), oder etwa das Gen *dac*, das außer als Determinante für mittlere Beinbereiche, in *Glomeris* beispielsweise in den antennalen Sinneszapfen exprimiert ist. Aber auch andere Gene wie z.B. *wg* scheinen mehr als nur eine Funktion zu haben; *wg* ist in *Glomeris* um die Sinnespalpen herum exprimiert und spielt somit wohl nicht nur eine Rolle bei der Bestimmung der Ventralseite der Gliedmaßen. Aus der Expression alleine kann man also noch nicht schließen, daß die Expressionsorte homolog sind. So gilt das auch für die Expression von *dac* in der Mandibel von *Glomeris*. Die extrem starke Expressionsdomäne im Externlappen, aus dem der innere und äußere Zahn der Mandibel hervorgeht, kann nicht mit der üblichen Funktion von *dac* als Determinante für mittlere Beinabschnitte in Verbindung gebracht werden. Vergleiche mit anderen Arthropoden legen vielmehr etwas anderes nahe: auch in der Mandibel von *Tribolium* und *Porcellio* ist erhöhte *dac* Expression nachgewiesen worden und das genau in dem Teil der Mandibel, der später die



**Abbildung 4.9**

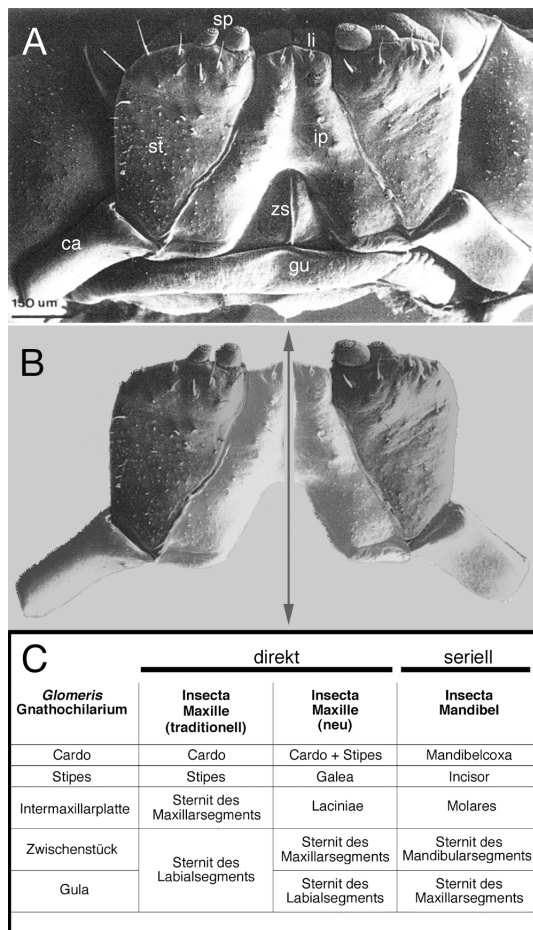
Phylogenetischer Stammbaum auf der Basis der Mandibelmorphologie. Als plesiomorph wird das Fehlen einer spezifischen Umgestaltung der Gliedmaßen am dritten Kopfsegment (Mandibelsegment) angenommen (rote Box 1). Als abgeleitet ist dann die Ausbildung einer Mandibel anzusehen, deren zahnartige Morphologie mit starker *dac*-Expression im zahnbildenden Teil in Verbindung gebracht werden kann. Dieser Zustand wäre dann eine Synapomorphie der Myriapoda, Crustacea und Insecta (Mandibulata) (rote Box 2).

zahnartige Morphologie annehmen wird (Abzhanov und Kaufmann, 2000; Prpic et al., 2001). Es kann daher vermutet werden, daß *dac* irgendwie für die spezielle, zahnartige Morphologie der Mandibel in Myriapoden, Crustaceen und Insekten verantwortlich ist. Dies wäre ein starkes Argument für die Homologie der Mandibel innerhalb der Mandibulata. Die Rolle von *dac* bei der Erschaffung der Mandibelmorphologie könnte darüber hinaus eine Autapomorphie für die Mandibulata sein, da eine vergleichbare Expression bei Cheliceraten nicht gefunden werden konnte (Abb. 4.9).

### *Dll in den Sinnesorganen: neue Homologiehypothesen*

Generell wird die Expression von *Dll* als molekularer Marker für das Vorhandensein distaler Beinstrukturen verwendet. Allerdings zeigen zunehmend mehr Studien, daß *Dll* auch in Enditen exprimiert ist, also Strukturen des proximalen Beins (z.B. Panganiban et al., 1995; Niwa et al., 1997; Williams, 1998; Popadic et al., 1998; Scholtz et al., 1998; Abzhanov und Kaufman, 2000; Beermann et al., 2001; Mittmann und Scholtz, 2001; Williams et al., 2002; Olesen et al., 2001; Schoppmeier und Damen, 2001; Thomas und Telford, 1999). Die erweiterte These, daß *Dll* ein Marker für distale Beinstrukturen oder Enditen ist, wird dadurch falsifiziert, daß in der Mandibel von Insekten keine *Dll*-Expression vorhanden ist, obwohl die Mandibel zwei Enditen-Derivate besitzt (Machida, 2000). Zur Klärung dieses Problems kann die Feststellung beitragen, daß *Dll*-Expression in allen bislang untersuchten Arthropoden oft mit der Bildung von Sinnesorganen korreliert (Mittmann und Scholtz, 2001; Williams et al., 2002; diese Arbeit; zur Übersicht siehe auch Panganiban, 2000; Panganiban und Rubenstein, 2002). *Dll*-Expression zeigt also entweder die Anwesenheit von distalen Beinstrukturen oder von Sinnesorganen an. Diese These ist mit der Expression von *Dll* in den Enditen und dem Fehlen von *Dll* in der Insekten-Mandibel vereinbar, da Enditen meist der Sitz von Sinnesorganen sind, bis auf die zu Kauwerkzeugen umgestalteten Enditen der Insekten-Mandibel.

Die Maxillen von *Glomeris* bestehen aus zwei Teilen, Cardo und Stipes, und sind über ein Zwischenstück, die sog. Intermaxillarplatte, zu einer einheitlichen Unterlippe verbunden, die als Gnathochilarium bezeichnet wird (Abb. 4.10A). Der Cardo jeder Maxille trägt zwei Sinnespalpen und auch die Intermaxillarplatte besitzt zwei Sinnesanhänge, die sog. Lobi interiori. Bisherige Ansichten leiten die Intermaxillarplatte vom Sterniten des Maxillarsegmentes ab und homologisieren die zwei Teile der Maxille



**Abbildung 4.10**

Neue Hypothese bezüglich der direkten und seriellen Homologien der Maxille in *Glomeris marginata*. (A) Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme des Gnathochilariums von *G. marginata* (aus Kraus (2001)). (B) Das Gnathochilarium ist das Verschmelzungsprodukt der Maxillen. Jede Hälfte besteht aus Stipes (rot), Cardo (blau) und einer Hälfte der Intermaxillarplatte (grün). Verändert nach Kraus (2001). (C) Die Auffassung, daß die in B blau und grün eingefärbten Teile Enditen sind, führt zu einer neuen Hypothese bezüglich der direkten Homologie zur Insektenmaxille. Danach ist die Intermaxillarplatte das Verschmelzungsprodukt der beiden inneren Maxillarenditen, die in Insekten als Laciniae bezeichnet werden. Diese Auffassung erlaubt auch die Aufstellung serieller Homologien zur Insektenmandibel und ihrer Enditen Incisor und Molar (rechte Spalte). Weitere Erklärungen im Text. Abkürzungen: ca, Cardo; st, Stipes; zs, Zwischenstück; gu, Gula; ip, Intermaxillarplatte; li, Lobi interiori; sp, Sinnespalpen.

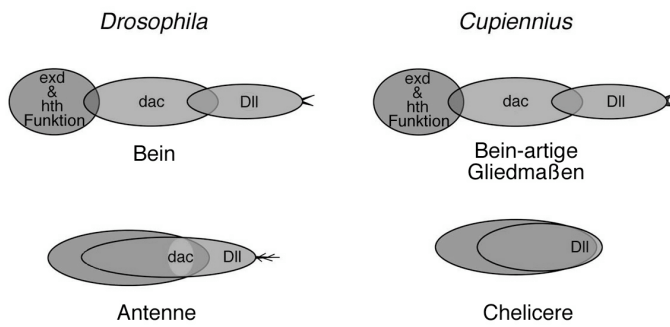
selbst mit den gleichnamigen Teilen der Maxille der Insekten (Dohle, 1964). Kraus (2001) sieht in der Intermaxillarplatte sogar das Verschmelzungsprodukt der 2. Maxillen. Diese Ansicht ist jedoch nicht haltbar, da nachweislich keine 2. Maxillen ausgebildet werden. Die Expression von *Gm-Dll* in der Maxille legt nun eine völlig andere Zuordnung nahe. *Gm-Dll* ist in den Sinnesorganen des Gnathochilariums exprimiert. Interessanterweise zeigt die *Gm-Dll* Expression, daß die Primordien der Lobi interiori am inneren Rand der Maxillarextremität entstehen. Das bedeutet, daß sich zumindest ein Teil der Intermaxillarplatte nicht wie bisher vermutet vom Maxillarsternit herleitet, sondern von der Maxille selbst gebildet wird. Die Tatsache, daß es meist die Enditen sind, in denen die Sinnesorgane sitzen, läßt die Vermutung zu, daß es sich bei der Intermaxillarplatte um das Verschmelzungsprodukt zweier Maxillarenditen handelt (Abb. 4.10B). Auch der Stipes trägt zwei Sinnesorgane und kann somit ebenfalls als Endit angesprochen werden. Das würde zu einer neuen direkten und seriellen Homologisierung führen, wie sie in Abb. 4.10C dargestellt ist. Dieses Beispiel soll verdeutlichen, wie der Vergleich von Gen-

expressionsmustern gepaart mit morphologischen Strukturen zu Homologiehypothesen führen kann. Im vorliegenden Fall gelingt es so, direkte Homologien zwischen den Teilen der Myriapoden-Maxille und den Teilen der Insekten-Maxille herzuleiten.

### 4.3.2 Hinweise auf analoge Entwicklungen in der Gliedmaße evolution

#### *Verlust des Domänen-Antagonismus in der 1. Extremität*

Wie weiter oben beschrieben, ist die Aufteilung des sich entwickelnden Beines in drei antagonistische Domänen eine Grundeigenschaft der Beine in *Drosophila* und vermutlich auch anderer Arthropoden. Allerdings wurde für die Antenne bei *Drosophila* bekannt, daß sich diese ohne die Präsenz solcher Domänen entwickelt (Dong et al., 2000, 2001, 2002; Chu et al., 2002). Der fehlende Antagonismus in der Antenne *Drosophilas* kommt u.a. dadurch zum Ausdruck, daß die Expressionsmuster der Bein-Gap-Gene, die im Bein bekanntlich weitgehend separate Bereiche einnehmen, in der Antenne großzügig überlappen. Es ist daher die Vermutung geäußert worden, daß die Tripartie von Entwicklungsdomänen eine Grundlage für die Entwicklung der Beinmorphologie ist. Im Gegensatz dazu soll das Fehlen der antagonistischen Domänen dann Morphologietypen ermöglichen, die stark von der typischen Beinmorphologie abweichen, wie beispielsweise die Antenne *Drosophilas Cupiennius* bietet sich hier an, diese Vermutung zu testen. Die Art besitzt mit dem Pedipalpus und den Laufbeinen zwei Gliedmaßentypen, die als beinähnlich bezeichnet werden können, während die Chelicere von der Idee eines Beins erheblich abweicht. Wie im Ergebnisteil beschrieben, sind die Expressionsmuster der Bein-Gap-Gene in Pedipalpen und Laufbeinen weitgehend identisch und mit der Existenz dreier antagonistischer Domänen vereinbar. In der Chelicere allerdings überlagern sich die Expression von *Cs-Dll*, *Cs-exd* und *Cs-hth* weitgehend und geben somit Anlaß zur Vermutung, daß in der Chelicere antagonistische Domänen fehlen (Abb. 4.11). Da *dac* in *Drosophila* der Hauptantagonist ist, der die mittlere Domäne definiert und die beiden übrigen getrennt hält (Abu-Shaar und Mann, 1998; Dong et al., 2001), ist die Einschränkung oder der Verlust der *dac* Expression der denkbar einfachste Weg, die Tripartie aufzubrechen. Tatsächlich ist in *Drosophila* die antennale *dac* Expression weitgehend funktionslos (Mardon et al., 1994; Dong et al., 2002) und in *Cupiennius* fehlt sie völlig (die späte Expression nach vollendeter Inversion hat wohl nichts mit der



**Abbildung 4.11**

Entwicklungsdomänen in den Gliedmaßen von Arthropoden. Schemata der Gliedmaßen bei *Drosophila* (Bein, Antenne) und *Cupiennius* (Bein-artige Gliedmaßen (also Laufbeine und Pedipalpus) und Chelicere). Die Domänen werden durch die Aktivität bestimmter Gene festgelegt: *exd/hth*-Koexpression (blau), *dac*-Expression (rot), *Dll*-

Expression (grün). Drei antagonistische (getrennte) Domänen scheinen der Entwicklung der Bein-artigen Morphologie zu Grunde zu liegen (obere Reihe), während nicht Bein-ähnliche Gliedmaßen offenbar keine antagonistischen Domänen aufweisen (untere Reihe). Hier überschneiden sich die Genexpressionen großzügig. Die Schemata für *Drosophila* basieren auf Abb. 7 in Dong et al. (2001).

Achsenbildung zu tun). Dieser Argumentationsweg faßt die *dac* Expression in der Antenne von *Drosophila* also als Rudiment auf und erachtet das Fehlen der *dac* Expression in der Chelicere von *Cupiennius* als abgeleitet gegenüber der Situation in den Pedipalpen und Laufbeinen. Dies ist eine wichtige Aussage im Zusammenhang mit der Frage nach dem sog. „default state appendage“ (siehe 4.4.1).

An dieser Stelle soll aber etwas anderes zur Notiz gebracht werden. Das Cheliceren-tragende Segment in Cheliceraten und das Antennen-tragende Segment in Insekten werden nach derzeitigen Erkenntnissen miteinander homologisiert (Telford und Thomas, 1998; Damen et al., 1998; Mittmann und Scholtz, 2003). Es ist daher verlockend, die Ähnlichkeiten, wie sie eben bezüglich des Fehlens der antagonistischen Domänen beschrieben worden sind, als weiteres Indiz zur Stützung dieser Anschauung heranzuziehen. Allerdings ist das wohl kaum zulässig. Wenn der Aufbau aus drei antagonistischen Domänen tatsächlich der ursprüngliche Zustand ist und dazu noch lediglich zur Erzeugung der normalen Beinmorphologie taugt, dann erscheint es schon fast als evolutionäre Notwendigkeit, die Tripartie zu verlieren um neue Morphologietypen zu erzeugen. Immerhin hat nicht zuletzt die Vielfalt an Extremitätenformen den Arthropoden zu ihrem überragenden evolutionären Erfolg verholfen. Unter diesem Gesichtspunkt erscheint es als sehr wahrscheinlich, daß ein ehemals vorhandener dreiteiliger Aufbau mehrfach unabhängig voneinander verloren gegangen ist, und damit den Weg frei gemacht hat für die Evolution so unterschiedlicher Gliedmaßen wie der Antenne in *Drosophila* und der Chelicere bei *Cupiennius*. Das Fehlen der drei antagonistischen Domänen in der 1.



Extremität scheint also keineswegs ein homologes, sondern vielmehr ein analoges Merkmal zu sein.

### *Verlust des Telopoditen und Verlust der Gliedmaßen eines Segments*

Im vorangegangenen Abschnitt ging es um den Verlust der Tripartie in der Entwicklung der Antenne von *Drosophila* und der Chelicere von *Cupiennius*. Es konnte wahrscheinlich gemacht werden, daß dieses Verlustmerkmal eine Analogie, keine Homologie darstellt. Es stellt sich nun die Frage, wie es sich mit anderen Verlustmerkmalen verhält, die bislang für homolog erachtet wurden und deshalb auch in die phylogenetische Forschung eingeflossen sind. Zunächst ist hier die Mandibel der Mandibulata (Crustaceen, Myriapoden und Insekten) zu nennen. War Manton (1977) noch davon ausgegangen, daß es sich bei den Mandibeln der Myriapoden und Insekten um zwar stark umgebildete, aber doch vollständige Extremitäten („Ganzbein-Mandibel-Hypothese“) handelt, so ist heute weitgehend unumstritten, daß es sich bei der Mandibel der Myriapoden und Insekten lediglich um den proximalen Extremitätenteil mit seinen Enditen handelt und alle distalen Bereiche (nach Snodgrass (1935) als Telopodit bezeichnet) verlorengegangen sind (gnathobasische Mandibel; z.B. Popadic et al., 1996). Der Verlust der distalen Mandibelanteile an sich ist allerdings ein stark Analogie-verdächtiges Merkmal. Bei der kauend-mahlenden Funktion der Mandibel erscheint eine Bein-ähnliche Morphologie als wenig zweckdienlich. Folgerichtig sind in den meisten Crustaceenarten die distalen Anteile der Mandibel in unterschiedlichem Maße reduziert. Oft sind sie als kleiner Mandibelpalpus erhalten, manchmal aber auch völlig verschwunden, ähnlich wie bei den Myriapoden und Insekten. Sind also die Enditen der Mandibelextremität erst einmal zu Kauwerkzeugen ausgestaltet, ist der Verlust des übrigen Gliedmaßenanteils sehr wahrscheinlich, da er für die Funktion überflüssig ist. An dieser Stelle sind die Ergebnisse der *dac* Expressionsanalyse, wie sie bereits oben diskutiert wurden, interessant, weil sie nahelegen, daß die Ausgestaltung der Mandibelenditen zum zahnartigen Kauwerkzeug einem konservierten Mechanismus folgt. Somit darf als wahrscheinlich gelten, daß die Evolution der 3. Extremität zum Kauwerkzeug, also zur Mandibel, in der Tat nur einmal stattgefunden hat und mithin eine Synapomorphie der Crustaceen, Myriapoden und Insekten darstellt. Andererseits ist die Homologie des Verlusts der distalen Teile der Mandibel in Myriapoden und Insekten in Frage gestellt. Der Verlust der distalen

Extremitätenteile ist unabhängig z.B. auch in der Maxille von *Glomeris* zu finden (siehe auch oben) und auch in der Mandibel der Crustaceen wird allgemein angenommen, daß eine Reduktion des Mandibularpalpus mehrfach unabhängig voneinander stattgefunden hat. Der Verlust distaler Strukturen ist somit in vielen Fällen ein analoges, kein homologes Merkmal.

Schließlich gilt der Verlust der Extremitäten am sog. Interkalarsegment (bei Insekten) bzw. Prämandibularsegment (bei Myriapoden) als wichtiges Indiz für die Monophylie der Antennata (= Atelocerata, Tracheata). Als Reduktionsmerkmal ist es allerdings von vorneherein Analogie-verdächtig. Außerdem ist auch bei anderen Arthropoden der Verlust segmentaler Anhänge bekannt. So fehlen zum Beispiel bei manchen Notostraca (eine Gruppe der Crustaceen) im Adultus die 2. Antennen, bei den Protura (einer Gruppe basaler Insekten) die Antennen und, wie hier nochmals dokumentiert, bei den Diplopoda (z.B. *Glomeris*) die 2. Maxillen. Gerade dieses letzte Merkmal ist interessant, da es speziell nur die Diplopoda (und vielleicht deren Schwestergruppe, die Pauropoda) kennzeichnet und somit wohl phylogenetisch gesehen verhältnismäßig jung ist. Es überrascht daher nicht, im dazugehörigen Segment noch eine kurzlebige Expression von *Gm-Dll* zu finden, quasi als Rudiment einer ehemals funktionellen *Dll* Expression der 2. Maxillen. Die Reduktion der Extremitäten des Interkalar-/Prämandibularsegments müßte dagegen phylogenetisch wesentlich älter sein, soll sie doch schon beim gemeinsamen Vorfahren aller Myriapoden und Insekten vollzogen gewesen sein. Es war daher unerwartet auch im Prämandibularsegment eine kurzlebige *Gm-Dll* Expression vorzufinden. Ist das ein Hinweis darauf, daß der Verlust der Extremitäten im Prämandibularsegment ähnlich jungen Alters ist wie der Verlust der 2. Maxillen? Das würde gegen eine Homologie der Extremitätenlosigkeit des Interkalar- bzw. Prämandibularsegments sprechen. Fest steht, daß im Interkalarsegment der Insekten keine *Dll* Expression zu finden ist. Natürlich ist nichts darüber bekannt, nach welchen Gesetzen und nach welcher Zeit ein Rudiment endgültig verschwindet und so können die beiden *Gm-Dll* Rudimente in *Glomeris* völlig verschiedenen Alters sein; allerdings ist mit der Expression von *Gm-Dll* im Prämandibularsegment ein deutlicher Unterschied zum Interkalarsegment der Insekten gegeben. Es werden nun dringend neue Merkmale gebraucht, um die Homologie der Gliedmaßenreduktion an diesem Segment in Insekten und Myriapoden wieder stärker zu untermauern.

### 4.3.3 Gefahren der Expressionsmusteranalyse

Über die möglichen Fehlerquellen bei der phylogenetischen Analyse von Genexpressionsmustern ist in der vorangegangenen Diskussion schon an einigen Stellen etwas gesagt worden. Diese Argumente sollen hier nicht wiederholt werden. Vielmehr soll hier zum Abschluß ein generelles Problem anhand eines Beispiels aus dieser Arbeit veranschaulicht werden.

Das hier gegebene Beispiel betrifft die *H15*-Gene. In *Drosophila* und in allen anderen hier untersuchten Tieren gibt es mindestens zwei Duplikate dieses Gens. Die zwei Duplikate in *Drosophila*, *H15* und *CG6634*, sind deutlich anders exprimiert als die beiden Duplikate aus *Cupiennius*, *Cs-H15-1* und *Cs-H15-2*. Eine Folgerung hieraus darf daher sein, daß die Funktion der *H15*-Gene in *Cupiennius* eine andere ist als in *Drosophila*. Allerdings sind aus *Tegenaria* drei *H15*-Gene isoliert worden, wovon die Gene *Ta-H15-1* und *Ta-H15-2* sowohl in der Sequenzanalyse als auch vom Expressionsmuster den gleichnamigen Genen aus *Cupiennius* zugeordnet werden können. Das dritte Gen, *Ta-H15-3*, dagegen zeigt ein ähnliches Expressionsmuster wie die zwei *H15*-Gene in *Drosophila*. Also muß *Ta-H15-3* das richtige Orthologon zu den *Drosophila*-Genen sein. Was ist dann aber mit der evolutionären Konservierung? Stehen sich *Tegenaria* und *Drosophila* näher als die zwei Spinnenarten untereinander? Sicherlich nicht. Die vermutliche Lösung: auch in *Cupiennius* muß ein drittes Gen existieren, das im Expressionsmuster den *Drosophila*-Genen ähnelt. Dieses Beispiel zeigt also, wie die versehentliche Untersuchung des falschen Orthologons zu fehlerhaften Schlußfolgerungen führen kann.

Die Forderung nach dem „richtigen Orthologon“ offenbart aber eine wesentlich fundamentalere Schwäche. Viele Gene gehören zu größeren Verwandtschaftsgruppen, die im Verlaufe der Evolution durch mehrfache Duplikation auseinander hervorgegangen sind. Nach gängigen Vorstellungen kommt es bei solchen Duplikationen zu Subfunktionalisierung (die Funktionen des Ausgangsgens werden unter den zwei Duplikaten aufgeteilt), Neofunktionalisierung (eines der beiden Duplikate erhält eine völlig neue Funktion), oder eines der Duplikate geht wieder verloren (Prince und Pickett, 2002). So wird klar, daß es unter diesen Bedingungen sehr schwierig sein kann, die „richtigen Orthologa“ zu identifizieren. Man mag mitunter gezwungen sein, sich beim Vergleichen auf einzelne Aspekte zu beschränken und die Orthologie z.B. nur an der Sequenz oder der Funktion festzumachen. Aber selbst bei nicht duplizierten Genen oder anderweitig eindeutig geklärter Orthologie können Expressionsmuster Vergleiche evtl. zu falschen

Schlüssen führen, dann nämlich, wenn das jeweilige Gen im Verlauf der Evolution sein Funktionsspektrum erweitert oder eine völlig neue Funktion angenommen hat. Die Sicherheit beim Vergleich von Genexpressionsmustern kann also von zusätzlichen Untersuchungen der Genfunktion gekoppelt mit Studien zur Morphologie und Zellbiologie nur profitieren.

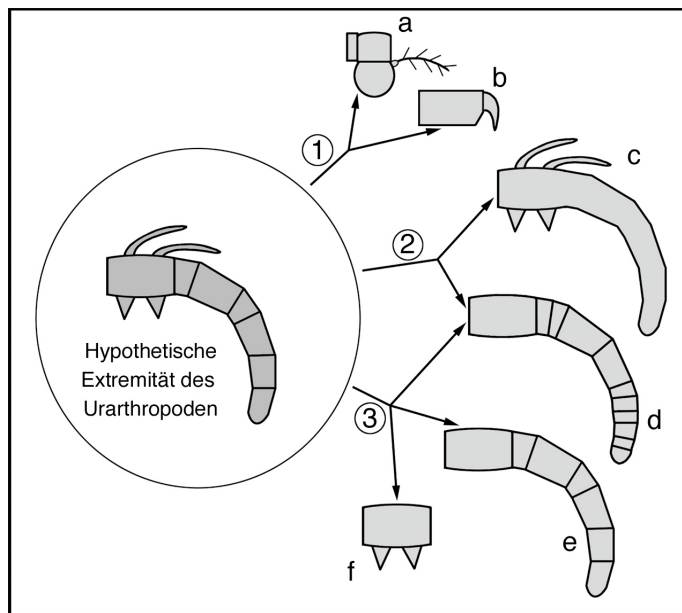
### **4.4 Schlußbemerkungen über die Evolution der Extremitäten der Arthropoden**

#### **4.4.1 Die Gliedmaßen des Urarthropoden: der „default state appendage“**

Die Frage nach der Evolution der Gliedmaßen bei Arthropoden beinhaltet selbstverständlich auch die Frage nach dem Aussehen der Gliedmaßen des allerersten Arthropoden, des Urarthropoden. Die ganze Vielfalt heutiger Gliedmaßentypen muß sich ganz zwangsläufig auf die Gliedmaßenformen des Urarthropoden zurückführen lassen. Im allgemeinen geht man bisher davon aus, daß der Urarthropode ein homonom segmentierter Organismus war, d.h. alle Segmente sahen gleich aus und trugen somit auch die gleichen Gliedmaßen (siehe Einleitung). Später entwickelten sich dann bestimmte Faktoren, die jedem Segment eine besondere Identität vermittelten, was dazu führte, daß die Segmente und ihre Extremitäten untereinander verschieden wurden. Um den Zustand des Organismus und der Gliedmaßen vor der Einführung dieser Faktoren (den sog. „default state“) zu erhalten, müßte es also ausreichen, diese Faktoren auszuschalten. In *Drosophila* sind inzwischen mehrere solcher Identitäts-bestimmenden Faktoren bekannt geworden; mit Bezug auf die Gliedmaßenentwicklung sind dies das Gen *hth*, das die Identität der Antenne festlegt und die verschiedenen *Hox*-Gene, die die Identität aller übrigen Gliedmaßen bestimmen (z.B. Casares und Mann, 1998; Akam, 1995). Folgerichtig ist untersucht worden, welcher Gliedmaßentyp resultiert, wenn der Einfluß dieser Gene ausfällt. Im Ergebnis zeigte sich eine stabförmige Extremität, die jedoch nur aus ganz distalen und proximalen Teilen (angeblich nur Tarsus und Coxa) besteht (Casares und Mann, 2001; Emerald und Cohen, 2001). Somit wurde als „ground state appendage“ eine Bein-artige Gliedmaße postuliert, die nur aus zwei fundamentalen Teilen besteht. Dies erinnert natürlich stark an die Hypothese von Snodgrass (1935), wonach die Extremitäten des Urarthropoden aus zwei Teilen, dem Coxopoditen und dem Telopoditen bestanden haben sollen.

An der Suche nach dem „ground state“ ist allerdings Kritik laut geworden (Minelli, 2003). In der Tat ist es so, daß *hth*-ähnliche Gene und *Hox*-Gene in allen Tieren vorkommen und auch dort, soweit das untersucht ist, Organen und Körperregionen spezifische Identität verleihen (z.B. Finnerty, 2003). Diese Faktoren sind also offenbar wesentlich älter als der Urarthropod und es ist unverständlich, warum sie beim Urarthropoden keine Rolle gespielt haben sollen. Was offenbar falsch ist, ist die Grundannahme, daß sich die Extremitätenentwicklung des Urarthropoden in einem reduzierten genetischen Umfeld abgespielt hat. Vielmehr sollte die Frage nach der tatsächlichen Zusammensetzung dieses Milieus ergebnisoffener gestellt werden. Die im Rahmen dieser Arbeit erzielten Resultate lassen vermuten, daß die beteiligten Gene und Gen-Netzwerke kaum Unterschiede zeigen zwischen dem Urarthropod und den heutigen Vertretern. Im Detail zeigen die untersuchten Arten deutliche Unterschiede, aber generell, vom Morphogen-Gradienten aus WG/DPP, über die Dynamik der Bein-Gap-Gene, bis hin zu den Bein-Segmentierungsgenen und den Beinsegmenten als morphogenetischen Zentren, zeigen sich verblüffende Gemeinsamkeiten zwischen so weit entfernt verwandten Arthropoden wie *Drosophila* und *Cupiennius*, was auf ein hohes phylogenetisches Alter dieser Mechanismen schließen läßt. Die Gliedmaßen des Urarthropoden entwickelten sich also keineswegs mittels eines reduzierten Repertoires an Genen. Im Gegenteil; die Entwicklung über drei antagonistische Domänen ist gegenüber dem Fehlen solcher Domänen sicher plesiomorph (siehe oben). Die Tripartie wiederum ist vermutlich für beinartige Morphologie verantwortlich, was bedeuten würde, daß die Urarthropoden-Extremität beinartig gewesen ist. Des weiteren war sie wohl auch schon segmentiert, da die Bein-Segmentierungsgene und –mechanismen konserviert erscheinen. Da proximale, ventrale Auswüchse (Enditen) bei allen heutigen Arthropodengruppen vorkommen, waren sie wohl auch schon im Urarthropodenbein vorhanden. Schließlich läßt sich vermuten, daß auch dorsale Auswüchse, wie sie bei Crustaceen vorkommen (Exite, Epipodite, Exopodite) vorhanden waren, da diese meist zur Atmung dienen und der Urarthropod mit Sicherheit marin war. Die Gliedmaßen des Urarthropoden mögen also in etwa so ausgesehen haben wie in Abb. 4.12 (siehe dazu auch Schram und Koenemann (2001)). Tatsächlich ist das auch der Gliedmaßentypus, der sich bei den meisten fossilen Arten findet (z.B. Trilobiten; Whittington, 1993; Xianguang et al., 1996; Siveter, et al., 2001).

Ausgehend von diesem Typus kann sich nun die Evolution aller übrigen Gliedmaßenformen gedacht werden (Abb. 4.12). Eine Möglichkeit ist der schon weiter oben angesprochene Verlust der antagonistischen Domänen. Weniger radikale Eingriffe



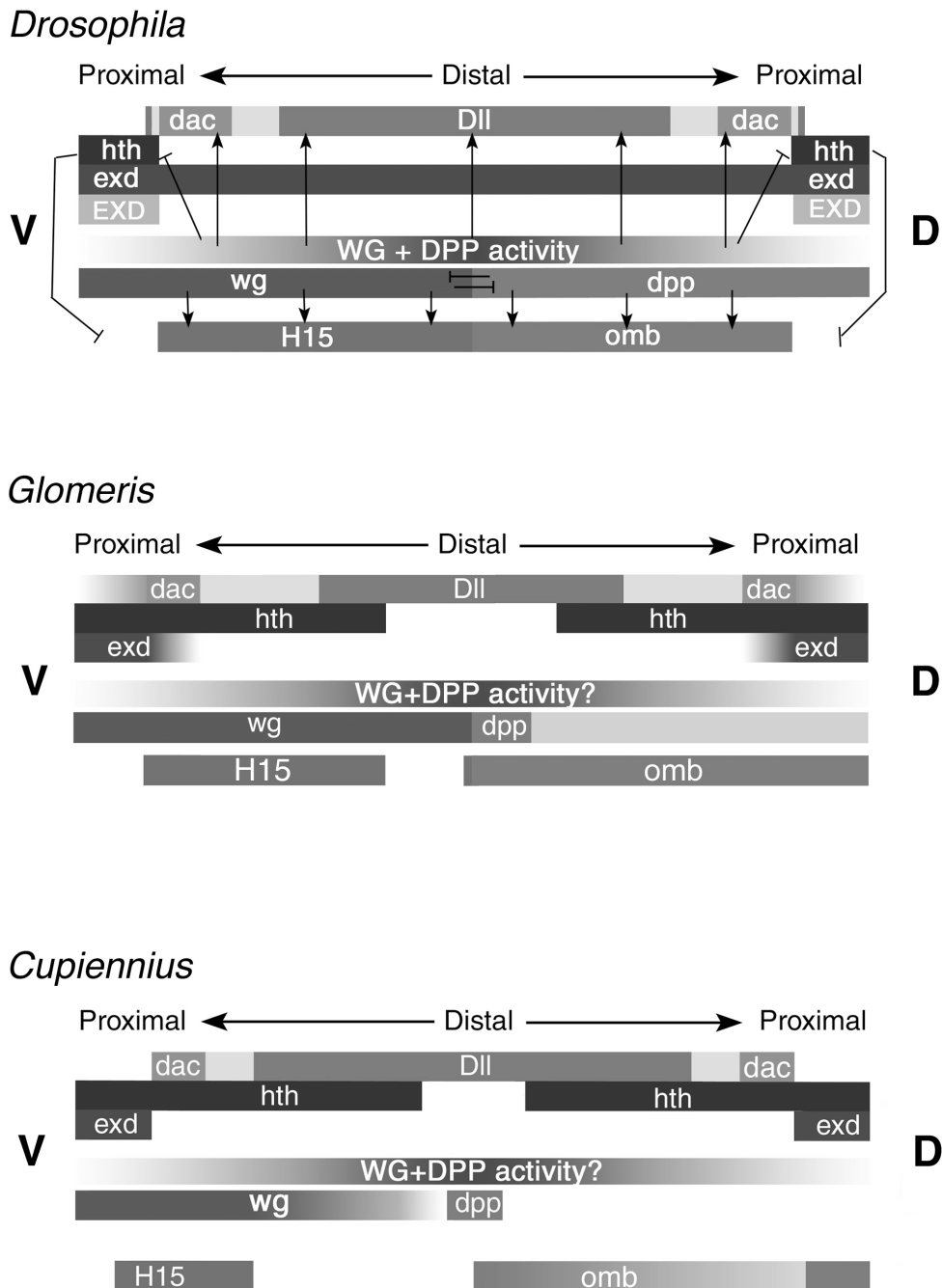
**Abbildung 4.12**

Hypothese zum Ur-Arthropodium und zur Evolution der Vielfalt heutiger Gliedmaßentypen. Ausgehend vom hypothetischen Ur-Arthropodium führen mindestens drei verschiedene Prozesse zur Entstehung neuer Extremitätentypen. (1) Verlust des Domänen-Antagonismus führt zu nicht-Bein-ähnlicher Morphologie (z.B. Antenne in *Drosophila* (a); Chelicere (b)). (2) Veränderungen der Feinjustierung der Bein-Segmentierungskaskade führen z.B zum Verlust der Gelenke (c; z.B. Blattfußkrebse), oder zur Neuaufteilung in Segmente (d; vgl.

auch sekundäre Segmentierung des Tarsus z.B bei Insekten). (3) Verlust ganzer Gliedmaßeinteile (z.B. Laufbein (e); Mandibel (f)). Die Prozesse können auch kombiniert werden (siehe d).

auf der Ebene der Bein-Gap-Gene, beispielsweise bei der Regulierung der relativen Lage ihrer Expressionsdomänen, führen zu Unterschieden in der Segmentkomposition der Gliedmaßen. Unterschiede in der Regulation der Bein-Segmentierungsgene könnten zu unsegmentierten Extremitäten führen, oder aber zu Veränderungen in der Aktivität oder der Zahl der morphogenetischen Zentren in der Nähe der Gelenke, was wiederum zur Vermehrung oder Verminderung der Podomerzahl führen könnte. Ein Vorgang dieser Art mag hinter dem Fehlen des Metatarsus im Pedipalpus von *Cupiennius* stecken; immerhin kann man im Aufspaltungsmuster der Expressionsringe der meisten Bein-Segmentierungsgene einen Unterschied zwischen Pedipalpus und Laufbein erkennen, der genau den Bereich des Metatarsus betrifft. Ähnliches mag die sekundäre Unterteilung des Tarsus bei Insekten in viele sog. Tarsomeren erklären. Schließlich scheint es auch möglich zu sein, ganze Extremitätenteile zu eliminieren, um zu neuen Gliedmaßentypen zu kommen. Die Mandibel der Insekten und die Maxille in *Glomeris* sind Beispiele für den Verlust der distalen Teile des Hauptastes. Die Laufbeine der Landarthropoden wie z.B. bei *Cupiennius* oder *Drosophila* sind ein weiteres Beispiel; hier sind die proximalen Äste weggefallen.

Diese Überlegungen führen zu dem Schluß, daß das genetische System, das die Extremitätenentwicklung bei Arthropoden steuert erstaunlich flexibel sein muß. Das



**Abbildung 4.13**

Vergleich der Expressionsdomänen ausgewählter Beingene in einem Insekt (*Drosophila*), einem Tausendfüßer (*Glomeris*) und einer Spinne (*Cupiennius*). Die ventrale Seite ist links, die dorsale Seite rechts, distal befindet sich in der Mitte, proximal ist links und rechts. Das Schema für *Drosophila* ist nach Abu-Shaar und Mann (1998) und Wu und Cohen (1999). Die Asymmetrie der Beinscheibe wurde vernachlässigt; auch die übrigen Schemata sind teils vereinfacht; vgl. dazu bitte die Originaldaten im Ergebnisteil. Gelb kennzeichnet die Überschneidung von *Dll* und *dac*-Expression. *exd* bezeichnet mRNA, EXD kennzeichnet nukleäres Protein. Auf der Grundlage der verschiedenen Expressionsmuster kann gefolgert werden, daß viele der aus *Drosophila* bekannten Interaktionen und Regulationen (obere Abbildung, Pfeile und Linien) in anderen Arthropoden modifiziert vorliegen oder nicht konserviert sind. Abkürzungen s. S. 2-5.

belegen zusätzlich die vielen dokumentierten Unterschiede in der Genexpression (Abb. 4.13). Feinjustierungen, größere Veränderungen oder gar Eliminierungen von Komponenten sind offenbar an den meisten Stellen möglich, ohne daß die Funktion des Systems, nämlich eine funktionelle Gliedmaße zu erstellen, beeinträchtigt würde. Zunächst mag diese Flexibilität wie ein Puffersystem erscheinen, das Störungen gut schlucken kann und evolutionären Veränderungen somit entgegenwirkt, anstatt sie zu fördern. Bei genauer Betrachtung aber erhöht jede Änderung, die nicht zum Zusammenbruch des Systems führt, die Zahl der Ausgangszustände für mögliche weitere Veränderungen. Die Zahl der Möglichkeiten steigt somit rapide und mit ihr die Wahrscheinlichkeit, daß ein neuer und nützlicher Gliedmaßentyp dabei ist. Die Flexibilität des Gliedmaßen-Entwicklungsprogramms ist also wahrscheinlich die Quelle der morphologischen Vielfalt an Gliedmaßenformen bei Arthropoden. Auf diese Weise mag sie einer der Grundsteine sein für den überwältigenden evolutionären Erfolg dieser faszinierenden Tiergruppe. Zukünftige Studien könnten diese Idee direkt bearbeiten durch experimentelle Modifikation einzelner oder mehrerer Komponenten des Gliedmaßen-Entwicklungsprogramms in einer Art, in dem Versuch zur Gliedmaßenmorphologie einer anderen Art zu gelangen. Das würde einzigartige Einblicke gewähren in die Art und Weise in der die Natur selbst in der Vergangenheit einen Gliedmaßentyp in einen anderen umgewandelt hat und könnte somit helfen, Schritt für Schritt die Phylogenie der Arthropoden zu rekonstruieren.

### **4.4.2 Der Ursprung der Gliedmaßen der Arthropoden**

Wenn hier also eine relativ komplexe Gliedmaße als ursprünglich für die Arthropoden angenommen wird, stellt sich zum Abschluß noch die Frage nach deren Ursprung. Die Erfahrung zeigt ja, daß sich das Leben als Gesamtes betrachtet vom Einfachen zum Komplexen entwickelt hat. Wenn nun die komplexe Vielfalt heutiger Gliedmaßentypen bei Arthropoden auf einen ebenfalls kompliziert gebauten Vorfahren zurückgeht, so muß zumindest diese Urextremität irgendwann einmal aus einer einfacher gebauten Extremität eines Arthropoden-Vorfahren hervorgegangen sein.

Es existieren heute noch einige Arthropoden-ähnliche Tiere, die traditionell in die nähere Verwandtschaft der Arthropoden gestellt werden, die Onychophora (Stummelfüßer) und die Tardigrada (Bärtierchen). Die Suche nach dem Vorfahr der Urarthropoden-Extremität mag also vernünftigerweise hier beginnen. Allerdings sind die



Gliedmaßen der Tardigrada so andersartig, daß sich keine stichhaltigen Übereinstimmungen mit einer Arthropoden-Extremität finden lassen. Es ist also durchaus daran zu denken, daß die Gliedmaßen von Tardigraden und Arthropoden nicht homolog sind: bei manchen Autoren zählen die speziellen Tardigraden-Gliedmaßen daher auch zu den Autapomorphien des Taxons (vgl. Börner, 1921; Dewel und Dewel, 1997). Im Gegensatz dazu liefert der Vergleich der Keimstreifentwicklung bei Onychophoren und Arthropoden genügend gute Hinweise für eine Homologie der Gliedmaßen (Balfour, 1883; Sedgwick, 1887; Wedeen et al., 1997; Eriksson und Budd, 2000; Eriksson et al., 2003). Allerdings sind sie Extremitäten der Onychophoren (die sog. Oncopodien) sehr einfach gebaut und lassen nichts erkennen, was als Ansatz zur Evolution größerer Komplexität gedeutet werden könnte; sie haben z.B. keinerlei Anhänge wie etwa Exiten oder Enditen und sie sind unsegmentiert. Fossilien von Onychophoren-ähnlichen Tieren aus dem Kambrium, sog. „Lobopods“, belegen aber, daß die Morphologie der Gliedmaßen der Uronychophoren (die sog. Lobopodien) wohl vielgestaltiger war. Bei vielen Arten sind auf den Lobopodien kleinere Auswüchse bekannt, die an Enditen erinnern und deren Vorläufer sein könnten (Whittington, 1978; Ramsköld und Xianguang, 1991). In anderen Arten wurden zusätzlich zu den lokomotorischen Ästen noch dorsale, blattförmige Äste beschrieben, die mithin an Exiten erinnern (Budd, 1993; 1996b; 1999). Und *Anomalocaris* schließlich zeigt neben seinen typischen Lobopodien auch zwei richtig segmentierte Extremitäten vor der Mundöffnung (Chen et al., 1994). Die Oncopodien heutiger Onychophoren scheinen also durch das Landleben stark vereinfacht zu sein, während die Lobopodien ihrer marinen Vorfahren schon alles im Ansatz erkennen lassen, was benötigt wird zur Evolution einer Urarthropoden-Extremität wie sie oben postuliert wurde (siehe dazu auch Shubin et al. (1997) und Budd (2001)). Der Ursprung der Lobopodien wiederum wird nach der Lehrmeinung der systematischen Zoologie bei den Parapodien der Anneliden vermutet. In der Tat wurde stets betont, daß die Onychophoren bezüglich ihrer Merkmale eine Melange aus Anneliden und Arthropoden sind (Pflugfelder, 1968). Sie sind also als Bindeglied zu denken in einer Evolution die von Anneliden über Onychophoren zu Arthropoden führt. Auch in Bezug auf die Gliedmaßen läßt sich eine überzeugende Transformationsreihe erstellen. Die Oncopodien und Lobopodien der Onychophoren-Verwandtschaft lassen, wie eben erwähnt, in vielen Aspekten das Arthropodium des Urarthropoden schon erahnen. Gleiches gilt für die Parapodien der Anneliden. Wir finden hier oftmals neben den zwei Hauptästen (Neuro- und Notopodium) kleinere dorsale oder ventrale Cirri, die der Atmung oder der Sinneswahrnehmung dienen. Dies erinnert

unmittelbar an ähnliche Fortsätze bei den Lobopodien und läßt darüber hinaus auch an die Exiten und Enditen der Arthropoden denken. Schließlich finden sich in manchen Annelidenarten schon Ansätze einer Untergliederung der Parapodien mittels segmentaler Einschnürungen (z.B. *Syllidae* (Potts, 1913)). Somit scheint die Morphologie der Parapodien die Morphologie der Lobopodien als Möglichkeit schon in sich zu tragen.

Diese Sicht der Dinge war bislang einer der Grundsteine der Annahme einer engen Verwandtschaft der Anneliden und Arthropoden, was unter dem Begriff „Articulata-Hypothese“ zusammengefaßt werden kann (zur Übersicht siehe Adoutte et al., (2000)). Allerdings haben molekulare Untersuchungen eine neue Phylogenie der Tiere nahegelegt, welche die Gruppe der Articulata nicht unterstützt (Aguinaldo et al., 1997; Schmidt-Rhaesa et al., 1998). Die Anneliden werden hier mit Tierstämmen wie den Weichtieren (Mollusca) oder den Kranzfühlern (Lophophorata) zu den sog. Lophotrochozoa vereinigt. Die Arthropoden und die nahverwandten Onychophoren und Tardigraden werden andererseits einer Gruppe zugeordnet die als Ecdysozoa bezeichnet wird und darüber hinaus auch noch einen Teil der früheren Nematelminthes enthält; namentlich sind das die Gastrotricha, Nematoda, Nematomorpha, Kinorhyncha, Priapulida und Loricifera. Es geht über den Rahmen dieser Arbeit hinaus, die Kontroverse zwischen der Articulata-Hypothese und der Ecdysozoa-Hypothese zu diskutieren. Es darf aber gefragt werden, ob die Ecdysozoa-Hypothese Vorschläge zum Ursprung der Arthropodien macht, die ähnlich plausibel sind wie die Annahme der Herkunft von Anneliden-Parapodien. Die Verbindung zwischen Arthropodien und Lobo/Oncopodien wird nicht berührt, da auch unter der Ecdysozoa-Hypothese Arthropoden und Onychophoren/Lobopods nahe verwandt sein sollen. Der Unterschied besteht also nur darin, daß die Ecdysozoa-Hypothese die Ursprünge der Lobopodien nicht mehr bei Parapodien-artigen Vorläufern vermuten kann, sondern vielmehr Vorläufer bei den Nematelminthes-Gruppen suchen muß. Diese Suche gestaltet sich schwierig. Nematoda und Nematomorpha sind völlig extremitätenlos. Ähnliches gilt für die Priapulida und die verzwerten Loricifera. Letztere besitzen allerdings wenigstens als Larve bewegliche „Zehen“ und Borsten, die wohl auch zur Fortbewegung genutzt werden (Kristensen, 1991). Ähnliche Borsten finden sich bei den Kinorhyncha, wo sie jedoch offenbar nicht zur Fortbewegung genutzt werden (Kristensen und Higgins, 1991). All diese „Extremitäten“ haben jedoch keine offensichtliche Verbindung zu den Gliedmaßen der Arthropoden und ein Homologisierungsversuch muß derzeit am völligen Fehlen von Indizien scheitern. Interessanter sind hier die Stacheln mancher Gastrotricha. Die Art *Stylochaeta fusiformis* beispielsweise besitzt paarige, in

regelmäßigen Abständen am Körper stehende Stacheln, und läßt somit eine Form von Körpersegmentierung erkennen (Lorenzen, 1996). Diese segmentalen, paarigen Stacheln können durch eigene Muskeln bewegt werden und erfüllen damit insgesamt drei Kriterien, die man an richtige Extremitäten stellen möchte.

Sollte die Ecdysozoa-Hypothese zutreffen, so wäre der offensichtliche Graben zwischen den primitiven Extremitäten-ähnlichen Entwicklungsansätzen bei den Nematelminthes und den relativ weit entwickelten Lobopodien der Onychophoren-Verwandtschaft ein Hinweis darauf, welche Menge an Zwischenformen uns im Verlauf der Evolution durch das Aussterben von Tiergruppen verloren gegangen sein muß.

Abschließend soll hier noch erwähnt werden, daß natürlich auch die andere große Tiergruppe, die Deuterostomia, Vertreter mit Gliedmaßen beherbergt. Die Wirbeltiere besitzen paarige Extremitäten, die sich, laut Befunden vor allem aus den Modellorganismen (Maus, Huhn, Krallenfrosch, Zebrafisch), nach verblüffend ähnlichen Mechanismen entwickeln, wie sie bislang aus den Arthropoden bekannt sind: fast alle Gene, die in *Drosophila* eine Rolle im Bein spielen, sind auch bei Vertebraten in der Beinentwicklung involviert (Vogt und Duboule, 1999). Und oft ist sogar der Kontext der Wirkung der Gene nahezu identisch, wie zum Beispiel Studien des *hth*-Homologons *Meis* im Huhn gezeigt haben (Mercader et al., 1999). Natürlich muß dabei zuerst an Homokratie gedacht werden, also das Entwickeln nicht homologer Organe durch konservierte, homologe Gen-Netzwerke (Nielsen und Martinez, 2003). Aber auch die Alternative, daß bereits der bilateralsymmetrische Ur-Organismus („Urbilateria“) Gliedmaßen besessen hat, muß vorurteilsfrei in Betracht gezogen werden (siehe dazu auch die Diskussion in Shubin et al. (1997)).

Auch wenn die vorangegangene Diskussion zur Evolution der Gliedmaßen bei Arthropoden und anderen Tiergruppen nicht zu endgültigen Antworten geführt hat und den Leser deshalb möglicherweise enttäuscht zurückläßt, so hoffe ich doch andererseits einen umfassenden Ein- und Überblick der Materie gegeben zu haben, der vielleicht zeigen kann, wie spannend diese Fragestellung ist und wie wenig wir bis heute darüber wissen.



## 5. Literatur

- Abu-Shaar, M., Mann, R.S. (1998). Generation of multiple antagonistic domains along the proximodistal axis during *Drosophila* leg development. *Development* 125, 3821-3830.
- Abu-Shaar, M., Ryoo, H.D., Mann, R.S. (1999). Control of the nuclear localization of Extradenticle by competing nuclear import and export signals. *Genes Dev.* 13, 935-945.
- Abzhanov, A., Kaufman, T.C. (2000). Homologs of *Drosophila* appendage genes in the patterning of arthropod limbs. *Dev. Biol.* 227, 683-689.
- Adoutte, A., Balavoine, G., Lartillot N., Lespinet, O., Prud'homme, B., de Rosa, R. (2000). The new animal phylogeny: reliability and implications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 97, 4453-4441.
- Affolter, M., Marty, T., Vigano, M.A. (1999). Balancing import and export in development. *Genes Dev.* 13, 913-915.
- Aguinaldo, A.M.A., Turbeville, J.M., Linford, L.S., Rivera, M.C., Garey, J.R., Raff, R.A., Lake, J.A. (1997). Evidence for a clade of nematodes, arthropods, and other molting animals. *Nature* 387, 489-493.
- Akam, M. (1995). *Hox* genes and the evolution of diverse body plans. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* 349, 313-319.
- Akiyama-Oda Y., Oda, H. (2003). Early patterning of the spider embryo: a cluster of mesenchymal cells at the cumulus produces Dpp signals received by germ disc epithelial cells. *Development* 130, 1735-1747.
- Almirantis, Y., Papageorgiou, S. (1999). Modes of morphogen cooperation for limb formation in vertebrates and insects. *J. theor. Biol.* 199, 235-242.
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D.J. (1997). Gapped BLAST and PsiBLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25, 3389-3402.
- Anderson, D.T. (1979). *Embryology and phylogeny in annelids and arthropods*. Pergamon Press, Oxford.
- Averof, M., Akam, M. (1995). Insect-crustacean relationships: insights from comparative developmental and molecular studies. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* 347, 293-303.

Averof, M., Cohen, S.M. (1997). Evolutionary origin of insect wings from ancestral gills. *Nature* 385, 627-630.

Babu, K.S., Barth, F.G. (1984). Neuroanatomy of the central nervous system of the wandering spider, *Cupiennius salei* (Arachnida, Araneida). *Zoomorphology* 104, 344-359.

Balfour, F.M. (1883). The anatomy and development of *Peripatus capensis*. *Quart. J. Microscop. Sci.* 23, 213-259 und Tafel 13-20.

Baonza, A., Garcia-Bellido, A. (2000). *Notch* signaling directly controls cell proliferation in the *Drosophila* wing disc. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 97, 2609-2614.

Beermann, A., Jay, D.G., Beeman, R.W., Hülkamp, M., Tautz, D., Jürgens, 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, 287-297.

Bergström, J. (1979). Morphology of fossil arthropods as a guide to phylogenetic relationships. In: *Arthropod Phylogeny*, Hrsg. A.P. Gupta. Van Nostrand Reinhold Company, New York. Pp. 3-56.

Bergström, J. (1980). Morphology and systematics of early arthropods. *Abh. Naturwiss. Ver. Hamburg N.F.* 23, 7-42.

Berthelsen, J., Kilstrup-Nielsen, C., Blasi, F., Mavilio, F., Zappavigna V. (1999). The subcellular localization of PBX1 and EXD proteins depends on nuclear import and export signals and is modulated by association with PREP1 and HTH. *Genes Dev.* 13, 946-953.

Bishop, S.A., Klein, T., Martinez Arias, A., Couso, J.P. (1999). Composite signalling from *Serrate* and *Delta* establishes leg segments in *Drosophila* through *Notch*. *Development* 126, 2993-3003.

Bitsch, J. (2001). The hexapod appendage: basic structure, development and origin. *Ann. Soc. Entomol. Fr. (N.S.)* 37, 175-193.

Blair, S.S. (2000). Imaginal Discs. In "Drosophila Protocols" (Hrsg. W. Sullivan, M. Ashburner und R. S. Hawley). Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York. Pp. 159-173.

Bohn, H. (1970a). Interkalare Regeneration und segmentale Gradienten bei den Extremitäten von *Leucophaea*-Larven (Blattaria). I. Femur und Tibia. *Roux's Archiv* 165, 303-341.

Bohn, H. (1970b). Interkalare Regeneration und segmentale Gradienten bei den Extremitäten von *Leucophaea*-Larven (Blattaria). II. Coxa und Trochanter. *Dev. Biol.* 23, 355-379.

Bohn, H. (1976). Tissue interactions in the regenerating cockroach leg. In: *Insect Development*, Hrsg. P.A. Lawrence. Blackwell Scientific Publications, Oxford. Pp. 170-185.

- Börner, C. (1921). Die Gliedmassen der Arthropoden. In "Handbuch der Morphologie der wirbellosen Tiere" (Hrsg. A. Lang und K. Hescheler). Verlag von Gustav Fischer, Jena. Pp. 649-694.
- Brook, W.J., Cohen, S.M. (1996). Antagonistic interactions between Wingless and Decapentaplegic responsible for dorsal-ventral pattern in the *Drosophila* leg. *Science* 273, 1373-1377.
- Brook, W.J., Ostafichuk, L.M., Piorecky, J., Wilkinson, M.D., Hodgetts, D.J., Russell, M.A. (1993). Gene expression during imaginal disc regeneration detected using enhancer-sensitive P-elements. *Development* 117, 1287-1297.
- Bryant, P.J. (1971). Regeneration and duplication following operations in situ on the imaginal discs of *Drosophila melanogaster*. *Dev. Biol.* 26, 606-615.
- Buckles, G.R., Rauskolb, C., Villano, J.L., Katz, F.N. (2001). *four-jointed* interacts with *dachs*, *abelson* and *enabled* and feeds back onto the *Notch* pathway to affect growth and segmentation in the *Drosophila* leg. *Development* 128, 3533-3542.
- Budd, G. (1993). A Cambrian gilled lobopod from Greenland. *Nature* 364, 709-711.
- Budd, G.E. (1996a). Progress and problems in arthropod phylogeny. *Trends Ecol. Evol.* 11, 356-358.
- Budd, G.E. (1996b). The morphology of *Opabinia regalis* and the reconstruction of the arthropod stem-group. *Lethaia* 29, 1-14.
- Budd, G.E. (1999). The morphology and phylogenetic significance of *Kerygmachela kierkegaardii* Budd (Buen Formation, Lower Cambrian, N Greenland). *Trans. R. Soc. Edinburgh Earth Sci.* 89, 249-290.
- Budd, G.E. (2001). Why are arthropods segmented? *Evol. Dev.* 3, 332-342.
- Budd, G.E. (2002). A palaeontological solution to the arthropod head problem. *Nature* 417, 271-275.
- Bulliere, D. (1971). Utilisation de la regeneration intercalaire pour l'étude de la determination cellulaire au cours de la morphogenese chez *Blabera craniifer* (Insecte Dictyoptere). *Dev. Biol.* 25, 672-709.
- Bürglin, T.R. (1997). Analysis of TALE superclass homeobox genes (MEIS, PBC, KNOX, Iroquois, TGIF) reveals a novel domain conserved between plants and animals. *Nucleic Acids Res.* 4173-4180.
- Bürglin, T.R. (1998). The PBC domain contains a MEINOX domain: coevolution of Hox and TALE homeobox genes? *Dev. Genes Evol.* 208, 113-118.
- Campbell, G. (2002). Distalization of the *Drosophila* leg by graded EGF-receptor activity. *Nature* 418, 781-785.

Campbell, G., Weaver, T., Tomlinson, A. (1993). Axis specification in the developing *Drosophila* appendage: the role of *wingless*, *decapentaplegic*, and the homeobox gene *aristaless*. *Cell* 74, 1113-1123.

Candiani, S., Kreslova, J., Benes, V., Oliveri, D., Castagnola, P., Pestarino, M., Kozmik, Z. (2003). Cloning and developmental expression of amphioxus *Dachshund*. *Gene Expr. Patterns*. 3, 65-69.

Carroll, S.B., Whyte, J.S. (1989). The role of the *hairy* gene during *Drosophila* morphogenesis: stripes in imaginal discs. *Genes Dev.* 3, 905-916.

Casares, F., Mann, R.S. (1998). Control of antennal versus leg development in *Drosophila*. *Nature* 392, 723-726.

Casares, F., Mann, R.S. (2001). The ground state of the ventral appendage in *Drosophila*. *Science* 293, 1477-1480.

Caubit, X., Thangarajah, R., Theil, T., Wirth, J., Nothwang, H.G., Rütter, U., Krauss, S. (1999). Mouse Dac, a novel nuclear factor with homology to *Drosophila* Dachshund shows a dynamic expression in the neural crest, the eye, the neocortex, and the limb bud. *Dev. Dyn.* 214, 66-80.

Chen, J.Y., Ramsköld, L., Zhou, G.Q. (1994). Evidence for monophyly and arthropod affinity of Cambrian giant predators. *Science* 264, 1304-1284.

Chu, J., Dong, P.D., Panganiban, G. (2002). Limb type-specific regulation of *bric a brac* contributes to morphological diversity. *Development* 129, 695-704.

Cisne, J.L. (1974). Trilobites and the origin of arthropods. *Science* 186, 13-18.

Cohen, S.M. (1993). Imaginal disc development. In: The development of *Drosophila melanogaster*. Hrsg. Bate, M., Martinez Arias, A. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor. Pp. 747-841.

Cohen, S.M., Brönner, G., Küttner, F., Jürgens, G., Jäckle, H. (1989). *Distal-less* encodes a homeodomain protein required for limb development in *Drosophila*. *Nature* 338, 432-434.

Cohen, S.M., Jürgens, G. (1989a). Proximal-distal pattern formation in *Drosophila*: cell autonomous requirement for *Distal-less* gene activity in limb development. *Embo J.* 8, 2045-2055.

Cohen, S.M., Jürgens, G. (1989b). Proximal-distal pattern formation in *Drosophila*: graded requirement for *Distal-less* gene activity during limb development. *Roux's Arch. Dev. Biol.* 198, 157-169.

Cohen, B., Simcox, A.A., Cohen, S.M. (1993). Allocation of the thoracic imaginal primordia in the *Drosophila* embryo. *Development* 117, 597-608.



- Colgan, D.J., McLauchlan, A., Wilson, G.D.F., Livingston, S.P., Edgecombe, G.D., Macaranas, J., Cassis, G., Gray, M.R. (1998). Histone H3 and U2 snRNA DNA sequences and arthropod molecular evolution. *Austral. J. Zool.* 46, 419-437.
- Condic, M.L., Fristrom, D., Fristrom, J.W. (1991). Apical cell shape changes during *Drosophila* leg disc elongation: a novel morphogenetic mechanism. *Development* 111, 23-33.
- Cook, C.E., Smith, M.L., Telford, M.J., Bastianello, A., Akam, M. (2001). *Hox* genes and the phylogeny of the arthropods. *Curr. Biol.* 11, 759-763.
- Coulter, D.E., Swaykus, E.A., Beran-Koehn, M.A., Goldberg, D., Wieschaus, E., Schedl, P. (1990). Molecular analysis of *odd-skipped*, a zinc finger encoding segmentation gene with a novel pair-rule expression pattern. *Embo J.* 9, 3795-3804.
- Couso, J.P., Bishop, S.A. (1998). Proximo-distal development in the legs of *Drosophila*. *Int. J. Dev. Biol.* 42, 345-352.
- Dahms, H.U. (2000). Phylogenetic implications of the Crustacean nauplius. *Hydrobiologia* 417, 91-99.
- Damen, W.G.M. (2002). Parasegmental organization of the spider embryo implies that the parasegment is an evolutionary conserved entity in arthropod embryogenesis. *Development* 129, 1239-1250.
- Damen, W.G.M., Hausdorf, M., Seyfarth, E.A., Tautz, D. (1998). The expression pattern of Hox genes in the spider *Cupiennius salei* suggests a conserved mode of head segmentation in arthropods. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 10665-10670.
- Damen, W.G.M., Saridaki, T., Averof, M. (2002). Diverse adaptations of an ancestral gill: a common evolutionary origin for wings, breathing organs, and spinnerets. *Curr. Biol.* 12, 1711-1716.
- Damen, W.G.M., Tautz, D. (1998). A Hox class 3 orthologue from the spider *Cupiennius salei* is expressed in a Hox-gene-like fashion. *Dev. Genes Evol.* 208, 586-590.
- Damen, W.G.M., Weller, M., Tautz, D. (2000). The expression patterns of *hairy*, *even-skipped*, and *runt* in the spider *Cupiennius salei* imply that these genes were segmentation genes in a basal arthropod. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 4515-4519.
- Davis, R.J., Shen, W., Heanue, T.A., Mardon, G. (1999). Mouse *Dach*, a homologue of *Drosophila dachshund*, is expressed in the developing retina, brain and limbs. *Dev. Genes Evol.* 209, 526-536.
- de Celis, J.F. (2003). Pattern formation in the *Drosophila* wing: the development of the veins. *BioEssays* 25, 443-451.

de Celis, J.F., de Celis, J., Ligoxygakis, P., Preiss, A., Delidakis, C., Bray, S. (1996). Functional relationships between *Notch*, *Su(H)* and the bHLH genes of the *E(spl)* complex: the *E(spl)* genes mediate only a subset of *Notch* activities during imaginal development. *Development* 122, 2719-2728.

de Celis, J.F., Tyler, D.M., de Celis, J., Bray, S.J. (1998). Notch signalling mediates segmentation of the *Drosophila* leg. *Development* 125, 4617-4626.

de Celis Ibeas, J.M., Bray, S.J. (2003). *Bowl* is required downstream of *Notch* for elaboration of distal limb patterning. *Development* 130, 5943-5952.

Detera-Wadleigh, S.D., Fanning, T.G. (1994). Phylogeny of the steroid receptor superfamily. *Mol. Phylogenet. Evol.* 3, 192-205.

Deutsch, J. (2001). Are Hexapoda members of the Crustacea? Evidence from comparative developmental genetics. *Ann. Soc. Entomol. Fr. N.S.* 37, 41-49.

Dewel, R.A., Dewel, W.C. (1997). The place of tardigrades in arthropod evolution. In: *Arthropod Relationships*, Hrsg. R.A. Fortey, R.H. Thomas. Chapman & Hall, London. Pp. 109-123.

Diaz-Benjumea, F.J., Cohen, B., Cohen, S.M. (1994). Cell interaction between compartments establishes the proximal-distal axis of *Drosophila* legs. *Nature* 372, 175-179.

Dohle, W. (1964). Die Embryonalentwicklung von *Glomeris marginata* (Villers) im Vergleich zur Entwicklung anderer Diplopoden. *Zool. Jb. Anat.* 81, 241-310.

Dohle, W. (1974). The segmentation of the germ band of Diplopoda compared with other classes of arthropods. *Symp. Zool. Soc. Lond.* 32, 143-161.

Dohle, W. (1980). Sind die Myriapoden eine monophyletische Gruppe? *Abh. Naturwiss. Ver. Hamburg N.F.* 23, 45-104.

Dohle, W. (1997). Myriapod-insect relationships as opposed to an insect-crustacean sister group relationship. In: *Arthropod Relationships*. Hrsg. R.A. Fortey, R.H. Thomas. Chapman & Hall, London. Pp. 305-315.

Dohle, W. (2001). Are the insects terrestrial crustaceans? A discussion of some new facts and arguments and the proposal of the proper name 'Tetraconata' for the monophyletic unit Crustacea plus Hexapoda. *Ann. Soc. Entomol. Fr. (N.S.)* 37, 85-103.

Dong, P. D. S., Chu, J., Panganiban, G. (2000). Coexpression of the homeobox genes *Distal-less* and *homothorax* determines *Drosophila* antennal identity. *Development* 127, 209-216.

Dong, P.D.S., Chu, J., Panganiban, G. (2001). Proximodistal domain specification and interactions in developing *Drosophila* appendages. *Development* 128, 2365-2372.

- Dong, P.D.S., Scholz Dicks, J., Panganiban, G. (2002). *Distal-less* and *homothorax* regulate multiple targets to pattern the *Drosophila* antenna. *Development* 129, 1967-1974.
- Dove, H. (2003). Neurogenesis in the millipede *Glomeris marginata* (Myriapoda: Diplopoda). Dissertation. Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät der Universität zu Köln. Pp. 1-143.
- Dove, H., Stollewerk, A. (2003). Comparative analysis of neurogenesis in the myriapod *Glomeris marginata* (Diplopoda) suggests more similarities to chelicerates than to insects. *Development* 130, 2161-2171.
- Duronio, R.J. (1999). Establishing links between developmental signaling pathways and cell-cycle regulation in *Drosophila*. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 9, 81-88.
- Edgecombe, G.D. (1998). Devonian terrestrial arthropods from Gondwana. *Nature* 394, 172-175.
- Edgecombe, G.D., Wilson, G.D.F., Colgan, D.J., Gray, M.R., Cassis, G. (2000). Arthropod cladistics: combined analysis of histone H3 and U2 snRNA sequences and morphology. *Cladistics* 16, 155-203.
- Emerald, B.S., Cohen, S.M. (2001). Limb development: Getting down to the ground state. *Curr. Biol.* 11, R1025-R1027.
- Emerson, M.J., Schram, F.R. (1990). The origin of crustacean biramous appendages and the evolution of Arthropoda. *Science* 250, 667-669.
- Emerson, M.J., Schram, F.R. (1997). Theories, patterns, and reality: game plan for arthropod phylogeny. In: *Arthropod Relationships*, Hrsg. R.A. Fortey, R.H. Thomas. Chapman & Hall, London. Pp. 67-86.
- Entchev, E.V., Schwabedissen, A., Gonzalez-Gaitan, M. (2000). Gradient formation of the TGF-beta homolog Dpp. *Cell* 103, 981-991.
- Eriksson, B.J., Budd, G.E. (2000). Onychophoran cephalic nerves and their bearing on our understanding of head segmentation and stem-group evolution of Arthropoda. *Arthropod Struct. Dev.* 29, 197-209.
- Eriksson, B.J., Tait, N.N., Budd, G.E. (2003). Head development in the Onychophoran *Euperipatoides kanangrensis* with particular reference to the central nervous system. *J. Morph.* 255, 1-23.
- Fanenbruck, M., Harzsch, S., Wägele, J.W. (2004). The brain of the Remipedia (Crustacea) and an alternative hypothesis on their phylogenetic relationships. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 101, 3868-3873.
- Finnerty, J.R. (2003). The origins of axial patterning in the metazoa: how old is bilateral symmetry? *Int. J. Dev. Biol.* 47, 523-529.

- Fisher, A., Caudy, M. (1998). The functions of hairy-related bHLH repressor proteins in cell fate decisions. *BioEssays* 20, 298-306.
- Flegel, W.A., Singson, A.W., Margolis, J.S., Bang, A.G., Posakony, J.W., Murre, C. (1993). *Dpbx*, a new homeobox gene closely related to the human proto-oncogene *pbx1*: molecular structure and developmental expression. *Mech. Dev.* 41, 155-161.
- Fleming, R.J. (1998). Structural conservation of Notch receptors and ligands. *Semin. Cell Dev. Biol.* 9, 599-607.
- FlyBase Consortium (2003). The FlyBase database of the *Drosophila* genome projects and community literature. *Nucleic Acids Res.* 31, 172-175.
- Friedrich, M., Tautz, D. (1995). Ribosomal DNA phylogeny of the major extant arthropod classes and the evolution of the myriapods. *Nature* 376, 165-167.
- Friedrich, M., Tautz, D. (2001). Arthropod rDNA phylogeny revisited: a consistency analysis using Monte Carlo simulation. *Ann. Soc. Entomol. Fr. (N.S.)* 37, 21-40.
- Fristrom, D., Fristrom, J.W. (1975). The mechanism of evagination of imaginal discs of *Drosophila melanogaster*. *Dev. Biol.* 43, 1-23.
- Fristrom, D., Fristrom, J.W. (1993). The metamorphic development of the adult epidermis. In: The development of *Drosophila melanogaster*. Hrsg. M.Bate, A. Martinez-Arias. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor. Pp. 843-897.
- Fryer, G. (1996). Reflections on arthropod evolution. *Biol. J. Linn. Soc.* 58, 1-55.
- Fryer, G. (1997). A defence of arthropod polyphyly. In: *Arthropod Relationships*, Hrsg. R.A. Fortey, R.H. Thomas. Chapman & Hall, London. Pp. 23-33.
- Galindo, M. I., Bishop, S.A., Greig, S., Couso, J.P. (2002). Leg patterning driven by proximal-distal interactions and EGFR signaling. *Science* 297, 256-259.
- Galindo, M.I., Couso, J.P. (2000). Intercalation of cell fates during tarsal development in *Drosophila*. *BioEssays* 22, 777-780.
- Garcia-Machado, E., Pempera, M., Dennebouy, N., Oliva-Suarez, M., Mounolou, J.C., Monnerot, M. (1999). Mitochondrial genes collectively suggest the paraphyly of Crustacea with respect to Insecta. *J. Mol. Evol.* 49, 142-149.
- Giribet, G., Carranza, S., Baguna, J., Riutort, M., Ribera, C. (1996). First molecular evidence for the existence of a Tardigrada + Arthropoda clade. *Mol. Biol. Evol.* 13, 76-84.
- Giribet, G., Edgecombe, G.D., Wheeler, W.C. (2001). Arthropod phylogeny based on eight molecular loci and morphology. *Nature* 413, 157-161.
- Giribet, G., Ribera, C. (2000). A review of arthropod phylogeny. new data based on ribosomal DNA sequences and direct character optimization. *Cladistics* 16, 204-231.

- Gonnet, G.H., Cohen, M.A., Brenner, S.A. (1992). Exhaustive matching of the entire protein sequence database. *Science* 256, 1443-1445.
- Gonzalez-Crespo, S., Morata, G. (1995). Control of *Drosophila* adult pattern by *extradenticle*. *Development* 121, 2117-2125.
- Gonzalez-Crespo, S., Morata, G. (1996). Genetic evidence for the subdivision of the arthropod limb into coxopodite and telopodite. *Development* 122, 3921-3928.
- Goodman, C. S., Doe, C. Q. (1993). Embryonic development of the *Drosophila* central nervous system. In "The Development of *Drosophila melanogaster*" (Hrsg. M. Bate und A. Martinez-Arias A). Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor. Pp. 1131-1206.
- Goto, S., Hayashi, S. (1997). Specification of the embryonic limb primordium by graded activity of Decapentaplegic. *Development* 124, 125-132.
- Greco, V., Hannus, M., Eaton, S. (2001). Argosomes: a potential vehicle for the spread of morphogens through epithelia. *Cell* 106, 633-645.
- Griffin, K.J. P., Stoller, J., Gibson, M., Chen, S., Yelon, D., Stainier, D.Y.R., Kimelman, D. (2000). A Conserved Role for *H15*-Related T-Box Transcription Factors in Zebrafish and *Drosophila* Heart Formation. *Dev. Biol.* 218, 235-247.
- Hammond, K.L., Hanson, I.M., Brown, A.G., Lettice, L.A., Hill, R.E. (1998). Mammalian and *Drosophila dachshund* genes are related to the *Ski* proto-oncogene and are expressed in eye and limb. *Mech. Dev.* 74, 121-131.
- Hammond, K.L., Hill, R.E., Whitfield, T.T., Currie, P.D. (2002). Isolation of three zebrafish *dachshund* homologues and their expression in sensory organs, the central nervous system and pectoral fin buds. *Mech. Dev.* 112, 183-189.
- Hao, I., Green, R.B., Dunaevsky, O., Lengyel, J.A., Rauskolb, C. (2003). The *odd-skipped* family of zinc finger genes promotes *Drosophila* leg segmentation. *Dev. Biol.* 263, 282-295.
- Held, L.I. (1995). Axes, boundaries and coordinates: the ABCs of fly leg development. *BioEssays* 17, 721-732.
- Henikoff, S., Henikoff, J.G. (1992). Amino acid substitution matrices from protein blocks. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89, 10915-10919.
- Hessler, R.R. (1992). Reflections on the phylogenetic position of the Cephalocarida. *Acta Zool.* 73, 315-316.
- Holland, P.W.H. (2001). Beyond the Hox: how widespread is homeobox gene clustering? *J. Anat.* 199, 13-23.
- Hughes, C.L., Kaufman, T.C. (2002). Exploring myriapod segmentation: the expression patterns of *even-skipped*, *engrailed*, and *wingless* in a centipede. *Dev. Biol.* 247, 47-61.

Hwang, U. W., Friedrich, M., Tautz, D., Park, C. J., Kim, W. (2001). Mitochondrial protein phylogeny joins myriapods with chelicerates. *Nature* 413, 154-157.

Inoue, Y., Mito, T., Miyawaki, K., Matsushima, K., Shinmyo, Y., Heanue, T.A., Mardon, G., Ohuchi, H., 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, 141-148.

Janssen, R., Prpic, N.M., Damen, W.G.M. (2004). Gene expression suggests decoupled dorsal and ventral segmentation in the millipede *Glomeris marginata* (Myriapoda: Diplopoda). *Dev. Biol.* 268, 89-104.

Jaw, T.J., You, L.R., Knoepfler, P.S., Yao, L.C., Pai, C.Y., Tang, C.Y., Chang, L.P., Berthelsen, J., Blasi, F., Kamps, M.P., Sun, Y.H. (2000). Direct interaction of two homeoproteins, Homothorax and Extradenticle, is essential for EXD nuclear localization and function. *Mech. Dev.* 91, 279-291.

Jeannel, R. (1925). Sur les homologies des articles de la patte des insectes. *Arch. Zool. Exp. Gener. Notes Rev.* 64, 37-55.

Jiang, J., Struhl, G. (1996). Complementary and mutually exclusive activities of Decapentaplegic and Wingless organize axial patterning during *Drosophila* leg development. *Cell* 86, 401-409.

Jockusch, E.L., Nulsen, C., Newfeld, S.J., 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, 1617-1626.

Jockusch, E.L., Ober, K.A. (2000). Phylogenetic analysis of the *Wnt* gene family and discovery of an arthropod *Wnt-10* orthologue. *J. Exp. Zool. (Mol. Dev. Evol.)* 288, 105-119.

Kerber, B., Fellert, S., Hoch, M. (1998). Seven-up, the *Drosophila* homolog of the COUP-TF orphan receptors, controls cell proliferation in the insect kidney. *Genes Dev.* 12, 1781-1786.

Kerber, B., Monge, I., Müller, M., Mitchell, P.J., Cohen, S.M. (2001). The *AP-2* transcription factor is required for joint formation and cell survival in *Drosophila* leg development. *Development* 128, 1231-1238.

Kim, C.W. (1959). The differentiation centre inducing the development from larval to adult leg in *Pieris brassicae* (Lepidoptera). *J. Embryol. Exp. Morph.* 7, 572-582.

Klass, K.D., Kristensen, N.P. (2001). The ground plan and affinities of hexapods: recent progress and open problems. *Ann. Soc. Entomol. Fr. N.F.* 37, 265-298.

Klingler, M., Gergen, P. (1993). Regulation of *runt* transcription by *Drosophila* segmentation genes. *Mech. Dev.* 43, 3-19.

- Klingler, M., Tautz, D. (1999). Formation of embryonic axes and blastoderm pattern in *Drosophila*. In: Development, Genetics, Epigenetics and Environmental Regulation, Hrsg. V.E.A. Russo, D.J. Cove, L.G. Edgar, R. Jaenisch, F. Salamini. Springer Verlag, Berlin. Pp. 311-330.
- Klueg, K.M., Muskavitch, M.A.T. (1999). Ligand-receptor interactions and trans-endocytosis of Delta, Serrate, and Notch: members of the Notch signalling pathway in *Drosophila*. *J. Cell Sci.* 112, 3289-3297.
- Knoepfler, P.S., Calvo, K.R., Chen, H., Antonarakis, S.E., Kamps, M.P. (1997). Meis1 and pKnox1 bind DNA cooperatively with Pbx1 utilizing an interaction surface disrupted in oncoprotein E2a-Pbx1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94, 14553-14558.
- Kojima, T., Sato, M., Saigo, K. (2000). Formation and specification of distal leg segments in *Drosophila* by dual *Bar* homeobox genes, *BarH1* and *BarH2*. *Development* 127, 769-778.
- Kozmik, Z., Pfeffer, P., Kralova, J., Paces, J., Paces, V., Kalousova, A., Cvekl, A. (1999). Molecular cloning and expression of the human and mouse homologues of the *Drosophila dachshund* gene. *Dev. Genes Evol.* 209, 537-545.
- Kraus, O. (1997). Phylogenetic relationships between higher taxa of tracheate arthropods. In: *Arthropod Relationships*, Hrsg. R.A. Fortey, R.H. Thomas. Chapman & Hall, London. Pp. 295-303.
- Kraus, O. (2001). "Myriapoda" and the ancestry of the Hexapoda. *Ann. Soc. Entomol. Fr. (N.S.)* 37, 105-127.
- Kraus, O., Kraus, M. (1993). Phylogenetisches System der Tracheata: Die Frage nach der Schwestergruppe der Insekten. *Mitt. Dtsch. Ges. Allg. Angew. Ent.* 8, 441-445.
- Kristensen, R.M. (1991). Loricifera- A general biological and phylogenetic overview. *Verh. Dtsch. Zool. Ges.* 84, 231-246.
- Kristensen R.M., Higgins, R.P. (1991). Kinorhyncha. *Microscopic Anatomy of Invertebrates* 4, 377-404.
- Kubota, K., Goto, S., Eto, K., Hayashi, S. (2000). EGF receptor attenuates Dpp signaling and helps to distinguish the wing and leg cell fates in *Drosophila*. *Development* 127, 3769-3776.
- Kukalova-Peck, J. (1992). The "Uniramia" do not exist: the ground-plan of Pterygota as revealed by Permian Diaphanopteroidea from Russia (Insecta: Palaeodictyopteroidea). *Canad. J. Zool.* 70, 236-255.
- Kukalova-Peck, J. (1997). Arthropod phylogeny and "basal" morphological structures. In: *Arthropod Relationships*, Hrsg. R.A. Fortey, R.H. Thomas. Chapman & Hall, London. Pp. 249-268.

- Kumar, J. P., Moses, K. (2001). Expression of evolutionarily conserved eye specification genes during *Drosophila* embryogenesis. *Dev. Genes Evol.* 211, 406-414.
- Kurant, E., Pai, C. Y., Sharf, R., Halachmi, N., Sun, Y. H., Salzberg, A. (1998). *dorsototals/homothorax*, the *Drosophila* homologue of *Meis1*, interacts with *extradenticle* in the patterning of the embryonic PNS. *Development* 125, 1037-1048.
- Kurant, E., Eytan, D. Salzberg, A. (2001). Mutational analysis of the *Drosophila homothorax* gene. *Genetics* 157, 689-698.
- Kurusu, M., Nagao, T., Walldorf, U., Flister, S., Gehring, W. J., Furukubo-Tokunaga, K. (2000). Genetic control of development of the mushroom bodies, the associative learning centers in the *Drosophila* brain, by the *eyeless*, *twin of eyeless*, and *dachshund* genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 2140-2144.
- Kuske, G., Penner, M.L., Piepho, H. (1961). Zur Metamorphose des Schmetterlingsbeines. *Biol. Zentrbl.* 80, 347-351.
- Lauterbach, K.E. (1972). Über die sogenannte Ganzbein-Mandibel der Tracheata, insbesondere der Myriapoda. *Zool. Anz.* 188, 145-154.
- Lauterbach, K.E. (1980a). Schlüsselereignisse in der Evolution des Grundplans der Mandibulata (Arthropoda). *Verh. Naturwiss. Ver. Hamburg N.F.* 23, 105-162.
- Lauterbach, K.E. (1980b). Schlüsselereignisse in der Evolution des Grundplans der Arachnata (Arthropoda). *Verh. Naturwiss. Ver. Hamburg N.F.* 23, 163-327.
- Lecuit, T., Brook, W.J., Ng, M., Calleja, M., Sun, H., Cohen S.M. (1996). Two distinct mechanisms for long-range patterning by Decapentaplegic in the *Drosophila* wing. *Nature* 381, 387-393.
- Lecuit, T., Cohen, S.M. (1997). Proximal-distal axis formation in the *Drosophila* leg. *Nature* 388, 139-145.
- Lissemore, J.L., Starmer, W.T. (1999). Phylogenetic analysis of vertebrate and invertebrate Delta/Serrate/LAG-2 (DSL) proteins. *Mol. Phylogenet. Evol.* 11, 308-319.
- Llimargas, M., Lawrence, P.A. (2001). Seven *Wnt* homologues in *Drosophila*: a case study of the developing tracheae. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 98, 14487-14492.
- Loosli, F., Mardon, G., Wittbrodt, J. (2002). Cloning and expression of medaka *Dachshund*. *Mech. Dev.* 112, 203-206.
- Lorenzen, S. (1996). Gastrotricha, Bauchhärlinge. In: *Spezielle Zoologie, Teil 1: Einzeller und Wirbellose Tiere*. Hrsg. W. Westheide, R. Rieger. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart. Pp. 685-691.
- Machida, R. (2000). Serial homology of the mandible and maxilla in the Jumping Bristletail *Pedetontus unimaculatus* Machida, based on external embryology (Hexapoda: Archaeognatha, Machilidae). *J. Morph.* 245, 19-28.



- Mallat, J.M., Garey, J.R., Shultz, J.W. (2004). Ecdysozoan phylogeny and Bayesian inference: first use of nearly complete 28S and 18S rRNA gene sequences to classify the arthropods and their kin. *Mol. Phylogenet. Evol.* 31, 178-191.
- Manton, S.M. (1977). *The Arthropoda. Habits, Functional Morphology, and Evolution.* Clarendon Press, Oxford.
- Mardon, G., Solomon, N.M., Rubin, G.M. (1994). *dachshund* encodes a nuclear protein required for normal eye and leg development in *Drosophila*. *Development* 120, 3473-3486.
- Marsh, J.L., Theisen, H. (1999). Regeneration in insects. *Semin. Cell. Dev. Biol.* 10, 365-375.
- Martini, S. R., Roman, G., Meuser, S., Mardon, G., Davis R. L. (2000). The retinal determination gene, *dachshund*, is required for mushroom body cell differentiation. *Development* 127, 2663-2672.
- Maves, L., Schubiger, G. (1998). A molecular basis for transdetermination in *Drosophila* imaginal discs: interactions between *wingless* and *decapentaplegic* signaling. *Development* 125, 115-124.
- Melzer, R.R., Michalke, C., Smola, U. (2000). Walking on insect paths? Early ommatidial development in the compound eye of the ancestral crustacean, *Triops cancriformis*. *Naturwissenschaften* 87, 308-311.
- Mercader, N., Leonardo, E., Azpizu, N., Serrano, A., Morata, G., Martínez-A, C., Torres, M. (1999). Conserved regulation of proximodistal limb axis development by *Meis1/hth*. *Nature* 402, 425-429.
- Milan, M., Cohen, S.M. (2000). Subdividing cell populations in the developing limbs of *Drosophila*: do wing veins and leg segments define units of growth control? *Dev. Biol.* 217, 1-9.
- Milan, M., Perez, L., Cohen, S.M. (2002). Short-range cell interactions and cell survival in the *Drosophila* wing. *Dev. Cell* 2, 797-805.
- Min, G.S., Kim, S.H., Kim, W. (1998). Molecular phylogeny of arthropods and their relatives: polyphyletic origin of arthropodization. *Mol. Cells* 8, 75-83.
- Minelli, A. (2003). The origin and evolution of appendages. *Int. J. Dev. Biol.* 47, 573-581.
- Mittmann, B., Scholtz, G. (2001). *Distal-less* expression in embryos of *Limulus polyphemus* (Chelicerata, Xiphosura) and *Lepisma saccharina* (Insecta, Zygentoma) suggests a role in the development of mechanoreceptors, chemoreceptors, and the CNS. *Dev. Genes Evol.* 211, 232-243.

Mittmann, B., Scholtz, G. (2003). Development of the nervous system in the "head" of *Limulus polyphemus* (Chelicerata: Xiphosura): morphological evidence for a correspondence between the segments of the chelicerae and of the (first) antennae of Mandibulata. *Dev. Genes Evol.* 213, 9-17.

Mirth, C., Akam, M. (2002). Joint development in the *Drosophila* leg: cell movements and cell populations. *Dev. Biol.* 246, 391-406.

Mishra, A., Agrawal, N., Banerjee, S., Sardesai, D., Dalal, J.S., Bhojwani, J., Sinha, P. (2001). Spatial regulation of Delta expression mediates Notch signalling for segmentation of *Drosophila* legs. *Mech. Dev.* 105, 115-127.

Mito, T., Inoue, Y., Kimura, S., Miyawaki, K., Niwa, N., Shinmyo, Y., Ohuchi, H., Noji, S. (2002). Involvement of *hedgehog*, *wingless*, and *dpp* in the initiation of proximodistal axis formation during the regeneration of insect legs, a verification of the modified boundary model. *Mech. Dev.* 114, 27-35.

Monge, I., Krishnamurthy, R., Sims, D., Hirth, F., Spengler, M., Kammermeier, L., Reichert, H., Mitchell, P.J. (2001). *Drosophila* transcription factor *AP-2* in proboscis, leg and brain central complex development. *Development* 128, 1239-1252.

Monge, I., Mitchell, P.J. (1998). *DAP-2*, the *Drosophila* homolog of transcription factor *AP-2*. *Mech. Dev.* 76, 191-195.

Morata, G., Sanchez-Herrero, E. (1999). Patterning mechanisms in the body trunk and the appendages of *Drosophila*. *Development* 126, 2823-2828.

Müller, C.H.G., Rosenberg, J., Richter, S., Meyer-Rochow, V.B. (2003). The compound eye of *Scutigera coleoptrata* (Linnaeus, 1758) (Chilopoda: Notostigmophora): an ultrastructural reinvestigation that adds support to the Mandibulata concept. *Zoomorphology* 122, 191-209.

Nardi, F., Spinsanti, G., Boore, J.L., Carapelli, A., Dallai, R., Frati, F. (2003). Hexapod origins: monophyletic or paraphyletic? *Science* 299, 1887-1889.

Negrisoló, E., Minelli, A., Valle, G. (2004). The mitochondrial genome of the House Centipede *Scutigera* and the monophyly versus the paraphyly of myriapods. *Mol. Biol. Evol.* 21, 770-780.

Nellen, D., Burke, R., Struhl, G., Basler, K. (1996). Direct and long-range action of a DPP morphogen gradient. *Cell* 85, 357-368.

Neumann, C.J., Cohen, S.M. (1998). Boundary formation in *Drosophila* wing: Notch activity attenuated by the POU protein Nubbin. *Science* 281, 409-413.

Ng, M., Diaz-Benjumea, F.J., Cohen, S.M. (1995). *nubbin* encodes a POU-domain protein required for proximal-distal patterning in the *Drosophila* wing. *Development* 121, 589-599.

- Nielsen, C., Martinez, P. (2003). Patterns of gene expression. homology or homocracy? *Dev. Genes Evol.* 213, 149-154.
- Niwa, N., Inoue, Y., Nozawa, A., Saito, M., Misumi, Y., Ohuchi, H., Yoshioka, H., Noji, S. (2000). Correlation of diversity of leg morphology in *Gryllus bimaculatus* (cricket) with divergence in *dpp* expression pattern during leg development. *Development* 127, 4373-4381.
- Niwa, N., Saitoh, M., Ohuchi, H., Yoshioka, H., Noji, S. (1997). Correlation between *Distal-less* expression patterns and structures of appendages in development of the Two-Spotted Cricket, *Gryllus bimaculatus*. *Zool. Sci.* 14, 115-125.
- Norbeck, B.A., Denburg, J.L. (1991). Pattern formation during insect leg segmentation: studies with a prepatter of a cell surface antigen. *Roux's Arch. Dev. Biol.* 199, 476-491.
- Noveen, A., Daniel, A., Hartenstein, V. (2000). Early development of the *Drosophila* mushroom body: the roles of *eyeless* and *dachshund*. *Development* 127, 3475-3488.
- Nulsen, C., Nagy, L.M. (1999). The role of *wingless* in the development of multibranching crustacean limbs. *Dev. Genes Evol.* 209, 340-348.
- Olesen, J., Richter, S., Scholtz, G. (2001). The evolutionary transformation of phyllopodous to stenopodous limbs in the Branchiopoda (Crustacea)- is there a common mechanism for early limb development in arthropods? *Int. J. Dev. Biol.* 45, 869-876.
- Pai, C.Y., Kuo, T.S., Jaw, T.J., Kurant, E., Chen, C.T., Bessarab, D.A., Salzberg, A., Sun, Y.H. (1998). The Homothorax homeoprotein activates the nuclear localization of another homeoprotein, Extradenticle, and suppresses eye development in *Drosophila*. *Genes Dev.* 12, 435-446.
- Panganiban, G. (2000). *Distal-less* function during *Drosophila* appendage and sense organ development. *Dev. Dyn.* 218, 554-562.
- Panganiban, G., Nagy, L., Carroll, S.B. (1994). The role of the *Distal-less* gene in the development and evolution of insect limbs. *Curr. Biol.* 4, 671-675.
- Panganiban, G., Rubenstein, J. L. R. (2002). Developmental functions of the *Distal-less/Dlx* homeobox genes. *Development* 129, 4371-4386.
- Panganiban, G., Sebring, A., Nagy, L., Carroll, S. (1995). The development of crustacean limbs and the evolution of arthropods. *Science* 270, 1363-1366.
- Paulus, H. (1996). Euarthropoda, Gliederfüßer i.e.S. In: Spezielle Zoologie, Teil 1: Einzeller und Wirbellose Tiere. Hrsg. W. Westheide, R. Rieger. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart. Pp. 435-444.
- Paulus, H.F. (2000). Phylogeny of the Myriapoda-Crustacea-Insecta: a new attempt using photoreceptor structure. *J. Zool. Syst. Evol. Res.* 38, 189-208.

- Pflugfelder, O. (1968). Onychophora. Grosses Zoologisches Praktikum, Heft 13a. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart. Pp. 1-42.
- Pisani, D., Poling, L.L., Lyons-Weiler, M., Hedges, S.B. (2004). The colonization of land by animals: molecular phylogeny and divergence among arthropods. *BMC Biology* 2:1 (pp. 1-10).
- Poeck, B., Hofbauer, A., Pflugfelder G.O. (1993). Expression of the *Drosophila optomotor-blind* gene transcript in neuronal and glial cells of the developing nervous system. *Development* 117, 1017-1029.
- Popadic, A., Panganiban, G., Rusch, D., Shear, W.A., Kaufman, T. (1998). Molecular evidence for the gnathobasic derivation of arthropod mandibles and for the appendicular origin of the labrum and other structures. *Dev. Genes Evol.* 208, 142-150.
- Popadic, A., Rusch, D., Peterson, M., Rogers, B.T., Kaufman, T. (1996). Origin of the arthropod mandible. *Nature* 380, 395.
- Potts, F.A. (1913). Methods of reproduction in the syllids. *Ergeb. Fortschr. Zool.* 3, 1-72.
- Prince, V.E., Pickett, F.B. (2002). Splitting pairs: the diverging fates of duplicated genes. *Nat. Rev. Genet.* 3, 827-837.
- Prpic, N.M. (2000). Molekularbiologische Untersuchungen zur Embryonalentwicklung der prosomalen Extremitäten bei der Spinne *Cupiennius salei* (Keyserling), 1877 (Arachnida, Araneae, Ctenidae). Diplomarbeit, Fakultät für Biologie, Ludwig-Maximilians-Universität, München
- Prpic, N.M., Wigand, B. Damen, W.G.M., Klingler, M. (2001). Expression of *dachshund* in wild-type and *Distal-less* mutant *Tribolium* corroborates serial homologies in insect appendages. *Dev. Genes Evol.* 211, 467-477.
- Prud'homme, B., Lartillot, N., Balavoine, G., Adoutte, A., Vervoort, M. (2002). Phylogenetic analysis of the Wnt gene family. Insights from lophotrochozoan members. *Curr. Biol.* 12, 1395-1400.
- Raftery, L.A., Sutherland, D.J. (1999). TGF-beta family signal transduction in *Drosophila* development: from Mad to Smads. *Dev. Biol.* 210, 251-268.
- Ramsköld, L., Xianguang, H. (1991). New early Cambrian animal and onychophoran affinities of enigmatic metazoans. *Nature* 351, 225-228.
- Rauskolb, C. (2001). The establishment of segmentation in the *Drosophila* leg. *Development* 128, 4511-4521.
- Rauskolb, C., Irvine, K.D. (1999). Notch-mediated segmentation and growth control of the *Drosophila* leg. *Dev. Biol.* 210, 339-350.

- Rauskolb, C., Peifer, M., Wieschaus, E. (1993). *extradenticle*, a regulator of homeotic gene activity, is a homolog of the homeobox-containing human proto-oncogene *pbx1*. *Cell* 74, 1101-1112.
- Rauskolb, C., Smith, K.M., Peifer, M., Wieschaus, E. (1995). *extradenticle* determines segmental identities throughout *Drosophila* development. *Development* 121, 3663-3673.
- Regier, J.C., Shultz, J.W. (1997). Molecular phylogeny of the major arthropod groups indicates polyphyly of crustaceans and a new hypothesis for the origin of hexapods. *Mol. Biol. Evol.* 14, 902-913.
- Richter, S. (2002). The Tetraconata concept: hexapod-crustacean relationships and the phylogeny of Crustacea. *Org. Divers. Evol.* 2, 217-237.
- Rieckhof, G.E., Casares, F., Ryoo, H.D., Abu-Shaar, M., Mann, R.S. (1997). Nuclear translocation of Extradenticle requires *homothorax*, which encodes an Extradenticle-related homeodomain protein. *Cell* 91, 171-183.
- Rincon-Limas, D.E., Lu, C.H., Canal, I., Calleja, M., Rodriguez-Esteban, C., Izpisua-Belmonte, J.C., Botas, J. (1999). Conservation of the expression and function of *apterous* orthologs in *Drosophila* and mammals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96, 2165-2170.
- Rivera-Pomar, R., Jäckle, H. (1996). From gradients to stripes in *Drosophila* embryogenesis: filling the gaps. *Trends Genet.* 12, 478-483.
- Ryoo, H.D., Marty, T., Casares, F., Affolter, M., Mann, R.S. (1999). Regulation of Hox target genes by a DNA bound Homothorax/Hox/Extradenticle complex. *Development* 126, 5137-5148.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning*. 2. Ausgabe. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.
- Sambrook, J., Russell, D.W. (2001). *Molecular Cloning*. 3. Ausgabe. 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., 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.
- Schmidt-Rhaesa, A., Bartolomeaus, T., Lemburg, C., Ehlers, U., Garey, J.R. (1998). The position of the Arthropoda in the phylogenetic system. *J. Morph.* 238, 263-285.
- Schminke, H.K. (1996). Crustacea, Krebse. In: *Spezielle Zoologie, Teil 1: Einzeller und Wirbellose Tiere*. Hrsg. W. Westheide, R. Rieger. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart. Pp. 501-581.
- Scholtz, G., Mittmann, B., Gerberding, M. (1998). The pattern of *Distal-less* expression in the mouthparts of crustaceans, myriapods and insects: new evidence for a gnathobasic mandible and the common origin of Mandibulata. *Int. J. Dev. Biol.* 42, 801-810.

Schoppmeier, M., Damen, W.G.M. (2001). Double-stranded RNA interference in the spider *Cupiennius salei*: the role of *Distal-less* is evolutionarily conserved in arthropod appendage formation. *Dev. Genes Evol.* 211, 76-82.

Schram, F.R., Emerson, M.J. (1991). Arthropod pattern theory: a new approach to arthropod phylogeny. *Mem. Queensl. Mus.* 31, 1-18.

Schram, F.R., Koenemann, S. (2001). Developmental genetics and arthropod evolution: part I, on legs. *Evol. Dev.* 3, 343-354.

Schubert, M., Holland, L.Z., Holland, N.D., Jacobs, D.K. (2000). A phylogenetic tree of the *Wnt* genes based on all available full-length sequences, including five from the cephalochordate *Amphioxus*. *Mol. Biol. Evol.* 17, 1896-1903.

Schubiger, G. (1968). Anlageplan, Determinationszustand und Transdeterminationsleistungen der männlichen Vorderbeinscheibe von *Drosophila melanogaster*. *Roux's Archiv* 160, 9-40.

Sedgwick, A. (1887). The development of the Cape species of *Peripatus*. Part III. On the changes from stage A to stage F. *Quart. J. Microscop. Sci.* 27, 467-550 und Tafel 34-37.

Seitz, K.A. (1966). Normale Entwicklung des Arachniden-Embryos *Cupiennius salei* Keyserling und seine Regulationsbefähigung nach Röntgenbestrahlungen. *Zool. Jb. Anat.* 83, 327-447.

Sharov, A.G. (1966). Basic Arthropodan Stock. *Int. Ser. Monogr. Pure Appl. Biol.* 30, 1-273. Pergamon Press, Oxford.

Shen, W., Mardon, G. (1997). Ectopic eye development in *Drosophila* induced by directed *dachshund* expression. *Development* 124, 45-52.

Shilo, B.Z. (2003). Signaling by the *Drosophila* epidermal growth factor receptor pathway during development. *Exp. Cell Res.* 284, 140-149.

Shubin, N., Tabin, C., Carroll, S. (1997). Fossils, genes and the evolution of animal limbs. *Nature* 388, 639-648.

Siegfried E., Perrimon, N. (1994). *Drosophila wingless*: a paradigm for the function and mechanism of *Wnt* signaling. *BioEssays* 16, 395-404.

Simpson, P. (2001). A review of early development of the nervous system in some arthropods: comparison between insects, crustaceans and myriapods. *Ann. Soc. Entomol. Fr. N.S.* 37, 71-84.

Siveter, D.J., Williams, M., Waloszek, D. (2001). A phosphatocopid crustacean with appendages from the lower Cambrian. *Science* 293, 479-481.

Snodgrass, R.E. (1935). Principles of insect morphology. New York and London: McGraw-Hill Book Co., Inc.

- Snodgrass, R. E. (1938). Evolution of the Annelida, Onychophora and Arthropoda. *Smithsonian Misc. Coll.* 97, 1-159.
- Spears, T., Abele, L.G. (1997). Crustacean phylogeny inferred from 18S rDNA. In: *Arthropod Relationships*, Hrsg. R.A. Fortey, R.H. Thomas. Chapman & Hall, London. Pp. 169-187.
- Speicher, S.A., Thomas, U., Hinz, U., Knust, E. (1994). The *Serrate* locus of *Drosophila* and its role in morphogenesis of the wing imaginal discs: control of cell proliferation. *Development* 120, 535-544.
- Stollewerk, A. (2002). Recruitment of cell groups through *Delta/Notch* signalling during spider neurogenesis. *Development* 129, 5339-5348.
- Stollewerk, A., Schoppmeier, M., Damen, W.G.M. (2003). Involvement of *Notch* and *Delta* genes in spider segmentation. *Nature* 423, 863-865.
- Stollewerk, A., Weller, M., Tautz, D. (2001). Neurogenesis in the spider *Cupiennius salei*. *Development* 128, 2673-2688.
- Strausfeld, N.J. (1998). Crustacean-insect relationships: the use of brain characters to derive phylogeny amongst segmented invertebrates. *Brain Behav. Evol.* 52, 186-206.
- Strimmer, K., von Haeseler, A. (1996). Quartet puzzling: a quartet maximum likelihood method for reconstructing tree topologies. *Mol. Biol. Evol.* 13, 964-969.
- Struhl, G., Basler, K. (1993). Organizing activity of Wingless protein in *Drosophila*. *Cell* 72, 527-540.
- Sudarsan, V., Pasalodos-Sanchez, S., Wan, S., Gampel, A., Skaer, H. (2002). A genetic hierarchy establishes mitogenic signalling and mitotic competence in the renal tubules of *Drosophila*. *Development* 129, 935-944.
- Swofford, D.L. (2002). PAUP\*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (\*and Other Methods). Version 4. Sinauer Associates, Sunderland Massachusetts.
- Tautz, D., Pfeifle, C. (1989). A non-radioactive *in situ* hybridization method for the localization of specific RNAs in *Drosophila* embryos reveals translational control of the segmentation gene *hunchback*. *Chromosoma* 98, 81-85.
- Teleman, A.A., Cohen, S.M. (2000). Dpp gradient formation in the *Drosophila* wing imaginal disc. *Cell* 103, 971-980.
- Telford, M.J., Thomas, R.H. (1998). Expression of homeobox genes shows chelicerate arthropods retain their deutocerebral segment. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 10671-10675.
- Thomas, R.H., Telford, M.J. (1999). Appendage development in embryos of the oribatid mite *Archegozetes longisetosus* (Acari, Oribatei, Trhypochthoniidae). *Acta Zool.* 80, 193-200.

Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., Higgins, D.G. (1997). The CLUSTAL\_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 25, 4876-4882.

Tomancak, P., Beaton, A., Weiszmam, R., Kwan, E., Shu, S., Lewis, S.E., Richards, S., Ashburner, M., Hartenstein, V., Celniker, S.E., Rubin, G.M. (2002). Systematic determination of patterns of gene expression during *Drosophila* embryogenesis. *Genome Biology* 3, research0088.1-research0088.14.

Turbeville, J.M., Pfeifer, D.M., Field, K. G., Raff, R.A. (1991). The phylogenetic status of arthropods, as inferred from 18S rRNA Sequences. *Mol. Biol. Evol.* 8, 669-686.

Umesono, Y., Hiromi, Y., Hotta, Y. (2002). Context-dependent utilization of *Notch* activity in *Drosophila* glial determination. *Development* 129, 2391-2399.

Van den Heuvel, M., Nusse, R., Johnston, P., Lawrence, P.A. (1989). Distribution of the *wingless* gene product in *Drosophila* embryos: a protein involved in cell-cell communication. *Cell* 59, 739-749.

Villano, J.L., Katz, F.N. (1995). *four-jointed* is required for intermediate growth in the proximal-distal axis in *Drosophila*. *Development* 121, 2767-2777.

Vogt, T.F., Duboule, D. (1999). Antagonists go out on a limb. *Cell* 99, 563-566.

Walossek, D., Müller, K.J. (1997). Cambrian „Orsten“-type arthropods and the phylogeny of Crustacea. In: *Arthropod Relationships*, Hrsg. R.A. Fortey, R.H. Thomas. Chapman & Hall, London. Pp. 139-153.

Wedeen, C.J., Kostriken, R.G., Leach, D., Whittington, P. (1997). Segmentally iterated expression of an *engrailed*-class gene in the embryo of an Australian onychophoran. *Dev. Genes Evol.* 207, 282-286.

Weigmann, K., Cohen, S.M. (1999). Lineage-tracing cells born in different domains along the PD axis of the developing *Drosophila* leg. *Development* 126, 3823-3830.

Weygold, P. (1979). Significance of later embryonic stages and head development in arthropod phylogeny. In: *Arthropod Phylogeny*, Hrsg. A.P. Gupta. Van Nostrand Reinhold Company, New York. Pp. 107-135.

Wheeler, W.C. (1979). Sampling, groundplans, total evidence and the systematics of arthropods. In: *Arthropod Relationships*, Hrsg. R.A. Fortey, R.H. Thomas. Chapman & Hall, London. Pp. 87-96.

Whittington, P.M. (1996). Evolution of neural development in the arthropods. *Semin. Cell. Dev. Biol.* 7, 605-614.

Whittington, P.M., Bacon, J.P. (1997). The organization and development of the arthropod ventral nerve cord: insights into arthropod relationships. In: *Arthropod Relationships*, Hrsg. R.A. Fortey, R.H. Thomas. Chapman & Hall, London. Pp. 349-367.



- Whittington, H.B. (1978). The lobopod animal *Aysheaia pedunculata* Walcott, Middle Cambrian, Burgess shale, British Columbia. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* 284, 165-197.
- Whittington, H.B. (1981). Rare arthropods from the Burgess shale, Middle Cambrian, British Columbia. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* 292, 329-357.
- Whittington, H.B. (1993). Anatomy of the Ordovician trilobite *Placoparia*. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* 339, 109-118.
- Wigglesworth, V.B. (1973). Evolution of insect wings and flight. *Nature* 246, 127-129.
- Wilder, E.L., Perrimon, N. (1995). Dual functions of *wingless* in the *Drosophila* leg imaginal disc. *Development* 121, 477-488.
- Williams, T., Tjian, R. (1991). Characterization of a dimerization motif in AP-2 and its function in heterologous DNA-binding proteins. *Science* 251, 1067-1071.
- Williams, T. A. (1998). *Distalless* expression in crustaceans and the patterning of branched limbs. *Dev. Genes Evol.* 207, 427-434.
- Williams, T.A., Nulsen, C., Nagy, L.M. (2002). A complex role for *Distal-less* in crustacean appendage development. *Dev. Biol.* 241, 302-312.
- Wilson, V., Conlon, F.L. (2002). The T-box family. *Genome Biol.* 3, reviews3008.
- Wimmer, E. (1991). Molekularbiologische Charakterisierung des *Abnormal leg pattern* Gens von *Drosophila melanogaster*. Diplomarbeit. Ludwig-Maximilians-Universität, München.
- Wolf, H., Harzsch, S. (2002). Evolution of the arthropod neuromuscular system. Arrangement of muscles and innervation in the walking legs of a scorpion: *Vaejovis spinigerus* (Wood, 1863) Vaejovidae, Scorpiones, Arachnida. *Arthrop. Struct. Dev.* 31, 185-202.
- Wolff, C., Schröder, R., Schulz, C., Tautz, D., Klingler M. (1998). Regulation of the *Tribolium* homologues of *caudal* and *hunchback* in *Drosophila*: evidence for maternal gradient systems in a short germ embryo. *Development* 125: 3645-3654.
- Wu, J., Cohen, S.M. (1999). Proximodistal axis formation in the *Drosophila* leg: subdivision into proximal and distal domains by Homothorax and Distal-less. *Development* 126, 109-117.
- Wu, J., Cohen, S.M. (2000). Proximal distal axis formation in the *Drosophila* leg: distinct functions of Teashirt and Homothorax in the proximal leg. *Mech. Dev.* 94, 47-56.
- Xianguang, H., Siveter, D.J., Williams, M., Walossek, D., Bergström, J. (1996). Appendages of the arthropod *Kunmingella* from the early Cambrian of China: its bearing on the systematic position of the Bradoriida and the fossil record of the Ostracoda. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* 351, 1131-1145.

Yamamoto, D.S., Sumitani, M., Tojo, K., Lee, J.M., Hatakeyama, M. (2004). Cloning of a *decapentaplegic* orthologue from the sawfly, *Athalia rosae* (Hymenoptera), and its expression in the embryonic appendages. *Dev. Genes Evol.* 214, 128-133.

Zecca, M., Basler, K., Struhl, G. (1996). Direct and long-range action of a Wingless morphogen gradient. *Cell* 87, 833-844.

Zrzavy, J., Hypsa, V., Vlaskova, M. (1997). Arthropod phylogeny: taxonomic congruence, total evidence and conditional combination approaches to morphological and molecular data sets. In: *Arthropod Relationships*, Hrsg. R.A. Fortey, R.H. Thomas. Chapman & Hall, London. Pp. 97-107.

Zrzavy, J., Stys, P. (1994). Origin of the crustacean schizoramous limb: A re-analysis of the duplosegmentation hypothesis. *J. Evol. Biol.* 7, 743-756.

*Anhänge*

**Anhang 1: Einträge in der GenBank Datenbank**

Dieser Anhang enthält alle vorliegenden GenBank Datenbank-Einträge, soweit sie im Rahmen von Teilpublikationen dieser Dissertation bereits publiziert worden sind. Nicht enthalten sind Datenbank-Einträge die im Rahmen anderer Publikationen veröffentlicht worden sind (siehe dazu die Zugriffsnummern im Kapitel „Material und Methoden“).

*Datenbankeintrag zu homothorax-2 aus Cupiennius salei; Zugriffsnummer AJ518935*

```

LOCUS          CSA518935                1914 bp    mRNA    linear    INV 21-NOV-2003
DEFINITION    Cupiennius salei mRNA for homothorax 2 (hth2 gene).
ACCESSION    AJ518935
VERSION      AJ518935.1  GI:38490425
KEYWORDS     homothorax 2; hth2 gene.
SOURCE       Cupiennius salei
  ORGANISM   Cupiennius salei
              Eukaryota; Metazoa; Arthropoda; Chelicerata; Arachnida; Araneae;
              Araneomorphae; Entelegynae; Lycosoidea; Ctenidae; Cupiennius.
REFERENCE    1
  AUTHORS    Prpic,N.M., Janssen,R., Wigand,B., Klingler,M. and Damen,W.G.
  TITLE      Gene expression in spider appendages reveals reversal of exd/hth
              spatial specificity, altered leg gap gene dynamics, and suggests
              divergent distal morphogen signaling
  JOURNAL    Dev. Biol. 264 (1), 119-140 (2003)
  MEDLINE   22985001
  PUBMED    14623236
REFERENCE    2 (bases 1 to 1914)
  AUTHORS    Damen,W.G.M.
  TITLE      Direct Submission
  JOURNAL    Submitted (25-NOV-2002) Damen W.G.M., University of Cologne,
              Institute for Genetics, Weyertal 121, 50931 Cologne, NRW, GERMANY
FEATURES     Location/Qualifiers
   source     1..1914
              /organism="Cupiennius salei"
              /mol_type="mRNA"
              /db_xref="taxon:6928"
   gene       1..1914
              /gene="hth2"
   CDS        56..1471
              /gene="hth2"
              /codon_start=1
              /product="homothorax 2"
              /protein_id="CAD57729.1"
              /db_xref="GI:38490426"
              /translation="MQYGDGIPHYPPAPPQDGPGLYDAHRHQGIPNHHSVYHPNHVA
              VANHVMGSHPDAAHKRDKDAIFGHPLFPLLALIFEKCELATCTPREPGIAGGDVCSSES
              FNEDITVFAKQVKEKPFYVANQELDSIMVQAIQVLRFHLELEKVVHELCDNFQORYI
              SCLGKMPIDLVIDERDTKPELGDNTNNSNGSSFCCGPPCVSRGLLDTSGGHSTDSAS
              TPDQGHYEDIPVGSMERLGRPPSQSLNYGSVGDVRSPPNGSSGTPCPMSQQPSSQQST
              DNNSEAGDASVCSGDGSGDEDDDDERGGKQRQKRGIFPKVATNIMRAWLFQHLTHPYPS

```

## Anhänge

EEQKKQLAQDTGLTILQVNNWFINARRRIVQPMIDQSNRAGGSIAPGAAYSPESSMGY  
MIDGSSQMHIRSSSLQNLSCPENMAIGHMAGYSQLRSPVHSQAMLLPGHPMMMSHPSL  
PPHSSPYDSSPPSIMDLHSS"

### ORIGIN

```
1  ctcgatcgcc  gtgaaatccc  aacttttggg  ttcagtttta  gcacgtgcgt  tcgatatgca
61  gtaocggcgc  gacggcattc  cgcattatcc  ggcaccccct  caggacggtc  ctgggtcctt
121  gtacgatgcc  cacaggcacc  aggggattcc  caatcatcac  tctgtttacc  atcctaacca
181  tgttgctgtg  gctaaccatg  tcatgggatc  acatcctgac  gctcacaaaa  gagataaaga
241  tgcaatatth  gggcatcctc  tgttcccgct  cctcgccttt  atcttcgaaa  aatgtgaact
301  tgccacctgc  acgccacgtg  aaccggggat  agcagggggg  gatgtgtggt  ctccgaatc
361  tttcaacgaa  gatatacag  tctttgctaa  acaggtaaa  gaagaaaaac  cttttacgt
421  cgcaatcaa  gagcttgata  gcatcatggt  tcaagcaatt  caagtattaa  ggtttcacct
481  ctagaatta  gaaaaggtac  acgaaactgt  cgataattht  tgtcaacggg  acattagctg
541  cttgaaaggg  aaaaatgcaa  tcgacctagt  catcgatgag  agggacacaa  agccggaact
601  gggagatacg  aacaataaca  gcaatggcag  tagtttctgc  gggggacccc  cctgtgtttc
661  cagaggcctg  ctcgacacat  ctgggtggca  tagtacggac  agtgcatcta  cgccagacca
721  gggccactat  gaggatatac  ctgtgggaag  catggagcga  ctggggaggc  caccatccca
781  gtcgctaaat  tatggttccg  tgggtgacga  cgtcagatca  ccgaatggat  cgtcaggaac
841  cccatgtccc  atgtctcagc  agccatcttc  ccaacagagc  accgacaaca  acagcgaggc
901  tggatgatca  agtgtgtggt  cgggtgacgg  ttccgggtgc  gaagacgacg  atgagagggg
961  taaaaagaga  caaaaagaac  cggaattht  cctaaagtt  gccacaaaa  tcatgagggc
1021  cttgctcttc  cagcatctca  cgcaccata  tccatctgaa  gaacagaaaa  agcaacttgc
1081  tcaagatacg  ggtctcacta  ttctacaagt  caacaattgg  ttcataatg  ctaggcggcg
1141  tatcgttcag  ccaatgatag  accagtcaaa  tcgtgcagga  ggttcgatag  cccctggagc
1201  accaagctg  cctgaatcct  ccatgggata  catgatgata  ggttcatctc  aaatgcata
1261  aagatcctca  agcttgcaaa  acttgcttg  tcctgaaaat  atggcaattg  gccatagggc
1321  aggatactcc  cagctgcgat  ctctgttca  ctctcaagca  atgttactcc  caggtcacc
1381  tatgatgatg  tcacatccat  cattaccacc  acctcatagt  tccccatag  atagctcacc
1441  accaagatt  atggatcttc  actcaagcta  attagtagaa  agtgtatata  tttaggttat
1501  ttgtaattct  agacattgga  gctatttact  tcactataaa  agtattgagc  gacttagcaa
1561  gaagtcatgt  aaaatattga  tgtagaatth  aatacaagtt  taaacaaaga  tcaactthtt
1621  cacagtgata  tgaacaatta  ctgcaaatth  tthtttaaat  gtttgthttg  tgtgacaagg
1681  actagaaaat  atthtata  gacttgctca  aaaatataca  aacttctatc  ctgtgttca
1741  caaataatta  aacaatttat  aggcattth  atthtttaga  cattgattgc  thttcattth
1801  aaaagaaatt  thtttcaatt  ttaaccaatg  agtatttgta  caaaacccat  aatgaatcca
1861  attaaagaaa  gaatthttct  ctaaaaaaaa  aaaaaaaaaa  aaaaaaaaaa  aaaa
```

//

## Datenbankeintrag zu *decapentaplegic* aus *Cupiennius salei*; Zugriffsnummer AJ518936

LOCUS CSA518936 1132 bp mRNA linear INV 21-NOV-2003  
DEFINITION Cupiennius salei partial mRNA for decapentaplegic (dpp gene).  
ACCESSION AJ518936  
VERSION AJ518936.1 GI:38490427  
KEYWORDS decapentaplegic; dpp gene.  
SOURCE Cupiennius salei  
ORGANISM Cupiennius salei  
Eukaryota; Metazoa; Arthropoda; Chelicerata; Arachnida; Araneae;  
Araneomorphae; Entelegynae; Lycosoidea; Ctenidae; Cupiennius.  
REFERENCE 1  
AUTHORS Prpic,N.M., Janssen,R., Wigand,B., Klingler,M. and Damen,W.G.  
TITLE Gene expression in spider appendages reveals reversal of exd/hth  
spatial specificity, altered leg gap gene dynamics, and suggests  
divergent distal morphogen signaling  
JOURNAL Dev. Biol. 264 (1), 119-140 (2003)  
MEDLINE 22985001  
PUBMED 14623236  
REFERENCE 2 (bases 1 to 1132)  
AUTHORS Damen,W.G.M.  
TITLE Direct Submission  
JOURNAL Submitted (25-NOV-2002) Damen W.G.M., University of Cologne,  
Institute for Genetics, Weyertal 121, 50931 Cologne, NRW, GERMANY  
FEATURES Location/Qualifiers  
source 1..1132  
/organism="Cupiennius salei"  
/mol\_type="mRNA"  
/db\_xref="taxon:6928"  
gene 1..1132  
/gene="dpp"  
CDS <1..673  
/gene="dpp"  
/codon\_start=2  
/product="decapentaplegic"

```

/protein_id="CAD57730.1"
/db_xref="GI:38490428"
/translation="DIVRPASKISDSILRQLDVRIMQGSSSGSWETFDVLPVRRWLQ
DPSQNFGLFIQLASSLNRAEPOSVRLIRNAEEGQFQWSEHEPMLIIYSRDPNAKSASV
LSRTRKSTRKRRRGRDRNCRRHALYVDFYDVGWDDWILAPPGYDAYFCHGDCPPFLP
DHLNATNHAIVQTLVNSANPAAVPRACCPVSEMSAISILHRDQNDMVVLSVYRDMVVE
CGCR"

ORIGIN
  1  tgacattggt  cgacctgctg  ccaaaatata  tgattccatc  ctcaggcagt  tagatgtgag
  61  aataatgcaa  ggctcgagct  cggctcgtg  gaaaccttc  gatgtgcttc  cagctgtcag
 121  acgatggctc  caagatccat  ccaaaaactt  tggactatcc  atccagttgg  cgagttcact
 181  gaatcgcgcc  gagccacaaa  gtgttcgact  aattaggaat  gcggaagaag  gccagtttca
 241  atggtcagag  catgaaccta  tgttgatcat  ttattctaga  gaccccaatg  caaaaatctg
 301  atcggtttta  tcaaggacta  aacgcagcac  gcgaaagcac  agacggaag  gccgcagaga
 361  caactgcaga  cgacatgctc  tgtacgtgga  cttttacgat  gtgggctggg  acgattggat
 421  cctcgcccca  cccggatacg  atgcctatct  ctgtcacggg  gactgccctt  tccccctgcc
 481  agaccatcta  aatgctacta  atcatgccat  tgtgcagact  ctggtcaatt  ctgcaaatcc
 541  agccgcccgt  ccacgtgctt  gctgcgttcc  ttcagagatg  tcggccatat  caatccttca
 601  cagggatcag  aatgacatgg  ttgtcctctc  tgtttataga  gacatggtcg  tggagggttg
 661  cggatgccgc  tgaagtgtgt  ggtttctttt  taaagtatgt  attctgcttc  gttgcccttt
 721  acagtgcata  tgcaaagagg  ctatcgatca  tttcactctg  tcggtgatgt  aaagatatcg
 781  ttattgagga  gacattggtc  cacgtcgaga  gcgtccgatg  aatttctaag  agcttcagtg
 841  aatcgtctct  cgttggtgct  tgaacagcat  tattatcttt  ctgttacta  gatatcacgt
 901  ttcctcatga  atgcctttca  gtcggcgtgt  aaacctatga  tgttcccacg  aaatgggtcc
 961  gatcgggaata  tgtaagcaca  agaacttcaa  tttgtatgt  tcgctatca  gaaacgcag
1021  catgccaaact  ctgctaaatg  caattctgtt  ttaatcattc  ttgattacta  atcatgtttc
1081  gcaacattca  acaagatttt  tactaaaaac  cgaaaaaaaa  aaaaaaaaaa  aa
//

```

*Datenbankeintrag zu optomotor-blind aus Cupiennius salei; Zugriffsnummer AJ518937*

```

LOCUS      CSA518937          444 bp    mRNA    linear    INV 21-NOV-2003
DEFINITION Cupiennius salei partial mRNA for optomotor blind (omb gene).
ACCESSION  AJ518937
VERSION    AJ518937.1  GI:38490429
KEYWORDS   omb gene; optomotor blind.
SOURCE     Cupiennius salei
ORGANISM   Cupiennius salei
            Eukaryota; Metazoa; Arthropoda; Chelicerata; Arachnida; Araneae;
            Araneomorphae; Entelegynae; Lycosoidea; Ctenidae; Cupiennius.

REFERENCE  1
AUTHORS    Prpic,N.M., Janssen,R., Wigand,B., Klingler,M. and Damen,W.G.
TITLE      Gene expression in spider appendages reveals reversal of exd/hth
            spatial specificity, altered leg gap gene dynamics, and suggests
            divergent distal morphogen signaling
JOURNAL    Dev. Biol. 264 (1), 119-140 (2003)
MEDLINE    22985001
PUBMED     14623236
REFERENCE  2 (bases 1 to 444)
AUTHORS    Damen,W.G.M.
TITLE      Direct Submission
JOURNAL    Submitted (25-NOV-2002) Damen W.G.M., University of Cologne,
            Institute for Genetics, Weyertal 121, 50931 Cologne, NRW, GERMANY

FEATURES   Location/Qualifiers
            source          1..444
                        /organism="Cupiennius salei"
                        /mol_type="mRNA"
                        /db_xref="taxon:6928"
            gene            1..444
                        /gene="omb"
            CDS              <1..>444
                        /gene="omb"
                        /codon_start=1
                        /product="optomotor blind"
                        /protein_id="CAD57731.1"
                        /db_xref="GI:38490430"
                        /translation="SGRRMFPAPFKVRVSGLDKAKYILLMDIVAADDCRYKFHNSRWV
                        VAGKADPEMPKRMVYIHPDSPSTGEQWMOQVVVFSFKLKLTTNNISDKHGFVTQTILNSMH
                        KYQPRFHLVRANDILKLPYSTFRTYVFKETEFMAVTAYQNEKITQL"

ORIGIN
  1  tctggaaggc  gcatgttccc  tgccttcaaa  gtcggggtaa  gcggtctgga  caagaaagcc
  61  aaatacatcc  tcttgatgga  cattgtagcg  gcagacgact  gccggtataa  gttccataac
 121  agtcggtggg  tagtggcggg  caaagcagac  cctgagatgc  caaaagaat  gtacatccac

```

## Anhänge

```
181 cggactctc cttccactgg cgaacaatgg atgcagaaag tggctcctt ccacaagtta
241 aagctcacca acaacatttc ggacaagcac ggattcgtga cgcagacgat cctgaactcg
301 atgcacaagt accagccgcg gttccacctg gtgcgggcca acgacatcct caagctacct
361 tactccacct tcaggacctc cgtcttcaag gagacggagt tcatggccgt taccgacctc
421 cagaacgaga aatcacaca gttg
```

//

### Datenbankeintrag zu H15-1 aus *Cupiennius salei*; Zugriffsnummer AJ518938

```
LOCUS          CSA518938          459 bp    mRNA    linear    INV 21-NOV-2003
DEFINITION    Cupiennius salei partial mRNA for T-box protein H15 (h15-1 gene).
ACCESSION     AJ518938
VERSION       AJ518938.1  GI:38490431
KEYWORDS      h15-1 gene; T-box protein H15.
SOURCE        Cupiennius salei
ORGANISM      Cupiennius salei
               Eukaryota; Metazoa; Arthropoda; Chelicerata; Arachnida; Araneae;
               Araneomorphae; Entelegynae; Lycosoidea; Ctenidae; Cupiennius.
REFERENCE     1
AUTHORS       Prpic,N.M., Janssen,R., Wigand,B., Klingler,M. and Damen,W.G.
TITLE         Gene expression in spider appendages reveals reversal of exd/hth
               spatial specificity, altered leg gap gene dynamics, and suggests
               divergent distal morphogen signaling
JOURNAL       Dev. Biol. 264 (1), 119-140 (2003)
MEDLINE       22985001
PUBMED        14623236
REFERENCE     2 (bases 1 to 459)
AUTHORS       Damen,W.G.M.
TITLE         Direct Submission
JOURNAL       Submitted (25-NOV-2002) Damen W.G.M., University of Cologne,
               Institute for Genetics, Weyertal 121, 50931 Cologne, NRW, GERMANY
FEATURES      Location/Qualifiers
   source      1..459
               /organism="Cupiennius salei"
               /mol_type="mRNA"
               /db_xref="taxon:6928"
   gene        1..459
               /gene="h15-1"
   CDS         <1..>459
               /gene="h15-1"
               /codon_start=1
               /product="T-box protein H15"
               /protein_id="CAD57732.1"
               /db_xref="GI:38490432"
               /translation="TGRRMFPPTVRVSFSGAELHTKYAVYMDIVPVDNKRYYAYHRSS
               WLTVAGKADPPSPSRLYLHPDSPFTGEQLKKQVVSFEKVKLTTNEMDKQGHIVLNSMHR
               YQPRIHLVRKSGSATLTSPAELENEEFRTYIFPETVFTAHTAYQNQLITKL"
ORIGIN
   1 acggaagga gaatgtttcc cactgttcga gtgagtttct ccggtgcaga acttcatacc
   61 aaatgatctg tatatatgga cattgtacca gtggacaata aaaggtatag gtacgcttat
  121 catcgtctt cttggttggg tctgtgtaaa gcagatccac cgtcaccgtc aagattgtac
  181 cttcatccag atttccctt caccggagaa cagctgaaga agcaagttgt ctctttcgaa
  241 aaagtcaaac tcaccaacaa cgaaatggac aagcaagggc atattgtcct gaactccatg
  301 cataggtatc aacctcgcat tcatttggtg aggaaatcgg gtagtgcaac acttacgtct
  361 cgggctgagc tggaaaacga agaattccgg acttatatat tccctgaaac tgttttcact
  421 gctgttacgg cgtatcagaa tcaactgata acaaagctc
```

//

### Datenbankeintrag zu H15-2 aus *Cupiennius salei*; Zugriffsnummer AJ518939

```
LOCUS          CSA518939          462 bp    mRNA    linear    INV 21-NOV-2003
DEFINITION    Cupiennius salei partial mRNA for T-box protein H15 (h15-2 gene).
ACCESSION     AJ518939
VERSION       AJ518939.1  GI:38490433
KEYWORDS      h15-2 gene; T-box protein H15.
SOURCE        Cupiennius salei
```

## Anhänge

ORGANISM Cupiennius salei  
Eukaryota; Metazoa; Arthropoda; Chelicerata; Arachnida; Araneae;  
Araneomorphae; Entelegynae; Lycosoidea; Ctenidae; Cupiennius.

REFERENCE 1  
AUTHORS Prpic,N.M., Janssen,R., Wigand,B., Klingler,M. and Damen,W.G.  
TITLE Gene expression in spider appendages reveals reversal of exd/hth  
spatial specificity, altered leg gap gene dynamics, and suggests  
divergent distal morphogen signaling  
JOURNAL Dev. Biol. 264 (1), 119-140 (2003)  
MEDLINE 22985001  
PUBMED 14623236

REFERENCE 2 (bases 1 to 462)  
AUTHORS Damen,W.G.M.  
TITLE Direct Submission  
JOURNAL Submitted (25-NOV-2002) Damen W.G.M., University of Cologne,  
Institute for Genetics, Weyertal 121, 50931 Cologne, NRW, GERMANY

FEATURES Location/Qualifiers  
source 1..462  
/organism="Cupiennius salei"  
/mol\_type="mRNA"  
/db\_xref="taxon:6928"  
gene 1..462  
/gene="h15-2"  
CDS <1..>462  
/gene="h15-2"  
/codon\_start=1  
/product="T-box protein H15"  
/protein\_id="CAD57733.1"  
/db\_xref="GI:38490434"  
/translation="TGRRMFPTVRVVSFGADPHIKYAVLMDIVPVDNKRYRYAYHRSS  
WLVAGKADPPSPRLYLHPDSPFTGDQLKKQVVSFEKVKLTNNEMDKQGHIVLNSMHK  
YQPRIHLVCLKPNCQGTPTITNIESEQFRTSVFPETVFTAVTAYQQLITKL"

ORIGIN  
1 acagggagc ggatgtttcc gacagtaaga gtatcgttct ctggcgctga ccctcacatt  
61 aagtatgcag ttctcatgga cattgtacca gtagacaata agcgttacag gtacgccttac  
121 caccggtcat catggctagt ggcggcaaa gcggatcctc cttctccatc gagactttat  
181 ctgcaccctg actcaccttt caccggagat cagctgaaga aacaagtggg ctcgttcgaa  
241 aaagtgaagc tcacgaaca tgagatggac aagcagggtc atatcgtgtt aaactcgatg  
301 cacaagtatc agccaagaat acatctcgtg aaactgaaac ctaactgcca aggaacaccg  
361 actatcacga atatcgaatc agaacaatt cgaacgtccg tttttcccga aacagtattt  
421 acggccgtaa cagcatatca gaaccaactg ataacaagc ta

//

### Datenbankeintrag zu *extradenticle* aus *Tribolium castaneum*; Zugriffsnummer AJ518940

LOCUS TCA518940 1422 bp mRNA linear INV 21-NOV-2003  
DEFINITION *Tribolium castaneum* mRNA for *extradenticle* (exd gene).  
ACCESSION AJ518940  
VERSION AJ518940.1 GI:38490514  
KEYWORDS exd gene; *extradenticle*.  
SOURCE *Tribolium castaneum* (red flour beetle)  
ORGANISM *Tribolium castaneum*  
Eukaryota; Metazoa; Arthropoda; Hexapoda; Insecta; Pterygota;  
Neoptera; Endopterygota; Coleoptera; Polyphaga; Cucujiformia;  
Tenebrionidae; *Tribolium*.

REFERENCE 1  
AUTHORS Prpic,N.M., Janssen,R., Wigand,B., Klingler,M. and Damen,W.G.  
TITLE Gene expression in spider appendages reveals reversal of exd/hth  
spatial specificity, altered leg gap gene dynamics, and suggests  
divergent distal morphogen signaling  
JOURNAL Dev. Biol. 264 (1), 119-140 (2003)  
MEDLINE 22985001  
PUBMED 14623236

REFERENCE 2 (bases 1 to 1422)  
AUTHORS Damen,W.G.M.  
TITLE Direct Submission  
JOURNAL Submitted (25-NOV-2002) Damen W.G.M., University of Cologne,  
Institute for Genetics, Weyertal 121, 50931 Cologne, NRW, GERMANY

FEATURES Location/Qualifiers  
source 1..1422  
/organism="Tribolium castaneum"  
/mol\_type="mRNA"  
/db\_xref="taxon:7070"

## Anhänge

```
gene          1..1422
              /gene="exd"
CDS           5..1090
              /gene="exd"
              /codon_start=1
              /product="extradenticle"
              /protein_id="CAD57734.1"
              /db_xref="GI:38490515"
              /translation="MDDPGRMMGHTGGGLMPPQPYMNAQDAPAGGENEPRKQDIGEIL
QQIMNITDQSLDEAQAARKHTLNCHRMKPALFVSLCEIKEKTVLSLRNTQEPPDPQL
MRLDNMLIAEGVAGPEKGGGAGAAASGSAAAQAGQPDNAIEHSDYRAKLAQIRQIYHQ
ELEKYEQACNEFTTHVMNLLREQSRTRPITPKIEIRMVQIIHKKFSSIQMLKQSTCE
AVMILRSRFLDARRKRRNFSKQASEILNEYFYSHLSNPYPSEEAKEELARKCGITVSQ
VSNWFGNKIRIRYKKNIGKAQEEANLYAAKKAAGASPYSGTPTPMMSAPPQDSMGYSM
GSAYDQSSAYDASSCGYDPMHAQELSP"
ORIGIN
  1 ccccatggac gaccccgcca gaatgatggg ccacaccggc ggcggcctga tgccccctca
  61 gccgtacatg aacgcccagg acgcgcccgc gggcgcgag aacgagcccc gcaagcagga
 121 catcggtgag atcctccagc agatcatgaa catcaccgac cagagcctcg acgaggccca
 181 agcgcgcaaa cacaccctca actgccaccg catgaagccg gccctgttct ccgtgctgtg
 241 cgaaatcaag gagaagacgg tgctcagcct gcggaacacg caggaggagg agccccccga
 301 cccccagctg atgcbggctcg acaacatgct gatcgccgag ggggtggcgg gccccgagaa
 361 gggcgggcgc gcgggggccc ctgcctcggg ctccgcccgc gcccaggccc gccagcccga
 421 caacgccatc gagcacagcg actacagggc caaactcgcc caaatccgcc aaatctacca
 481 ccaagaactg gaaaagtacg aacagcgtg caatgagttc accacacacg ttatgaactt
 541 gctgcbggag cagtcccgga ctgcgccaat caccgccgag gaaatcgagc ggtatggtgca
 601 aatcatacac aagaaattct cctcgattca gatgcagctg aaacagtcga cttgcgaggc
 661 tgttatgatc ctcagatcgc ggtttttgga cgccagaagg aaacgccgga atttcagcaa
 721 gcagcgctcg gaaattctaa acgagtattt ttactcgcac ttgtctaata cctaccaccg
 781 tgaggaggcg aaggaagagt tggctaggaa atgcbggatc acagtgagcc aggtgtcgaa
 841 ctggttcgga aacaaacgaa tcaggtacaa gaagaacatc ggggaaggcg aggaagaggc
 901 caattttgat gcggcgcaaga aggcggcagg ggcgtcgccc tatagcggca ccccagcccc
 961 catgatgtcc ccagcgcccc cgcaggactc catgggctac tccatggggt cggcctacga
1021 ccagagctca gcctatgacg ccagtagctg tggttacgac ccaatgcacg cacaggaact
1081 gtcgccctaa tcaaacccta gcttaatttt aaggaataac agttgtatac taaccatgt
1141 ataccgaatt ttgtatcgtg tacagtgtgt ttctgggttc aattgcttca agttttattt
1201 ttctgatagt ataggacgta cttgcaatat atttttaggt tgattggttt aggagttaag
1261 gcgaattttt cttcagtatt ttttgatat ttatctattt ttatcgataa ggagcagctg
1321 ggtgagagaa ctttgcttta acgcccaggt ttttccatcg aaaaatgaaat tacagtgctt
1381 actattttaa taaataactg tagtaacaaa aaaaaaaaaa aa
//
```

## Datenbankeintrag zu *homothorax* aus *Tribolium castaneum*; Zugriffsnummer AJ518941

```
LOCUS       TCA518941                3741 bp    mRNA    linear   INV 21-NOV-2003
DEFINITION  Tribolium castaneum mRNA for homothorax (hth gene).
ACCESSION  AJ518941
VERSION    AJ518941.1  GI:38490516
KEYWORDS   homothorax; hth gene.
SOURCE     Tribolium castaneum (red flour beetle)
  ORGANISM Tribolium castaneum
            Eukaryota; Metazoa; Arthropoda; Hexapoda; Insecta; Pterygota;
            Neoptera; Endopterygota; Coleoptera; Polyphaga; Cucujiformia;
            Tenebrionidae; Tribolium.
REFERENCE  1
  AUTHORS  Prpic,N.M., Janssen,R., Wigand,B., Klingler,M. and Damen,W.G.
  TITLE    Gene expression in spider appendages reveals reversal of exd/hth
            spatial specificity, altered leg gap gene dynamics, and suggests
            divergent distal morphogen signaling
  JOURNAL  Dev. Biol. 264 (1), 119-140 (2003)
  MEDLINE  22985001
  PUBMED  14623236
REFERENCE  2 (bases 1 to 3741)
  AUTHORS  Damen,W.G.M.
  TITLE    Direct Submission
  JOURNAL  Submitted (25-NOV-2002) Damen W.G.M., University of Cologne,
            Institute for Genetics, Weyertal 121, 50931 Cologne, NRW, GERMANY
FEATURES   Location/Qualifiers
            source          1..3741
                        /organism="Tribolium castaneum"
                        /mol_type="mRNA"
                        /db_xref="taxon:7070"
            gene           1..3741
```



# Anhänge

```

CDS
    /gene="hth"
    304..1674
    /gene="hth"
    /codon_start=1
    /product="homothorax"
    /protein_id="CAD57735.1"
    /db_xref="GI:38490517"
    /translation="MDVLQKNYDDGIHPGYMDGGAGAGLYEPHVAHRPGLQGLHHSPLH
LNHAMHPYHANHVNPTANHVMMGGAVPDVGRDKDAIYGHPLFPLLALIFEKCELATCT
PREPGVAGDVCSSSEFNEDI AVFSKQIRQEKPYIADPEVDSLWQAIQVLRFHLLLE
LEKVHELCDNFCHRYISCLKGKMPIDLVIDERDGGKPELTGSTNGDGGARSNADSTS
HTDGASTPDVRRPPSSLSYGGPVNDVRSPTPGPLSQAPASQQSLDASDPDAMGKWC
PREWSSPPDARAASDAARRGVLYSSVFLGSPGDASNASIGSGEGTVEEDDDTNGKKN
QKKRGIFPKVATNILLRAWLFOHLTHPYPSEDQKKQLAQDTGLTILQVNWFI NARRRI
VQPMIDQSNRAVFS PHAGPSGAYSPDGMTGYMMDGQMMHRPPGDPAFHNQYAHYPAE
YYGHHL"

ORIGIN
  1 cgactgcgga ccgcgcagga tctccgcagc cgcttcggac acggcagctc ggcgccaccat
 61 caccaccgag agatctgaga ccccatccac cgaccccatg cccgaggggg cccccagcac
121 ctgctcgcac cggcccagtg tacacgacag tgcagtgaac cgcagtgagt gtgataaaaag
181 tgcgcgcgca gagtgactct gacgggtgcta cggtgcgacc acccgggtgca gttcatggct
241 cagccacggy tgtaaaaaat tctttttgac cgatttttaa agaatagtgc gaaacgattc
301 gacatggatg tgctcaaaa aaattatgac gacggcatcc accctgggta catggacggc
361 ggcgcggggg cgggtttgta cgaacccac gtggcgaca ggcgggggtt gcaaggactt
421 caccattcac cccacctgaa ccatgacctg catccgtacc atgcgaacca tgtcaacca
481 accgccaacc acgtcatggg tggagcggtg ccggacgtcg gcaaaaagga caaggacgcc
541 atctacggtc acccgctgtt tccctgtctg gctctcattt tcgaaaagtg cgagtggca
601 acgtgtaccc ctcgagagcc tggagtggcg ggaggagacg tctgctcctc ggagtcgttc
661 aacgaagaca tagcgtttt tagcgtttt ctcaaacag atccgacaag aaaagcccta tcatataga
721 gatcccgagg tagattcatt aatggtccag gctattcaag tacttcggtt tcacctttta
781 gaattggaag agtccatga gttgtgtgat aatttctgcc atcggatata cagttgtctg
841 aaaggcaaaa tgcccatcga cttgggtgata gacgagaggg acggaggcaa gccgcccgaa
901 ttgacgggat cgacgaatg agatggtggt gctaggagta acgcgattc gacatacac
961 acggcagggg cgagtacgcc ggatgtcagg ccgccgtcgt cgtcgttacc gtacggaggc
1021 ccggtgaatg acgacgtgag gtcgcccgga acacctggac ctctatctca agcacccgca
1081 tcccagcaaa gtctcgacgc ctccgatcca gacgccatgg gcaaatggg tccgagggca
1141 gaatggctcg cgctccaga cgctcggcg gccagcgacg ctgcccgaag aggcgtcctt
1201 tactcctccg tctcctcgg aagtcctggt gatgccagta atgccagcat cgggagcggg
1261 gagggaacag gcgaggaaga tgacgacacg aacgggaaga agaatacaaaa aaagagaggc
1321 acttccctca agtccgccac caacatactc agagcgtggc tgtccaaca cctaaccgat
1381 ccttatccct cggaaagaca aaaaaagcag ttggcgcaag atacgggtt aacgatacta
1441 caagtcaaca actggttcat taatgccagg cggagaatag ttaacctat gatcgaccag
1501 tccgaatagag cagtgttttc tccgcacgca gggcctagcg gagcgtacag tccagacggt
1561 accatgggct acatgatgga cggccagcag atgatgcac gcccgcctg agatccaagc
1621 ttccacaacc agtacgcgca ctatcccgca gactactacg gacaccacct gtgagatccc
1681 ccctcgcttg tgacaacgac aatggacata taatatgcg actcttaaat gtgattatc
1741 tctgtacaaa gtgtaaagt agtgccccag tgtttagtta acgggaagga cttgtacaaa
1801 agtattagac tactcgtgtg ctgactgctg tacatagata gtggtaggtg cgggcccagc
1861 cgggagcggg gccccgaccg cgggtgatac tgaagggaca gccgcaaccg tgtaaagtga
1921 tgtgtctctg tagcttaggt tcctcgatgt gttaccttac aataaccctc tcctagtccc
1981 catccagctc agaaacgatc agcccgatcc tcctcctctt cttcactctg tccgccgtca
2041 cgtttcttaa aaaaaaatct tcaaaaagta cgacgcgtac aaaaaataa tccaagttg
2101 tgctgttgta aattactagt tgttatatct gttgtgattt ttttgctatt tgaggaaaaa
2161 accggaactc tccttgtccc gatgatgata tacgatacga tatacgtaac tactgaacct
2221 agagaacaaa tcgctgtgga ggtggcccag cggaccctt cgccctacga ctagaataa
2281 aatatcaata cacaaagtata cagaatgtcg caaagtcact cagggtgtcc atggtgata
2341 cctaaattat tatcgtacca ctgttatagt taattcaaga caccacgcat ccagatcgca
2401 gtttcggttc atttgtacca ctctgatgat tttgtttagt tacttgccag ggacaaaacg
2461 aggactggcc ggctgattcc ggaatgtccg cacaagcctt gctgtgttat tgttatggt
2521 gttttgtaaa aaagaaacgg ctttcagaa gaaccgctca gtcgtcccgt attaaagttt
2581 agcgacaagc cgaatttca tttcgatgat tctaaattaa accgctcagc cttgtcctgg
2641 actagttttg tgcctgtgca agtccctcga ggcgcccgc cccaatacac gacgtatagc
2701 actttagtga tgttataggt tattattata tgaattatg gcgtacacaa tggcggcgac
2761 gaggcggagt tgcacggctc acactcacct attgtttgaa acttgtgtgt attctcgtt
2821 acctttgta ggtcagggc gggggtcaca agtatactga tttttacact ccgatttata
2881 gttttgatc tgatgtactc tcgagtgcgt gtacatatt taatgcccg gccgacacga
2941 tacgattccc tctgcccag gccagtcgt tttttgtaca tacaattacc tccgatgaga
3001 atgttgctg ttcgttttaa gtgatttcca tcatgaatca ttattcgcct tatccaatgt
3061 atacgaaaaa actaaaatca atacagatca atgagagaat atcgtacctc tgtgttatgt
3121 atgagaggaa actttattgt gttctgcttt ttaatgaaag tatatattaa tattataaac
3181 gattatggga cgagataact ctaaacatct ttggtaacgc cgtgtcctct gtatagttt
3241 tttttgaaac gtgagcatta aatgctacat cttgtgtact tatataaaat gtgtttttaa
3301 tactaccgaa ccactatccc tcctgttca gttttaataa taatagtaca aattctagtt
3361 ttactgtagt gctatatgtg actgtcctct ccttcccgcc tccgtcacac gatcccga
3421 tgtacagcag tgcgtagcac aaaaagggaa acaatcccta aaatccacg ccgcaaaagc
3481 gccagatccg gcacctattg tttcctttt ttgttatgca cattcattc aaaattctc
3541 tttctttcat cttaaattta gtttctcca attgtcacg atcgcattat tttcgtata
3601 tgctgcaaga tgggacggtt aacttttctg tactgtgatt gaattattgt taattaaagt
3661 caatttatgt tcatgtaaat aaacaattat ttcaatttc aataactaata aacaaacaaa

```

## Anhänge

3721 agtaaaaaaa aaaaaaaaaa a  
//

### Datenbankeintrag zu dachshund aus *Cupiennius salei*; Zugriffsnummer AJ518942

LOCUS CSA518942 2166 bp mRNA linear INV 21-NOV-2003  
DEFINITION Cupiennius salei partial mRNA for dachshund (dac gene).  
ACCESSION AJ518942  
VERSION AJ518942.1 GI:38490435  
KEYWORDS dac gene; dachshund.  
SOURCE Cupiennius salei  
ORGANISM Cupiennius salei  
Eukaryota; Metazoa; Arthropoda; Chelicerata; Arachnida; Araneae;  
Araneomorphae; Entelegynae; Lycosoidea; Ctenidae; Cupiennius.  
REFERENCE 1  
AUTHORS Prpic,N.M., Janssen,R., Wigand,B., Klingler,M. and Damen,W.G.  
TITLE Gene expression in spider appendages reveals reversal of exd/hth  
spatial specificity, altered leg gap gene dynamics, and suggests  
divergent distal morphogen signaling  
JOURNAL Dev. Biol. 264 (1), 119-140 (2003)  
MEDLINE 22985001  
PUBMED 14623236  
REFERENCE 2 (bases 1 to 2166)  
AUTHORS Damen,W.G.M.  
TITLE Direct Submission  
JOURNAL Submitted (25-NOV-2002) Damen W.G.M., University of Cologne,  
Institute for Genetics, Weyertal 121, 50931 Cologne, NRW, GERMANY  
FEATURES Location/Qualifiers  
source 1..2166  
/organism="Cupiennius salei"  
/mol\_type="mRNA"  
/db\_xref="taxon:6928"  
gene 1..2166  
/gene="dac"  
CDS <1..1694  
/gene="dac"  
/codon\_start=3  
/product="dachshund"  
/protein\_id="CAD57736.1"  
/db\_xref="GI:38490436"  
/translation="RLERPMLPVSPPLTTDATANDCRLIDYRGAKVA AFLVNGDYLL  
CLPQAFELFLKHLVGGVLTHTVYTKLKRDLITPIVCNVEQVRI LRGLGAIQPGVNRCKLL  
SCKDFD TLYKDC TTAGSCCRPGRPPKRAMVGINHNGATG HGM L LKPRMDGEYPGYE  
NGHIAGDRVDKSHLLANGYSHHVAAAQAAVATHLNPLPFMALNHAAAAAAHHNSMLT  
GALPLAATGAHTPGGALNTSTSTHLSASTPARGPESSSVIKERTSHGNDVINSTR L  
RDERVDLVDSKERLYGFDSHRMKDQAF LNGYFWLLAGGSANGHSPVNLNSQHSSRPSN  
SSGSNNLNPNPTTNGPGGPNSEHSGSENAYNVEGEDDVNDSEDDDDDDREEDLSDN  
PDVSSANTDRILTSSQQQLAYPAMGDMGPLPGQTASSIETLLRNIQGLLKVADNAR  
HQERQISLEKAE LKME LLREREREVREGIEKQLLDEQRTRILYQKRLKKEKRSRRRQVQEQ  
LEAEVKKRAQYEEALRSNSQETLRLLLNESLAQELERERNARA EAEHKMQDCPMSV"

ORIGIN  
1 cccggctcga ggcgccatg ctgccggtg caccgcccgg cctcacgacg gacgcgacgg  
61 ccaacgactg cgggctgac gactaccggg gcgccaaagt ggccgctttc ttggtcaacg  
121 gggactacct gctgtgcctg ccgcaaggctt tcgagctctt cctcaagcac ctcgtgggag  
181 gactccacac cgtctacacc aagctcaagc ggctcgacat caccocgacg gttgtgcaacg  
241 tggaacaggt gcgcatcctc aggggacctc gggccataca gcccggtgtc aaccggtgca  
301 agctgctctc ctgcaaggac ttcgacaccc tctacaaaga ctgcaccacg gcaagtgggt  
361 gttgtaggcc cgggcggcca ccgaaacgag caacgatggt gggatcaac cataacgggg  
421 ccacaggcca cgggatgctc ctaaaaaagc ccagaatgga tggagaatat cccggttacg  
481 aaaacggaca tatcgcaggt gaccgctggg acaagtcgca tctgctggcc aacggctaca  
541 gccaccacgt ggcagcggcg caggcagccg tcgccaccca cctcaacccc ttgcttttca  
601 tggctctcaa ccatgcccg ggcgacggcg cagcacacca caactccatg ctaacagggg  
661 cgctgccctc cgcggccacg ggggcacaca cgcccggggg cgccctcaac acatccacat  
721 catccactca cctcacctct cgcgtcgacg ccgcaagggg gccagagtcg tcttcgggtca  
781 tcaaaagaa gacatcgac gggaatgacg tcatcaactc gacgaggtta cgagatgaac  
841 cggttgacct tgtagattct aaagaacggt tatatggttt tgatagtcac cgcgatgaaag  
901 accaagcctt tttgaatggc tacttctggc ttcttgacg gggatcggct aacggccaca  
961 gtcccgtcct taacttgagc cagcactcca gccgaccctc caacagcagt ggcagcaaca  
1021 acaacctcaa caacaacccc accaccaacg gaccggaggg acccaacagt ggtgagcaca  
1081 gcggcagcga gaatgcctac aacgtcgaag gcgaagacga cgtcaacag agtgaagacg  
1141 acgacgatga cgacaggaa gaagacctca gtgataatcc cgatgtgagt agtacagcaa  
1201 acacagacag gctaacttcc agtcagcaac agttagcgta ccctgccatg atgggtgaca  
1261 tgggtcctct gccgggtcaa acagcttctc ccatagaaac actcctcaga aatattcagg

## Anhänge

```
1321 gccttctaaa agtcgcccga gataatgcga ggcaccaaga aaggcagata agccttgaaa
1381 aagccgaact caagatggaa ctctcccgag aaagggaggt acgagaaggt atcgaaaagc
1441 agctcttgga cgagcagaga acgagaatat tgtatcagaa gcgcctgaag aaagaaaaac
1501 gaagcagacg gaggtataca gaacagctgg aagctgaagt caaaaaaagg gcacaatagc
1561 aagaagctct caggagcaac tctcaggaga ccctcaggct cctcaacgaa tccctcgctc
1621 aagagctgga aaggagagag aacgcccggg cagaagcggg acacaaaatg caagactgcc
1681 ccatgtctgt gtaaatgctg ttaacatcgg tgagctaagg aatcatcacc ctctctatcg
1741 acagctgccg ataccagtgc catctagggg acatgaaaaa aacaaacgga acaaacgaaa
1801 aaaactgaag catatcagtc gggactcttc acggcctgtt gttggtgacc agtgtaaaat
1861 aacatctttt tcgcggtcga gaactgattt tttgtgtgc tcccccaaa ataagcgaaa
1921 acccagtgca tatctacata ggaacgaggt ggtttcgagt ggaaggagaa atgccgaa
1981 cgggtgtgaga taaaaaaaaa agaaaactga aatttttgag tgacattgcg cagaatggac
2041 agaaaaaaaa ataactgacc tcagactgtg gttcgtcact tcttcacaaa tgggtgtctg
2101 aagaccggga aatgtgtttg ttgactgcgc accgtctgct tgttgaaaaa aaaaaaaaaa
2161 aaaaaa
```

//

### Datenbankeintrag zu *extradenticle-1* aus *Cupiennius salei*; Zugriffsnummer AJ518943

```
LOCUS          CSA518943                1859 bp    mRNA      linear   INV 21-NOV-2003
DEFINITION     Cupiennius salei mRNA for extradenticle-1 (exd1 gene).
ACCESSION     AJ518943
VERSION       AJ518943.1  GI:38490437
KEYWORDS      exd1 gene; extradenticle 1.
SOURCE        Cupiennius salei
  ORGANISM     Cupiennius salei
               Eukaryota; Metazoa; Arthropoda; Chelicerata; Arachnida; Araneae;
               Araneomorphae; Entelegynae; Lycosoidea; Ctenidae; Cupiennius.
REFERENCE     1
  AUTHORS      Prpic,N.M., Janssen,R., Wigand,B., Klingler,M. and Damen,W.G.
  TITLE        Gene expression in spider appendages reveals reversal of exd/hth
               spatial specificity, altered leg gap gene dynamics, and suggests
               divergent distal morphogen signaling
  JOURNAL      Dev. Biol. 264 (1), 119-140 (2003)
  MEDLINE     22985001
  PUBMED     14623236
REFERENCE     2 (bases 1 to 1859)
  AUTHORS      Damen,W.G.M.
  TITLE        Direct Submission
  JOURNAL      Submitted (25-NOV-2002) Damen W.G.M., University of Cologne,
               Institute for Genetics, Weyertal 121, 50931 Cologne, NRW, GERMANY
FEATURES      Location/Qualifiers
  source       1..1859
               /organism="Cupiennius salei"
               /mol_type="mRNA"
               /db_xref="taxon:6928"
  gene         1..1859
               /gene="exd1"
  CDS          241..1602
               /gene="exd1"
               /codon_start=1
               /product="extradenticle 1"
               /protein_id="CAD57737.1"
               /db_xref="GI:38490438"
               /translation="MNDQQTMMHPVSQMPASMAGHVGAQHGYGLAQTSHVPGSQGGT
               PDQDAPKHDISEILQQIMNITDQSLDEAQARKHTLNCMRKPALFVLCIEIKEKTVLS
               LRNTQDEPPDPQLMRLDNMPIAEGVAGPEKGGGASAAANASAAAAASQGSQCENAI EH
               SDYRAKLAQIRQIYHQELEKYEQACNEFTTHVMNLLREQSRTRPITPKEIERMVQI IH
               KKFNSIQVQLKQSTCEAVMILRSRFLDARKRRNFSKQATEILNEYFYSHLSNPYPSE
               EAKEELARKCGITVSQVSNWFGNKRIRYKKNIGKAQEEANLYAAKKADYINDCYSPPS
               AAGSSPYSLALSSQGMISPPPGAGTPQESMYNMSMNGGDSYSSMGANVQSQANALRH
               VISQTAGYADGLPPQSTASMYDPAGMHQVGTDSIVSNAENGSMVLMKAVSHYRHAKMR
               NYQ"
ORIGIN        1 gaagtggtcct gactggcatt atcgttcaac ccacctcggg gccgctgctg aggagctgtc
              61 cggtcaagcc cattcccaat caaaacactc aattatacgg cagtgtggtg gttcgtgaag
              121 tgtgttcccc cgcgttttat ggatgttcgg tgctccccga aacagttttg cgggtgctgag
              181 cttcggctcg ggcctagct cgtctgaaa aaaattcaag gccccctctg cctgtgtaga
              241 atgaacgatc agcaaacgat gatgcatcca gtatcgcaa tgcttcagc gagcatggcc
              301 ggctcatggtt gggcccagca cggctatgga ctggcccaaa cgtcccatgt cctcgggtca
              361 caggggggta ccccgacca ggacgaccc aagcacgata ttccagaat tctgcaacaa
              421 atcatgaaca ttacggacca aagtttgac gaagctcaag cgaggaaca cacgttgaac
              481 tgtcatcga aagaagcctgc tttgtttagc gttcctttgt aaataaagga aaaaacagtg
```

## Anhänge

```
541 ctaagtctac gcaataccca agaagacgag ccccccgacc cccagctcat gcggtctgac
601 aacatgcca tcgcccagg ggtggccggg cccgagaagg gcggtggggc ctctgcccga
661 gcgaacgcgt ctgcccgggc cgcctcacag ggctctcagt gtgaaaacgc catagaacac
721 tccgactaca gggccaaatt ggccgagatt aggcaaatat accaccaaga actagaaaaa
781 tacgaacagg cctgcaacga gttcacgacg catgtgatga atttgttaag ggagcaaaagt
841 cgcaccggc ccatcacgcc caaggagatc gaacgtatgg ttcagatcat ccacaagaag
901 ttcaactcca tccaagtcca gctcaagcag agcacctgcg aggccgtcat gatcctcagg
961 tccaggttcc tggatgccag gaggaaaagg cggaaattca gcaaaacaagc taccgaaatc
1021 cttaacgagt acttctattc tcacctcagt aatccctacc ccagcgagga ggcaaaggaa
1081 gaactcgcca ggaagtgtgg catcacggtt tctcaggtat caaatgggtt cggcaataag
1141 aggatacgat ataaaaagaa tataggcaaa gctcaagaag aagccaacct ttacgccgcy
1201 aaaaagcag actacatcaa cgactgctac tctccgccct ccgcccgggg ttcctcccc
1261 tacagcctag cactctcgtc tcaagggcag atgatcagcc cgccccccgg tgcgggcaca
1321 cccaagagt ccatgtacaa tatgagcatg aacggcgggg attcttactc gtccatgggc
1381 gccaacgtac agtcgcaagc taacgcactg aggcacgtga tttcgcaaac ggcgggctac
1441 gcagacggtc taccgcccca gtcccaccga tctatgtacg atcctgcagg catgcaccag
1501 gtgggtacag actccattgt ctctaagtc gaaaaagggt cagtgatggc cctaaaggcg
1561 gtttcacact accggcatgc gaagatgcyg aactaccagt agctagagag ggaattaatt
1621 gattctgttc agaggattag cttctgagc ttcattcccta gtgcagtaag agaaccaaaa
1681 gcgtcagcca atcgggtgagc agggccaggc tcaaacccagc caatcaggaa ggactcagta
1741 cttcacagat atacgtttcc aatgaaaaaa tataaaaaaa gaagaaaaaa aatctcgcag
1801 acctcaaaag aatcatgtt tcatcaaaat aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa
```

//

### Datenbankeintrag zu *extradenticle-2* aus *Cupiennius salei*; Zugriffsnummer AJ518944

```
LOCUS          CSA518944                1282 bp    mRNA       linear     INV 21-NOV-2003
DEFINITION     Cupiennius salei mRNA for extradenticle 2 (exd2 gene).
ACCESSION      AJ518944
VERSION        AJ518944.1  GI:38490439
KEYWORDS       exd2 gene; extradenticle 2.
SOURCE         Cupiennius salei
  ORGANISM     Cupiennius salei
                Eukaryota; Metazoa; Arthropoda; Chelicerata; Arachnida; Araneae;
                Araneomorphae; Entelegynae; Lycosoidea; Ctenidae; Cupiennius.
REFERENCE      1
  AUTHORS      Prpic,N.M., Janssen,R., Wigand,B., Klingler,M. and Damen,W.G.
  TITLE        Gene expression in spider appendages reveals reversal of exd/hth
                spatial specificity, altered leg gap gene dynamics, and suggests
                divergent distal morphogen signaling
  JOURNAL      Dev. Biol. 264 (1), 119-140 (2003)
  MEDLINE      22985001
  PUBMED       14623236
REFERENCE      2 (bases 1 to 1282)
  AUTHORS      Damen,W.G.M.
  TITLE        Direct Submission
  JOURNAL      Submitted (25-NOV-2002) Damen W.G.M., University of Cologne,
                Institute for Genetics, Weyertal 121, 50931 Cologne, NRW, GERMANY
FEATURES       Location/Qualifiers
  source       1..1282
                /organism="Cupiennius salei"
                /mol_type="mRNA"
                /db_xref="taxon:6928"
  gene         1..1282
                /gene="exd2"
  CDS          151..1140
                /gene="exd2"
                /codon_start=1
                /product="extradenticle 2"
                /protein_id="CAD57738.1"
                /db_xref="GI:38490440"
                /translation="MDDPQRMHPVVSQHTSVSMAGHVVPQHGYGMPQPHDITGQAPP
                HDPDVRKHDISEILOQIMNITDQSLDEAQARKHTLNCHRMPALFVLCIEIKETVLS
                LRNTQEEEEPPDQLMRLDNMLIAEGVAGPEKAGAGSAANSAAGSPQSENAIEHSDYR
                AKLAQIRQIYHQELEKYEQACNEFTTHVMNLLREQSRTRPITPKIEIERMVQIIHKKFN
                SIQVQLKQSTCEAVMILRSRFLDARRKRRNFSKQATEILNEYFYSHLSNPYPSEAKE
                ELARKCGITVSVSNWFGNKIRYKKNIGKAQEENLYAAKKAGKPDLCDDFF"
ORIGIN         1 tagagtcggg gccacagtgt ggatgtgggg tgaactccca gccactttca tggatggtg
                61 tgcgcgtggg ttccgctgag acgctcctgt gtctcgtctg acacgaggcc ggagaagggc
                121 gagcgggtgc tgggtgtgtt gtcgtatagc atggacgac cacaagaat gatgcacccc
                181 gtttcgcagc atacttccgt gagcatggct ggtcacgtt ttcctcagca tggctatgga
                241 atgccccagc aaccacatga tacaacggga caagcacctc ctcatgatcc ggacgttcgg
```

## Anhänge

```
301 aaacacgaca tctctgaaat acttcaacaa ataatgaaca tcacggacca gtcacttgac
361 gaagcccagg cacggaagca taccctcaac tgatcatcgt tgaagcctgc actcttcagt
421 gtactctgtg aaatcaagga aaaaacagtc ctaagtctac ggaacacgca agaggaagaa
481 ccgcccagacc ctcagctcat gcggttgac aatatgttaa tagctgaggg ggtagccgga
541 cccgagaagg gtgcaggtag cgcggccaac tcggcagcag ctgccggttc gccccagtca
601 gaaaaagcca tcgaacactc agactaccgc gccaggttg ggcagatccg ccaaatatac
661 caccaggagc tagaaaaata cgaacaggcc tgcaatgagt tcacgacgca cgttatgaac
721 cttctgctgg aacagagtcg gacgcgtccg atcacgcca aggagatcga acgcatggta
781 cagatcatcc acaagaagt caactccatc cagggtgcagc tgaagcagag cacatgcgag
841 gccgtcatga tcctcaggtc gaggttccta gatgccaggc ggaaaaggcg taacttcagc
901 aagcaggcga cggagatcct gaacgagtac ttctactccc acctcagtaa cccatacccc
961 agcaggagg cgaaggagga gctcgcaagg aagtgtggca tcacagatc ccaggtatcc
1021 aattggtttg gaaacaagag gatagcgtac aagaaaaaca ttggtaaagc tcaagaagaa
1081 gccaacctct acgctgcca aaaaagcggg aagcccgatc tctgtgacga tttcttctga
1141 gtgtttttgt ttgtgctggg ttaaacaaaa cggcagcgcg tctctcttgt gtgtgtaaaa
1201 tcctctctct atctgtaaaa tccatctcat attttgaagt ccattaaaag ttgtgaatat
1261 tttgaaaaaa aaaaaaaaaa aa
//
```

### Datenbankeintrag zu *homothorax-1* aus *Cupiennius salei*; Zugriffsnummer AJ518945

```
LOCUS          CSA518945                3466 bp    mRNA    linear    INV 21-NOV-2003
DEFINITION     Cupiennius salei mRNA for homothorax 1 (hth1 gene).
ACCESSION      AJ518945
VERSION        AJ518945.1  GI:38490441
KEYWORDS       homothorax 1; hth1 gene.
SOURCE         Cupiennius salei
ORGANISM       Cupiennius salei
                Eukaryota; Metazoa; Arthropoda; Chelicerata; Arachnida; Araneae;
                Araneomorphae; Entelegynae; Lycosoidea; Ctenidae; Cupiennius.
REFERENCE      1
AUTHORS        Prpic,N.M., Janssen,R., Wigand,B., Klingler,M. and Damen,W.G.
TITLE          Gene expression in spider appendages reveals reversal of exd/hth
                spatial specificity, altered leg gap gene dynamics, and suggests
                divergent distal morphogen signaling
JOURNAL        Dev. Biol. 264 (1), 119-140 (2003)
MEDLINE        22985001
PUBMED        14623236
REFERENCE      2 (bases 1 to 3466)
AUTHORS        Damen,W.G.M.
TITLE          Direct Submission
JOURNAL        Submitted (25-NOV-2002) Damen W.G.M., University of Cologne,
                Institute for Genetics, Weyertal 121, 50931 Cologne, NRW, GERMANY
FEATURES       Location/Qualifiers
source         1..3466
                /organism="Cupiennius salei"
                /mol_type="mRNA"
                /db_xref="taxon:6928"
gene          1..3466
                /gene="hth1"
CDS           485..2002
                /gene="hth1"
                /codon_start=1
                /product="homothorax 1"
                /protein_id="CAD57739.1"
                /db_xref="GI:38490442"
                /translation="MKSEPYPLEHSLAMQYEDGMPHYGAMDGGPMYDPHPHRAQMOS
                LGHGPHMNHTPLHQYHGHNHVSVMGNHIMGSVPDVHVKRDKDAIYRHPLFLLALIFE
                KCELATCTPREPGIAGGDVCSSESNEDIAVFAKQIRQEKPYSPNPELDSLMVQAIQ
                VLRFHLLLEKVVHELCDNFCQRYINCLKGMPIDLVIDERDSKPGDLGDNNNNSNGG
                GNGGGAGSGNGGNPGGRNPDTTGHSSDNSSTPDQSFLPYQRPPSQSLNSYSTGPPDA
                RSPAGSTGTPGPISQQPSSLSTDNSEAGDASIGSGDGTGEDDDDDRSKQRQKRGKI
                FPKVATNIMRAWLFOHLTHPYPSDQKKQLAODTGLTILQVNNWFINARRRIVQPMID
                QSNRAGGASAAAYGPEGAGMGYMMDGAQQMHIRPPGMQNLSCSEGAMGMGMGGMGYS
                QMSQLRSPVHSQAMLLPGHPHAMMAHGPMPGHPGLPPQGSFYDASGGHIMDIHAS"
ORIGIN        1 caacagcgga aggttgcgcg cgtgtttgag attggtgtgt gtagtgtgca ttttttaagt
61 gctcgggttt ggtcgcgtgac aaacacattg cgtgaaaaaa aaaataaata aataaacaca
121 aacagttatg cccgcgcgct gatctcaaag aagagagaaa aaaaggtgta tgcagcagta
181 cctggagaaa agtttctgag agaagttttt aagcagatg atttattgtg ttttgattgg
241 ggagaaaaaa cttgtagaga ttgacttagc gctgcagcac gttgtttgca agtgattttt
301 aaaaacacgc ttctggttct cttctcagct cgatctcgat taaggataag tttttaaaaa
361 gctcgcgtgct aaatagaaat tagtgactgg tacgaaccga aagaaaacca taccagtgct
```

```

421 cgcacctcca aacaacttaa atagtgtgtg ttgtctttgg atggccccc attgatcttg
481 ctttatgaag agtgagcctt atccattaga acattcgctg gccatgcagt atgaagatgg
541 aatgccgcac tacggcgcaa tggacggcgg gcccatgtat gaccgcgatg ggccacaccg
601 ggcgcaaatg cagtccctgg gtggccatgg gccgcacatg aaccacacgc cactgcacca
661 gtaccatggc aatcatgttt ctggagtgat gggaaacatg attatgggct ctgtccccga
721 cgtacataag agagataaag atgccatata caggcatccc cttttcccc tgctggcact
781 gatcttcgag aagtgcgagc tggcccagtg cacccccggg gagccagggg tgcgaggagg
841 agacgtctgt tcctcagagt cttcaatga agacattgca gtcttcgcca agcagattag
901 gcaagaaaaa ccatattact ctcccacccc tgaattagac agtcttatgg ttcaagcaat
961 acaagttctg aggtttcatt tattagaatt agaaaagggt cacgaactct gcgataatth
1021 ctgccagcgg tatataaact gtctcaaagg caagatgcca atcgacttgg tcactgcagc
1081 gagagacagc aaacccgggt acctggggga caacaataac aacagcagta acggcggcgg
1141 gaacggcggg ggtgctgggt cgggaaatgg tggtaacccc ggtggcagag gaaaccccga
1201 caccaccgga cattcctccg acaactcatc tactccagac caatcttttt taccctacca
1261 gcgtccgccc tcacagtccc tcaactcgta cagtacaggg cccgatgacg caaggtcgcc
1321 ggcgggctcg acgggaacgc cgggtcctat atcccacaa cctagttccc agctcagtac
1381 agacaacaac agtgaagccc gtgacgctag catcggtccc ggtgacggca cgggggagga
1441 tgacgacgac gacaggagca aaaagcgaca gaaaaaacgc ggcatcttcc ccaagtagc
1501 caccaacatt atgagggcgt ggctcttcca gcactttacg catccatacc catccgaaga
1561 ccagaaaaag caattggctc aagatactgg tttgacgatt cttcaagtta ataattggtt
1621 tattaacgca aggagaagaa tcgtacaacc aatgattgat cagtcaaaca gagcaggagg
1681 agctagtgtg gcgtacggac cagaaggcgc aggcattgggt tatatgatgg atggtgccc
1741 acagatgcac attagaccac caggcatgca aaacctatct tgcagtgaag gcgccatggg
1801 catggggcac atgggtggaa tggggcgata ctcccagatg tcccactccc gctcccctgt
1861 gcattctcag gccatgctcc tgcccgggtca cctcagccc atgatgatgg cccacgggcc
1921 aatggggcac ccaggtctac cccctcaggg gtctccgtac gacgcacccg gaggacacat
1981 catggacata catgccagct aaaggaactc aatggctctc tctttctctc catttctctg
2041 catctgtatc cattttactt tgatcttaag ataggacttt tgagagtggg ggacgacgaa
2101 gcacggactc aattaaggac gttttgtttt cggaaacttt tctttttttc gttctcaaca
2161 gggagagggg cgaaggaatg attttacgag agtaggcagt tgagcaagtt aacggatgtg
2221 gctgttacca taaaggtgga aattcctcgt aatcgtttgt gcaaaattta gtaaccagcc
2281 ttagtgtccc atactggat taggatgatt tttttttctt ttaagcgtgg aaatacttca
2341 tgagtaaaag cgaaaactct gcggatactg agttaagaat acggtattac tttgagtaag
2401 aactatacga cttctgagat atttaaaaaa cccacaaaaa ttgttttact ttattacgat
2461 ggtctgagtt tgagggataa ttacagagta tacgagcatt gcagagaact cttgatacag
2521 acgtttctgc aagagcaaaa cagtttctac tgaacaaaat agaaattacc aaacgaagcc
2581 aatgaattca atatttatat aacgcctatc acactaagtc gtcgtaatgt ttcagtgata
2641 gtataatttc tagcactgca gagtcttata gtttttccac cagttaataa tttgatattc
2701 ttacctgtta ttcttttatt tattaggtct tttagttatg ttttctgctc ctaaattaaa
2761 gttgtatcca tgagttaccg ctttcgttca togcttattt attcttcagc cactctgaag
2821 aaaaacggct actttttgtc tttttatgtc gagcttaagg tcttctactc gatatgtttg
2881 taattgcgaa agagaaacac gaggatttct aacctttgag aaatttctgt gttacgggat
2941 tgttttaaaa agcattatgg cgggttctat gcacttggct gaacttagag atggactttt
3001 agctttatga ttcagtcac ttcatactc gcctattttc gatataatatt cgtatgtaat
3061 gtaatgaaaa tgaaatcagt ttctacactt gtgatttght atagaggaac gatgcataaa
3121 taactaatgc acaaaattat ggtacttctt ggaaacttgt aaatatacat taagaaaaat
3181 tccgattaag taattgcatt attcagttca tgttgaatga gtgttacgta ttattttaat
3241 aaaaatggaca attttatagt aactgttgat aatcagctga aaatcaatgt caaaacaccg
3301 atgggaaaag tgctgtcttt gatcaattat tgtatttgat tgtgacattc agtctttcaa
3361 aatcagtgca attgtttatg actcagtttg tactttgaga aatgcataaa gttcaaaaata
3421 ttaaaaaaaa aaaacaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaa

```

//

*Datenbankeintrag zu Distal-less aus Glomeris marginata; Zugriffsnummer AJ551276*

```

LOCUS           GMA551276                491 bp    mRNA    linear    INV 30-JUL-2003
DEFINITION     Glomeris marginata partial mRNA for distal-less protein (dll gene).
ACCESSION     AJ551276
VERSION       AJ551276.1  GI:33352127
KEYWORDS      distal-less protein; dll gene.
SOURCE        Glomeris marginata
ORGANISM      Glomeris marginata
               Eukaryota; Metazoa; Arthropoda; Myriapoda; Diplopoda; Pentazonia;
               Glomerida; Glomeridae; Glomeris.
REFERENCE     1
AUTHORS       Prpic,N.M. and Tautz,D.
TITLE         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
JOURNAL       Dev. Biol. 260 (1), 97-112 (2003)
MEDLINE       22767835
PUBMED        12885558

```

## Anhänge

---

REFERENCE 2 (bases 1 to 491)  
AUTHORS Prpic,N.M.  
TITLE Direct Submission  
JOURNAL Submitted (25-MAR-2003) Prpic N.M., Dept. Evolutionary Genetics,  
Institute for Genetics, Univ. Cologne, Weyertal 121, 50931 Koeln,  
50931, GERMANY

FEATURES Location/Qualifiers  
source 1..491  
/organism="Glomeris marginata"  
/mol\_type="mRNA"  
/db\_xref="taxon:62006"  
/dev\_stage="0 to 14 day embryos"  
gene 1..491  
/gene="dll"  
CDS <1..>491  
/gene="dll"  
/codon\_start=3  
/product="distal-less protein"  
/protein\_id="CAD82905.1"  
/db\_xref="GI:33352128"  
/translation="GGLQGAAAAAAAAAAAAAMGHHHHHHHHGTPYQLRSPYPPPPSQNV  
VSQHENAFAAAAAAAAAAAQPSSRPLAAYNPFAMNTHNSYGHPTHPYLGTYTACSSP  
PRDDKTPMEETMRVNGKGGKMRKPRTIYSSLQLQLNRRFQRTQYLALPERAELAASL  
GLT"

ORIGIN  
1 aggggggtct tcaagggcg gcagctgcag cagccgccgc cgcagcaatg ggacaccacc  
61 accaccatca tcaccatcac gggacaccgt accagctgag gtccccttac cggccacctc  
121 cgctcgagaa cgtgggtgtca cagcatgaaa atgcggttgc agcggccgcc gctgctgcag  
181 ccgcgggcgca accatcgtct agcctctag ctgcttaca tccttttgc gctatgaaca  
241 cgcacaactc ttatgggtcat cccacgcctc cttacctggg tacataccag acggcggtgct  
301 cgctgcctcc cagagacgat aagacgccta tggagagac aatgcgagtg aatgggaaag  
361 gaaaaaagat gcgcaaacca aggaccatct actctagttt gcagctgcaa cagctgaatc  
421 ggcgcttcca acggaccag tatttggctc taccagagcg tgctgaactg gcagcttctt  
481 tgggtctcac g

//

### Datenbankeintrag zu dachshund aus *Glomeris marginata*; Zugriffsnummer AJ551277

LOCUS GMA551277 940 bp mRNA linear INV 30-JUL-2003  
DEFINITION *Glomeris marginata* partial mRNA for dachshund protein (dac gene).  
ACCESSION AJ551277  
VERSION AJ551277.1 GI:33352129  
KEYWORDS dac gene; dachshund protein.  
SOURCE *Glomeris marginata*  
ORGANISM *Glomeris marginata*  
Eukaryota; Metazoa; Arthropoda; Myriapoda; Diplopoda; Pentazonia;  
Glomerida; Glomeridae; *Glomeris*.

REFERENCE 1  
AUTHORS Prpic,N.M. and Tautz,D.  
TITLE 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  
JOURNAL Dev. Biol. 260 (1), 97-112 (2003)  
MEDLINE 22767835  
PUBMED 12885558

REFERENCE 2 (bases 1 to 940)  
AUTHORS Prpic,N.M.  
TITLE Direct Submission  
JOURNAL Submitted (25-MAR-2003) Prpic N.M., Dept. Evolutionary Genetics,  
Institute for Genetics, Univ. Cologne, Weyertal 121, 50931 Koeln,  
50931, GERMANY

FEATURES Location/Qualifiers  
source 1..940  
/organism="Glomeris marginata"  
/mol\_type="mRNA"  
/db\_xref="taxon:62006"  
/dev\_stage="0 to 14 day embryos"  
gene 1..940  
/gene="dac"  
CDS <1..>940  
/gene="dac"  
/codon\_start=2

```

/product="dachshund protein"
/protein_id="CAD82906.1"
/db_xref="GI:33352130"
/translation="RILRGLGAIQPGVNRCKLLCCKDFDVLKYDCTTASSRPGRPPKR
ASLLGMSPPGHQETLLKLLKKSRLKLENDVTSYENGHIAAHLKGLHRAIDPMLLPPLLTG
ETRMEKSPLLANGYNHPPTHINPLPFMALNHHGHSATAILNPATGVPISSSHSMSSRS
DGSIIKERAHVADVLAARLKEEKNDKDRSIMALDHRVRKLNQLNGSSNGHSPVLNLSQ
KSTCAVAGDQSGSDAALNDPCDDDDNI SDVDDDEKQDLSDGPDVSCGANGDRSAA
NATAAAAAAAAYSTLLGETSGGISSIIETLLRNIQGLL"
ORIGIN
  1 tcgcattctt cgaggtttgg gcgctattca gccaggagtc aacaggtgca agctgctctg
  61 ctgtaaggat ttcgacgtcc tgtacaagga ttgtaccaca gcgagtcttc gccctggggc
 121 acctccaaaa agagcttccc tgctcggcat gagtccaggc catcaagaga cattgttgaa
 181 gttgaagaaa agtcggctgg aaaatggcga ctacacctct tacgaaaacg gccatattgc
 241 tgctcacctg ctcaagggcc ttcaccgtgc catagatccc atgatgctct tcccgctcct
 301 gacgggtgaa actcgtatgg aaaaatcgcc gctgctggcc aacgctaca accatccgcc
 361 aacacatatc aatcccttgc cgtttatggc tctcaacct catggtcatt ctgcgacggc
 421 catcttgaat cctgcaactg gggtgccaat ctcttcaagc cattccatga gcagccgag
 481 cgatgggtcc ataatcaaag agagagctca tgtcgcgtgat gttcttgag cacgattgaa
 541 agaggagaaa aatgactgtg acagatcgat tatggcggtg gaccacagag ttcgaaagt
 601 gaaccaattg aatggttcat ccaatggaca cagcccgggtg ttgaatcttt ctcaaaaaag
 661 tactttgta cctgcaggcg accaaaagtgg aagtgatgca gcactgaacg atccttgtga
 721 cgacgacgat gacaatatca gtgacgtaga tgacgatgat gaaaaggacc aagacctgag
 781 cgacggcccc gatgtttcat gcgggtcgaa cgggcatcgc agcgcgcgca atgacgacgc
 841 gcgcgacgt gcagcagcg cttattcaac gcttcttga gaaacaagt gcggaatttc
 901 atcaatcgaa acgcttcttc gcaatatcca agggcttctg
//

```

Datenbankeintrag zu *extradenticle* aus *Glomeris marginata*; Zugriffsnummer AJ551278

```

LOCUS      GMA551278                529 bp    mRNA    linear   INV 30-JUL-2003
DEFINITION Glomeris marginata partial mRNA for extradenticle protein (exd
            gene).
ACCESSION  AJ551278
VERSION    AJ551278.1  GI:33352131
KEYWORDS   exd gene; extradenticle protein.
SOURCE     Glomeris marginata
ORGANISM   Glomeris marginata
            Eukaryota; Metazoa; Arthropoda; Myriapoda; Diplopoda; Pentazonia;
            Glomerida; Glomeridae; Glomeris.
REFERENCE  1
AUTHORS    Prpic,N.M. and Tautz,D.
TITLE      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
JOURNAL    Dev. Biol. 260 (1), 97-112 (2003)
MEDLINE    22767835
PUBMED     12885558
REFERENCE  2 (bases 1 to 529)
AUTHORS    Prpic,N.M.
TITLE      Direct Submission
JOURNAL    Submitted (25-MAR-2003) Prpic N.M., Dept. Evolutionary Genetics,
            Institute for Genetics, Univ. Cologne, Weyertal 121, 50931 Koeln,
            50931, GERMANY
FEATURES   Location/Qualifiers
            source                1..529
                                   /organism="Glomeris marginata"
                                   /mol_type="mRNA"
                                   /db_xref="taxon:62006"
                                   /dev_stage="0 to 14 day embryos"
            gene                  1..529
                                   /gene="exd"
            CDS                   <1..>529
                                   /gene="exd"
                                   /codon_start=2
                                   /product="extradenticle protein"
                                   /protein_id="CAD82907.1"
                                   /db_xref="GI:33352132"
                                   /translation="VLSLHNTQEEPPDPQLMRLDNMLIAEGVAGPEKGGGSAANA
            SAAASGGPGQPDNAIEHPDYRAKLAQIRQIYHQELEKYEQACNEFTTHVMNLLREQSR
            TRPITPKEIERIVQIIHRKFSSIQMQLKQSTCEAVMILRSRFLDARRKRRNFSKQATE
            ILNEYFYSHLSNPYPS"

```



## Anhänge

### ORIGIN

```
1 agtgctcagt cttcacaaca cacaggagga ggaaccacct gaccctcaac tgatgctggt
61 ggataaatatg ctaattgctg aaggagtggc aggtccggaa aagggtggag ggtcagcagc
121 ggctgccaac gcctccgcag cagcttcagg gggctctgga caaccggaca atgccatcga
181 gcatccggat tatcgggcca aactggcaca gatccgacag atataccatc aggaactgga
241 gaaatacgaa caggcgtgca acgagttcac gaccatgtg atgaaccttc ttcgagaaca
301 gagtcgtact cgaccaatta cgccgaaaga gattgaaaga atagtgcaga tcatccacag
361 gaagtcttcc tccatccaga tgcaactcaa acagagcagc tgtgaagccg taatgatcct
421 gcgatccagc ttcctcgtat ccaggcggaa gaggcggaac ttagtaagc aggctactga
481 aatcctcaac gaatatttct attctcacct aagtaaccct tatccgagt
```

//

### Datenbankeintrag zu *homothorax* aus *Glomeris marginata*; Zugriffsnummer AJ551279

LOCUS GMA551279 817 bp mRNA linear INV 30-JUL-2003  
DEFINITION *Glomeris marginata* partial mRNA for homothorax protein (hth gene).  
ACCESSION AJ551279  
VERSION AJ551279.1 GI:33352133  
KEYWORDS homothorax protein; hth gene.  
SOURCE *Glomeris marginata*  
ORGANISM *Glomeris marginata*  
Eukaryota; Metazoa; Arthropoda; Myriapoda; Diplopoda; Pentazonia;  
Glomerida; Glomeridae; *Glomeris*.

REFERENCE 1  
AUTHORS Prpic,N.M. and Tautz,D.  
TITLE 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  
JOURNAL Dev. Biol. 260 (1), 97-112 (2003)  
MEDLINE 22767835  
PUBMED 12885558

REFERENCE 2 (bases 1 to 817)  
AUTHORS Prpic,N.M.  
TITLE Direct Submission  
JOURNAL Submitted (25-MAR-2003) Prpic N.M., Dept. Evolutionary Genetics,  
Institute for Genetics, Univ. Cologne, Weyertal 121, 50931 Koeln,  
50931, GERMANY

FEATURES Location/Qualifiers  
source 1..817  
/organism="Glomeris marginata"  
/mol\_type="mRNA"  
/db\_xref="taxon:62006"  
/dev\_stage="0 to 14 day embryos"  
gene 1..817  
/gene="hth"  
CDS <1..>817  
/gene="hth"  
/codon\_start=2  
/product="homothorax protein"  
/protein\_id="CAD82908.1"  
/db\_xref="GI:33352134"  
/translation="LFPLLALIFEKCELATCTPREPGVAGGDVCSSESFNEDIAVFSK  
QIRSEKPYVYVANPELDSLMLVQAIQVLRFHLELEKVELCDNFCHRYISCLKGKMPID  
LVIDERDYGKASDLGDSNNNTGSRAQSADAGSHTDNASTPDQSPSFYQRPPSSLSFTQ  
SQEDARSPASGGTPGPLSQPGSQGADNNSEAGDASIGSGDGTGEDEDEERGKQRQK  
RGIFPKVATNIMRAWLFOHLTHYPSEDQKKQLAQDTGLTILQVNNWFINARRR"

### ORIGIN

```
1 gttgttcccg ttgctggccc tgatcttcga gaaatgcgag ctggccactt gtacgccagc
61 ggaaccgggt gtggccggtg gcgacggttg ctctcggag tcatttaacg aggacatcgc
121 cgtcttctcc aaacagatcc ggtcggaaaa gccctactat gtggccaacc ccgagttgga
181 cagcctgatg gtgcaggcca tccaagtgtc acgcttccat ctgctggaac tggagaaggt
241 tcacgaactg tgtgacaatt tctgccatcg gtacatcagt tgtcttaagg ggaagatgcc
301 cattgacctt gtgatcgtat aaagagatgg aaagcatca gatttgggag acagcaacaa
361 caacactggc tctagggcac aaagtgcaga tgctggaagt cacacagaca atgccagtac
421 tcctgaccag tcgccttctt tttaccagcg cccccatcg tcgtctctgt cattcaccca
481 gagccaggaa gatgccaggt ccccagcttc cgggtggcacc ccaggacccc tcagccagca
541 accgggttcc cagggagcag acaataacag cgaagcagga gatgcgagca taggatctgg
601 agatgggacg ggcaagatg aggatgagga acggggtaaa aagagacaga aaaaaagagg
661 aatcttccct aaagtggcca ccaacatcat gagagcctgg ctcttcacag acctcacgca
721 tccgatccg tccgaagacc agaagaagca actggcgcag gacactggat tgaccatcct
781 gcaggttaac aactggttca tcaacgccag gcgcagc
```

//

### Anhang 2: Übrige Sequenzdaten

Dieser Anhang enthält die Sequenzdaten aller übrigen cDNA-Fragmente, die im Rahmen dieser Dissertation bearbeitet worden sind, und die noch nicht in der GenBank-Datenbank veröffentlicht worden sind. Dies sind in der folgenden Reihenfolge: *Gm-dpp*, *Gm-omb*, *Gm-H15-1*, *Gm-H15-2*, *Ta-H15-1*, *Ta-H15-2*, *Ta-H15-3*, *Cs-Ser*, *Cs-AP-2*, *Cs-odd-1*, *Cs-odd-2*, *Cs-odd-3*, *Cs-svp*, und *Cs-Egfr*.

Für jedes Genfragment ist jeweils die Basenfolge und darunter die vermutliche Aminosäuresequenz angegeben. In manchen Fällen kennzeichnet ein Sternchen (\*) ein Stop-Codon. Danach folgt 5' UTR.

# Anhänge

1 Gm-dpp 2	<p style="text-align: center;">10                      20                      30                      40                      50</p> <p>CCACGGTGAG TGCCAGTTCC CTTTGGCTGA CCATCTTAAC TCCACGAACC H G E C Q F P L A D H L N S T N</p>
1 Gm-dpp 2	<p style="text-align: center;">60                      70                      80                      90                      100</p> <p>ACGCCATTGT GCAAACATTG GTCAACTCCG TGAAGCCGAG TGCAGTACCG H A I V Q T L V N S V K P S A V P</p>
1 Gm-dpp 2	<p style="text-align: center;">110                      120                      130                      140                      150</p> <p>GGTGCTTGTT GTGTACCAAC GCAACTGTCA GCCATTTCCA TGCTCTACTT G A C C V P T Q L S A I S M L Y L</p>
1 Gm-dpp 2	<p style="text-align: center;">160                      170                      180                      190                      200</p> <p>GGATGAATAC GATAAGGTGG TGCTCAAGAA CTACCAGGAT ATGGTTGTTG D E Y D K V V L K N Y Q D M V V</p>
1 Gm-dpp 2	<p style="text-align: center;">210                      220                      230                      240                      250</p> <p>AAGGGTGCGG TTGCCGTTAA GATCGTGCCG TTCCGTCCGA AAAGTTGTTA E G C G C R *</p>
1 Gm-dpp 2	<p style="text-align: center;">260                      270                      280                      290                      300</p> <p>CTTTCGTATC TATATGGCTT GTTAGCCATG TTTACTGGTT CTCACTGCAA</p>
1 Gm-dpp 2	<p style="text-align: center;">310                      320                      330                      340                      350</p> <p>GGTAGCACCA TTGCGTCACT TTTGAGGGCC TGATCACAGT CGCATCGAAC</p>
1 Gm-dpp 2	<p style="text-align: center;">360                      370                      380                      390                      400</p> <p>ATGGTT</p>

# Anhänge

1	Gm-omb	ATCCGGACGA	CGGATGTTCC	CAGCGTTTAA	AGTGCGGGTT	TCCGGATTGG
2		S G R	R M F	P A F K	V R V	S G L
1	Gm-omb	ACAAGAAGGC	AAAGTACATT	CTGCTGATGG	ACATCGTTGC	AGCCGATGAT
2		D K K A	K Y I	L L M	D I V A	A D D
1	Gm-omb	TGCCGTTACA	AATTCCACAA	CAGCCGTTGG	ATGGTGGCTG	GCAAAGCTGA
2		C R Y	K F H N	S R W	M V A	G K A D
1	Gm-omb	CCCAGAGATG	CCCAAGAGGA	TGTACATCCA	TCCAGATTCA	CCCAGCACTG
2		P E M	P K R	M Y I H	P D S	P S T
1	Gm-omb	GAGAACAATG	GATGCAGAAA	GTGGTGTCTT	TTCACAAGCT	CAAACCTGACC
2		G E Q W	M Q K	V V S	F H K L	K L T
1	Gm-omb	AACAACATCT	CTGACAAGCA	CGGCTTTGTA	AGTACCTATC	ACTTTACGAT
2		N N I	S D K H	G F V	S T Y	H F T I
1	Gm-omb	ATTGAACTCG	ATGCACAAGT	ACCAACCTCG	TTTTCACCTA	GTGAGGGCCA
2		L N S	M H K	Y Q P R	F H L	V R A
1	Gm-omb	ACGATATCCT	AAAGTTGCC	TACAGCACGT	TTAGGACATA	CGTATTCAAG
2		N D I L	K L P	Y S T	F R T Y	V F K
1	Gm-omb	GAAACCGAA				
2		E T E				

# Anhänge

		10	20	30	40	50
1	Gm-H15-1	GTCAGGAAGG	CGGATGTTCC	CGACAGTTCG	CGTATCTTTC	GCTGGGATCA
2		S G R	R M F	P T V R	V S F	A G I
3	Gm-H15-2	GTCAGGAAGA	CGGATGTTCC	CCACGGTTCG	TGTATCTTTC	ACTGGAATCA
4		S G R	R M F	P T V R	V S F	T G I
		60	70	80	90	100
1	Gm-H15-1	ACTTAGACAC	CAAATACGCT	GTACTTATGG	ACATCGTACC	TGTGGACAAC
2		N L D T	K Y A	V L M	D I V P	V D N
3	Gm-H15-2	ACTTGACAC	GAACTATGCT	GTACTTATGG	ATATTGTACC	TGTGGATAAT
4		N L D T	N Y A	V L M	D I V P	V D N
		110	120	130	140	150
1	Gm-H15-1	AAACGTTACC	GTTACGCTTA	TCATCGGTCT	GCGTGGTTAG	TGGCTGGAAA
2		K R Y	R Y A Y	H R S	A W L	V A G K
3	Gm-H15-2	AAACGTTACC	GTTATGCTTA	TCATCGGTCA	GCGTGGTTAG	TGGCTGGCAA
4		K R Y	R Y A Y	H R S	A W L	V A G K
		160	170	180	190	200
1	Gm-H15-1	AGCAGATCCA	CCTGCTCCCT	CAAGGCTCTA	CCTACATCCC	GACTCACCAT
2		A D P	P A P	S R L Y	L H P	D S P
3	Gm-H15-2	AGCTGACCCG	CCTGCTCCCG	CAAGACTCTA	CTTACATCCT	GATTCACCAT
4		A D P	P A P	A R L Y	L H P	D S P
		210	220	230	240	250
1	Gm-H15-1	TTAGTGGTGA	ACAGCTCCGA	AAACAAGTGG	TTTCCTTCGA	GAAAGTCAAA
2		F S G E	Q L R	K Q V	V S F E	K V K
3	Gm-H15-2	TTAGTGGCGA	ACAGCTCCGA	AAACAAGTGG	TTTCCTTCGA	GAAAGTCAAA
4		F S G E	Q L R	K Q V	V S F E	K V K
		260	270	280	290	300
1	Gm-H15-1	CTCACCAACA	ACGAAATGGA	TAAACATGGA	CATATTATCC	TGAATTCAAT
2		L T N	N E M D	K H G	H I I	L N S M
3	Gm-H15-2	CTCACGAACA	ACGAAATGGA	TAAACATGGA	CATATTATCC	TGAATTCAAT
4		L T N	N E M D	K H G	H I I	L N S M
		310	320	330	340	350
1	Gm-H15-1	GCACCGATAC	CAACCAAGGG	TTCATCTAGT	GAAACGTCGT	GAAATATCAG
2		H R Y	Q P R	V H L V	K R R	E I S
3	Gm-H15-2	GCACCGATAC	CAACCAAGGG	TTCATCTAGT	GAAACGTCGT	GAAATATCAG
4		H R Y	Q P R	V H L V	K R R	E I S
		360	370	380	390	400
1	Gm-H15-1	CCAACGCTCC	AATAAGTGAC	CTCGAATCCG	AAGAGTTCCG	CACATTTGTA
2		A N A P	I S D	L E S	E E F R	T F V
3	Gm-H15-2	CCAACGCTCC	AATAAGTGAC	CTCGAATCCG	AAGAGTTCCG	CACATTTGTA
4		A N A P	I S D	L E S	E E F R	T F V
		410	420	430	440	450
1	Gm-H15-1	TTCACGGAAA	CCATATTTAC	TGCTGTGACA	GCCTACCAGA	ACCAACTGAT
2		F T E	T I F T	A V T	A Y Q	N Q L I
3	Gm-H15-2	TTCACGGAAA	CCATATTTAC	TGCTGTGACA	GCCTACCAGA	ACCAACTGAT
4		F T E	T I F T	A V T	A Y Q	N Q L I
		460	470	480	490	500
1	Gm-H15-1	CACAAAGCTG				
2		T K L				
3	Gm-H15-2	CACAAAGCTG				
4		T K L				

# Anhänge

		10	20	30	40	50
1	Ta-H15-1	AACGGGCAGG	AGGATGTTTC	CTACAGTCAG	GGTTAGCTTC	TCCGGCGCTG
2		T G R	R M F	P T V R	V S F	S G A
3	Ta-H15-2	AACAGGAAGG	CGCATGTTTC	CTACAGTCCG	AGCATCTTTC	TCCGGAGCAG
4		T G R	R M F	P T V R	A S F	S G A
5	Ta-H15-3	GACAGGGAGA	CGGATGTTTC	CAACTCTTCG	AGTCTCTTTC	TCCGGTTTGG
6		T G R	R M F	P T L R	V S F	S G L
		60	70	80	90	100
1	Ta-H15-1	GACTTCATAC	CAAATACGCT	GTTTATATGG	ACATAGTACC	AGTGGATAAT
2		G L H T	K Y A	V Y M	D I V P	V D N
3	Ta-H15-2	ATCCTCATGT	TAAATACGCT	GTGCTCATGG	ACATTGTACC	AGTTGACAAC
4		D P H V	K Y A	V L M	D I V P	V D N
5	Ta-H15-3	AAACGGTGGG	CACGTCACAA	CACAGTGGCA	GCACCAAGTT	CTTAGTACTC
6		E T V D	T S Q	H S G	S T K F	L V L
		110	120	130	140	150
1	Ta-H15-1	AAAAGGTACC	GGTACGCGTA	CCACCGTTCT	TCTTGGTTAG	TGGCTGGTAA
2		K R Y	R Y A Y	H R S	S W L	V A G K
3	Ta-H15-2	AAACGTTACC	GGTACGCATA	CCACCGGTCA	TCCTGGCTAG	TAGCTGCGAA
4		K R Y	R Y A Y	H R S	S W L	V A G K
5	Ta-H15-3	ATGGACATTG	TACCAGTAGA	CCAGAAGCGG	TACCGGTATG	CGTATCACCG
6		M D I	V P V D	Q K R	Y R Y	A Y H R
		160	170	180	190	200
1	Ta-H15-1	AGCAGATCCA	CCTTCACCTT	CGAGGTTGTA	CCTTCATCCA	GACTCCCCCT
2		A D P	P S P	S R L Y	L H P	D S P
3	Ta-H15-2	AGCCGATCCT	CCATCACCTT	GGAGACTCTA	CCTTCATCCG	GACTCACCTT
4		A D P	P S P	W R L Y	L H P	D S P
5	Ta-H15-3	TTCCTCGTGG	CTGGTAGCCG	GCAAGGCTGA	CCCGCCCTCA	CCGCCAAGGC
6		S S W	L V A	G K A D	P P S	P P R
		210	220	230	240	250
1	Ta-H15-1	TCACTGGAGA	ACAGCTAAAA	AAACAAGTTG	TTTCGTTCGA	AAAAGTCAAG
2		F T G E	Q L K	K Q V	V S F E	K V K
3	Ta-H15-2	TCACGGGAGA	CCAAGTGAAG	AAGCAAGTAG	TCTCGTTCGA	AAAAGTGAAG
4		F T G D	Q L K	K Q V	V S F E	K V K
5	Ta-H15-3	TCTATCTGCA	CCCCGATTCT	TCCTTCTCTT	TGGATCAGCT	GCGAAAACAG
6		L Y L H	P D S	S F S	L D Q L	R K Q
		260	270	280	290	300
1	Ta-H15-1	CTCACTAACA	ACGAAATGGA	CAAGCAGGGT	CATATTGTTC	TAAACTCAAT
2		L T N	N E M D	K Q G	H I V	L N S M
3	Ta-H15-2	CTCACGAACA	ATGAAATGGA	TAAACAGGGG	CATATCGTTC	TGAACTCTAT
4		L T N	N E M D	K Q G	H I V	L N S M
5	Ta-H15-3	GTCGTGTCTT	TCGAGAAGGT	CAAGCTCACC	AACAACGAGA	TGGACAAACA
6		V V S	F E K V	K L T	N N E	M D K Q
		310	320	330	340	350
1	Ta-H15-1	GCACAGGTAC	CAACCTCGGA	TACATCTTGT	GCGAAAGTCG	GGGGGTGCAA
2		H R Y	Q P R	I H L V	R K S	G G A
3	Ta-H15-2	GCACAAGTAT	CAACCTCGCA	TCCATCTAGT	GAAGCTGAAA	TCCAACCTACC
4		H K Y	Q P R	I H L V	K L K	S N Y
5	Ta-H15-3	GGGCCACATC	GTTCTCAATT	CCATGCACAA	ATACCAGCCC	CGTATCCACC
6		G H I	V L N	S M H K	Y Q P	R I H

# Anhänge

		360	370	380	390	400
1	Ta-H15-1	CGCTCACTTC	TTCGGCAGAG	CTGGAGAACG	AGGAATTTTCG	AAGTTACATT
2		T L T S	S A E	L E N	E E F R	S Y I
3	Ta-H15-2	AGGGCAGCCC	CGCAATCACA	AATATAGAAT	TGGAGCAATA	CAGAACTTAC
4		Q G S P	A I T	N I E	L E Q Y	R T Y
5	Ta-H15-3	TGGTGAGGCG	GAGAACTCC	CACGGGTCCA	ATAGTCCTAT	CACAGACCTA
6		L V R R	R N S	H G S	N S P I	T D L
		410	420	430	440	450
1	Ta-H15-1	TTCCCCGAGA	CAGTG TTCAC	AGCTG TTACA	GCTTATCAAA	ATCAGTTGAT
2		F P E	T V F T	A V T	A Y Q	N Q L I
3	Ta-H15-2	GTTTTTCCTG	AAACTGTATT	CACAGCGGTA	ACGGCGTACC	AGAATCAATT
4		V F P	E T V F	T A V	T A Y	Q N Q L
5	Ta-H15-3	GAGGCTGAGG	AGTACAGAAC	CTACGTCTAT	CCAGAAACAG	TCTTCACGGC
6		E A E	E Y R T	Y V Y	P E T	V F T A
		460	470	480	490	500
1	Ta-H15-1	AACAAAAC TG				
2		T K L				
3	Ta-H15-2	GATCACGAAG CTG				
4		I T K L				
5	Ta-H15-3	AGTGACTGCC TATCAAATC AGCTGATCAC GAAGCTG				
6		V T A Y Q N Q L I T K L				

# Anhänge

1	Cs-Ser	10	20	30	40	50
2		ATCAGAAGTG	AGCGACACTG	GACCCTGTAC	TTTCGGGAAT	GTGTCCACTT
		S E V	S D T	G P C T	F G N	V S T
1	Cs-Ser	60	70	80	90	100
2		CTGTGGTTGG	AGGAAATTCG	TTTTCAGTGC	ATGGAGATCC	CAATTTAAAT
		S V V G	G N S	F S V	H G D P	N L N
1	Cs-Ser	110	120	130	140	150
2		GTCGTTCTAA	CGCTTCCCTT	CACGTTCAGA	TGGACGAAGA	CGTTCACCCT
		V V L	T L P F	T F R	W T K	T F T L
1	Cs-Ser	160	170	180	190	200
2		ATTACTAGAT	GCTGTGCATC	AAGACCAAAG	CTTAACTTCA	AATACAACGC
		L L D	A V H	Q D Q S	L T S	N T T
1	Cs-Ser	210	220	230	240	250
2		ATACGGAGAG	GATTATCGAG	CGGCATGTGT	TCTCCGGAGT	GCAGATCCCG
		H T E R	I I E	R H V	F S G V	Q I P
1	Cs-Ser	260	270	280	290	300
2		GGAACGGAGT	GGAAGCTGAA	AGGGCACCGT	GGCCGCGCCG	CCCGGATCAA
		G T E	W K L K	G H R	G R A	A R I N
1	Cs-Ser	310	320	330	340	350
2		CTACCAATAC	AGAGTGCTGT	GTTCACCCCA	CTACTATGAC	TACACGTGTT
		Y Q Y	R V L	C S P H	Y Y D	Y T C
1	Cs-Ser	360	370	380	390	400
2		CAAAGTTCTG	CAGGCCCCGA	AACGACCGAT	TCGGGCACTA	CCGCTGCGAC
		S K F C	R P R	N D R	F G H Y	R C D
1	Cs-Ser	410	420	430	440	450
2		GAGCAAGGCG	ACAAAGTCTG	TCTACAAGGC	TGGCAAGGTC	CGAACTGCCA
		E Q G	D K V C	L Q G	W Q G	P N C E
1	Cs-Ser	460	470	480	490	500
2		AACGGCTGTC	TGCAAATTCG	GTTGCCATCC	GGAGCATGGA	TATTGTGCTG
		T A V	C K F	G C H P	E H G	Y C A
1	Cs-Ser	510	520	530	540	550
2		TTCCTGGTGA	ATGCAAGTGC	CGACCAGGAT	GGCAGTCAGA	GCTGTGTGAC
		V P G E	C K C	R P G	W Q S E	L C D
1	Cs-Ser	560	570	580	590	600
2		GAATGTATGC	CGTATCCAGG	GTGCAAACAT	GGCTACTGCA	ATGGTTCTCC
		E C M	P Y P G	C K H	G Y C	N G S P
1	Cs-Ser	610	620	630	640	650
2		TTGGCAATGC	ATC			
		W Q C	I			



# Anhänge

1	Cs-AP-2	CAACACACGC	AACACCCTCA	GCACCCACAC	CAGTACCACC	AGTTACATCC
2		Q H T	Q H P Q	H P H	Q Y H	Q L H P
1	Cs-AP-2	GCCACAAAGG	GGCACAGCGG	CCACCCCGG	ACACGTCGGA	CGCGACGACC
2		P Q R	G T A	A T P G	H V G	R D D
1	Cs-AP-2	CCCTGCACCC	CTTGCAAGCG	CACCCAGGAC	TGACGTATGC	GGACAGGAGT
2		P L H P	L Q A	H P G	L T Y A	D R S
1	Cs-AP-2	CGAGCAGACC	AGGCGTACGC	GGTCAGAAGG	CCGGACGTTT	TGGTACACGG
2		R A D	Q A Y A	V R R	P D V	L V H G
1	Cs-AP-2	GGGTCACCAC	GGTCTCAGTG	AACAAGACCT	CCTTAACCTA	CACAACGCTA
2		G H H	G L S	E Q D L	L N L	H N A
1	Cs-AP-2	CGCTACCAGC	CATAGACGAC	GGTCAGGGTG	GAAGCGTAGA	GGACGCTAAT
2		T L P A	I D D	G Q G	G S V E	D A N
1	Cs-AP-2	AGCTTATTTT	CTGGTGACCA	TAATAGTGTA	ATTAGGAAAG	GAGTCACCTC
2		S L F	P G D H	N S V	I R K	G V T S
1	Cs-AP-2	CCCGACCGAT	GTCTTCTGTT	CCGTGCCCGG	CAGACTGTCC	CTGCTCAGCT
2		P T D	V F C	S V P G	R L S	L L S
1	Cs-AP-2	CTACCTCCAA	GTACAAGGTG	ACTGTCGGTG	AAGTCCAGAG	GAGGCTGTCT
2		S T S K	Y K V	T V G	E V Q R	R L S
1	Cs-AP-2	CCCCCAGAGT	GTCTCAACGC	GTCCCTGTTG	GGAGGAGTGC	TCAGGAGGGC
2		P P E	C L N A	S L L	G G V	L R R A
1	Cs-AP-2	CAAGTCTAAA	AACGGCGGTC	GATCCCTGAG	AGAGAAGCTC	GAAAAAATCG
2		K S K	N G G	R S L R	E K L	E K I
1	Cs-AP-2	GCCTCAGTTT	GCCCCGCGGT	CGGCGGAAAG	CGGCGAATGT	CACCCTCCTC
2		G L S L	P A G	R R K	A A N V	T L L
1	Cs-AP-2	ACATCGCTGG	TAGAAGCGGA	AGCCATCCAT	TTGGCGAGAG	ATTTTGGGTA
2		T S L	V E G E	A I H	L A R	D F G Y
1	Cs-AP-2	CGTT				
2		V				

# Anhänge

		10	20	30	40	50
1	Cs-odd-1	CAAAGACATT	TCACCAAGTC	GTACAATCTC	CTGATCCATG	AGAGGACGCA
2		Q R H	F T K S	Y N L	L I H	E R T H
3	Cs-odd-2	CAAAGGAGGT	TCACCAAGTC	CTACAACCTG	TTGATCCACG	AAAGGACCCA
4		Q R R	F T K S	Y N L	L I H	E R T H
5	Cs-odd-3	CAAAGGAGGT	TCACTAAGTC	CTATAATTTA	TTGATTCACG	AACGAACTCA
6		Q R R	F T K S	Y N L	L I H	E R T H
		60	70	80	90	100
1	Cs-odd-1	CACTGATGAG	AGGCCGTACA	CCTGTGATAT	CTGCCAGAAA	GCTTTCAGGA
2		T D E	R P Y	T C D I	C Q K	A F R
3	Cs-odd-2	CACGGACGAA	AGGCCGTACA	CGTGTGACAT	ATGCCACAAG	TCATTTCAGGA
4		T D E	R P Y	T C D I	C H K	S F R
5	Cs-odd-3	TACCGATGAA	AGACCGTACA	CTTGCGACAT	TTGTCATAAA	GCATTAAGGA
6		T D E	R P Y	T C D I	C H K	A L R
		110	120	130	140	150
1	Cs-odd-1	GGCAGGACCA	TCTCAGGGAC	CATAGGTATA	TTCATTTCGAA	AGAAAAACCC
2		R Q D H	L R D	H R Y	I H S K	E K P
3	Cs-odd-2	GACAAGATCA	CCTTAGAGAT	CACAGGTATA	TACATTCTAA	GGAGAAACCT
4		R Q D H	L R D	H R Y	I H S K	E K P
5	Cs-odd-3	GACAAGATCA	TTTAAGAGAT	CACAGGTATA	TTCACTCGAA	AGAAAAACCT
6		R Q D H	L R D	H R Y	I H S K	E K P
		160	170	180	190	200
1	Cs-odd-1	TTCAAAGTGCA	GCGAGTGTGG	CAAAGGGTTC	TGTCAGTCTC	GCACCCTCGC
2		F K C	S E C G	K G F	C Q S	R T L A
3	Cs-odd-2	TTCAAAGTGTA	CAGATTGTGG	TAAAGGGTTT	TGCCAGTCTC	GAACCCTAGC
4		F K C	T D C G	K G F	C Q S	R T L A
5	Cs-odd-3	TTCAAATGTG	GAGAATGTGG	GAAAGGATTC	TGCCAGTCTC	GCACCCTAGC
6		F K C	G E C G	K G F	C Q S	R T L A
		210	220	230	240	250
1	Cs-odd-1	CGTTCACCGT	ATACTCCACA	TGGAAGACAG	TCCTCACAAG	TGTCCGACGT
2		V H R	I L H	M E D S	P H K	C P T
3	Cs-odd-2	AGTCCACAGG	ATTCTGCACA	TGGAGGATTC	GCCCCACAAA	TGTTCTGACTT
4		V H R	I L H	M E D S	P H K	C S T
5	Cs-odd-3	CGTTCATCGG	ATCCTGCACA	TGGAGGACAG	CCCCCACAAA	TGTCCCCTT
6		V H R	I L H	M E D S	P H K	C P T
		260	270	280	290	300
1	Cs-odd-1	GCGGCCGGAC	CTT			
2		C G R	T			
3	Cs-odd-2	GCGGTAGAAC	GTT			
4		C G R	T			
5	Cs-odd-3	GCGGAAGAAC	CTT			
6		C G R	T			

# Anhänge

		10	20	30	40	50
1	Cs-svp	CGCCCGGGCA	GGTCCGGAAC	TCCCTCGAGT	TCGGACAAAG	GGGGCAGCA
2		R P G R S G T	P S S S D K	G G Q Q		
		60	70	80	90	100
1	Cs-svp	GATCGAGTGC	GTGGTCTGCG	GGGACAAGTC	CAGTGGTAAA	CACTATGGCC
2		I E C V V C	G D K S S G K	H Y G		
		110	120	130	140	150
1	Cs-svp	AATTCACGTG	CGAGGGGTGC	AAGAGCTTTT	TCAAGAGGAG	TGTCCGGCGA
2		Q F T C E G C	K S F F K R S	V R R		
		160	170	180	190	200
1	Cs-svp	AATCTCACCT	ACACCTGCAG	AGGGAATAGG	AACTGTCCCA	TAGACCAACA
2		N L T Y T C R	G N R N C P	I D Q H		
		210	220	230	240	250
1	Cs-svp	CCACCGAAAC	CAGTGCCAGT	ACTGTAGACT	CAAGAAATGT	CTCAAGATGG
2		H R N Q C Q	Y C R L K K C	L K M		
		260	270	280	290	300
1	Cs-svp	GCATGAGAAG	AGAGGCTGTC	CAAAGAGGGC	GAGTGCCTCC	GAATCAGCAT
2		G M R R E A V	Q R G R V P P	N Q H		
		310	320	330	340	350
1	Cs-svp	CCGCAGATCT	CACTGACCAA	CGGCGACTCC	TTGGGCGGCC	CGCACTCCTA
2		P Q I S L T N	G D S L G G	P H S Y		
		360	370	380	390	400
1	Cs-svp	CCTCTCCAGC	TTCATCTCCC	TACTGCTGAG	GGCTGAACCC	TATCCGCCGT
2		L S S F I S	L L L R A E P	Y P P		
		410	420	430	440	450
1	Cs-svp	CCCGGTACGC	TCAGTGCCTG	CAACAGAACA	ACATTATGGG	CATAGACAAC
2		S R Y A Q C V	Q Q N N I M G	I D N		
		460	470	480	490	500
1	Cs-svp	ATATGTGAAC	TGGCCGCAAG	ACTGCTGTTC	AGCGCTGTGG	AGTGGGCTAG
2		I C E L A A R	L L F S A V	E W A R		
		510	520	530	540	550
1	Cs-svp	GAACATACCC	TTCTTCCCGG	ACCTTCAGGT	AACTGATCAG	GTTGCTCTCC
2		N I P F F P	D L Q V T D Q	V A L		
		560	570	580	590	600
1	Cs-svp	TGAGGTGGT	GTGGAGCGAG	TTGTTCGTCC	TAAATGCCTC	GCAATGCTCC
2		L R L V W S E	L F V L N A S	Q C S		
		610	620	630	640	650
1	Cs-svp	ATGCCCTTC	ACGTCGCTCC	CCTCTTAGCG	GCCGCTGGTC	TCCACGCATC
2		M P L H V A P	L L A A A G	L H A S		
		660	670	680	690	700
1	Cs-svp	CCCAATGGCC	GCAGATAGAG	TGGTAGCTTT	TATGGACCAT	ATTAGAATCT
2		P M A A D R	V V A F M D H	I R I		

# Anhänge

1	Cs-svp	710	720	730	740	750
2		TCCAGGAACA	GGTGGAGAAA	CTAAAAGCAT	TGCAAGTTGA	TGCAGCAGAA
		F Q E Q	V E K	L K A	L Q V D	A A E
1	Cs-svp	760	770	780	790	800
2		TACAGCTGCC	TAAAAGCCAT	AGTTCTTTTC	ACAACTGACG	CTTGTGGTTT
		Y S C	L K A I	V L F	T T D	A C G L
1	Cs-svp	810	820	830	840	850
2		GTCAGACGTC	GCCCACATAG	AGAGCCTTCA	GGAAAAGTCC	CAGTGCGCC
		S D V	A H I	E S L Q	E K S	Q C A
1	Cs-svp	860	870	880	890	900
2		TGGAGGAGTA	CTGCAGGACG	CAGTACCCTA	ACCGGCCAC	CAGGTTTGGC
		L E E Y	C R T	Q Y P	N R P T	R F G
1	Cs-svp	910	920	930	940	950
2		AAGCTTCTCC	TGCGGCTGCC	TTCCCTGCGA	ACCGTGTCGT	CGCAAGTCAT
		K L L	L R L P	S L R	T V S	S Q V I
1	Cs-svp	960	970	980	990	1000
2		CGAACAACTG	TTCTTCGTGA	GACTGGTGGG	CAAGACGCC	ATAGAGACCC
		E Q L	F F V	R L V G	K T P	I E T
1	Cs-svp	1010	1020	1030	1040	1050
2		TAATTAGAGA	CATGCTTCTC	AGCGGGAGCT	CCTTCAACTG	GCCCTATATG
		L I R D	M L L	S G S	S F N W	P Y M
1	Cs-svp	1060	1070	1080	1090	1100
2		CCGCTGCAGT	GACCCTTGGG	CCCGGGGCC	ACGGACCTAG	TGGGGGCC
		P L Q	*			
1	Cs-svp	1110	1120	1130	1140	1150
2		CGACCAGAGA	CTGCTGTTAT	GCATGGCAGC	ACTGGCACCG	CAGAACGTGC
1	Cs-svp	1160	1170	1180	1190	1200
2		CCAAGAGGTA	GCAGTAGTAA	GCTGGTTGAA	ATGCTTGAAG	TGTGTACCTC
1	Cs-svp	1210	1220	1230	1240	1250
2		GAAGCGACAG	TGAAAGGACT	GTCGCGAAAA	TGCCGGCAAA	TAGCTTGCGC
1	Cs-svp	1260	1270	1280	1290	1300
2		AATCTGTCAA	ACACAGCTGA	GGCTGAAATG	TGTAAATTAT	TTGTTGAGTG
1	Cs-svp	1310	1320	1330	1340	1350
2		TCTCAGCTGT	TAAAATCAGT	GATACGTTAA	GCAAACGAAA	GAATATGTAA
1	Cs-svp	1360	1370	1380	1390	1400
2		CTGATTTAGT	TTCAAAATAA	ATTTATAGCC	AAGCTAAAAA	AAAAAAAAAA

# Anhänge

---

	1410	1420	1430	1440	1450
1 Cs-svp	AAAAAAAAAA	AAAAAA			
2					

# Anhänge

1	Cs-Egfr	GAATGTGTTG	CTCCAGACGC	CCAACTGCGT	GAAGATCACG	GACTTCGGCC
2		N V L	L Q T	P N C V	K I T	D F G
1	Cs-Egfr	TGGCCAAGCT	GCTAGACATC	GACGAGGAGG	AGTACAAGGC	CGCTGGAGGC
2		L A K L	L D I	D E E	E Y K A	A G G
1	Cs-Egfr	AAGATGCCCC	TCAAGTGGAT	GGCCCTCGAG	AGCATTCAGC	ACCGCATATT
2		K M P	L K W M	A L E	S I Q	H R I F
1	Cs-Egfr	CACCCACCGC	AGCGACGTCT	GGGCCTTCGG	CGTGACAATC	TGGGAGCTGC
2		T H R	S D V	W A F G	V T I	W E L
1	Cs-Egfr	TGACGTACGG	CCAGCGCCCC	TACGAGAACA	TCCCCGCCCG	TGAGGTGCCC
2		L T Y G	Q R P	Y E N	I P A R	E V P
1	Cs-Egfr	AGCCTGCTGG	AGAAAGGGGA	GCGGTTGCCG	CAGCCCCGCCA	TATGCACCAT
2		S L L	E K G E	R L P	Q P A	I C T I
1	Cs-Egfr	CGACGTGTAC	ATGATCATGA	TCAAGTGCTG	GATGCTGGAC	GCCGAGTCCC
2		D V Y	M I M	I K C W	M L D	A E S
1	Cs-Egfr	GTCCCCCGTT	CCGCGAGCTT	GCGGAAGAGT	TCGCAAAGAT	GTCCCGCGAC
2		R P P F	R E L	A E E	F A K M	S R D
1	Cs-Egfr	CCGGGGCGCT	ACCTGGTGAT	CCCTGGCGAC	CGACTCATGC	GACTGCCCAG
2		P G R	Y L V I	P G D	R L M	R L P S
1	Cs-Egfr	CTACACGCCG	CAGGACGAGA	GGGAGCTCAT	CCGGAACCTT	AGCCTGATCC
2		Y T P	Q D E	R E L I	R N L	S L I
1	Cs-Egfr	CAGGGGACGG	AACAGGGGTC	GTCATGGACG	CAGAGGAGTA	CCTGCAGCCG
2		P G D G	T G V	V M D	A E E Y	L Q P
1	Cs-Egfr	CACCCTCCCA	AAGAGAAATT	TCTGGAGGAC	CACGACTCGA	TGAACGGTGG
2		H P P	K E K F	L E D	H D S	M N G G
1	Cs-Egfr	CTCGTCGAAC	CTTTCGTCTG	AGCTGAACTC	GAACCAGGAC	GAGACGAAAG
2		S S N	L S S	E L N S	N Q D	E T K
1	Cs-Egfr	CCGAGGGCAT	GGACCACCTG	TGCCGAGCCA	GGGACACCAG	CCTCAGCACG
2		A E G M	D H L	C R A	R D T S	L S T

# Anhänge

1	Cs-Egfr	710	720	730	740	750
2		CGCTACTGCT	GTGACCCCCT	ACACCCGGAC	AACGGTGTGT	CCGCCCGGGA
		R Y C C D P L	H P D N G V	S A R E		
1	Cs-Egfr	760	770	780	790	800
2		GCCCCCTCT	CCGGCCAAGG	ACATGCCCTT	GCAGGTGGAC	GAAGAGGACT
		P P S P A K	D M P L Q V D	E E D		
1	Cs-Egfr	810	820	830	840	850
2		ACCTGGTACC	CTCGCCGCAC	GCTTGCCACC	CCGCCAATA	CATGGACCTA
		Y L V P S P H	A C H P A N Y	M D L		
1	Cs-Egfr	860	870	880	890	900
2		GTGCCGGACG	CAACAGGCTA	CCCTTTCGGC	ATCCCTCTGT	CCAGCCTGCA
		V P D A T G Y	P F G I P L	S S L Q		
1	Cs-Egfr	910	920	930	940	950
2		GGCCGTCGAC	AACCTAGAGT	ACCACCTGGT	GAAGCCGGAC	GGTCCGGCAC
		A V D N L E Y	H L V K P D	G P A		
1	Cs-Egfr	960	970	980	990	1000
2		GGGAAGACGA	CCCGGACGAG	CACGAGTACT	ACAACGACAT	CCACCAGAGG
		R E D D P D E	H E Y Y N D I	H Q R		
1	Cs-Egfr	1010	1020	1030	1040	1050
2		GAGTTGCAGC	CGCTCAACCA	CAGGACAGAG	ACAACCGTGT	GAGGACAATC
		E L Q P L N H	R T E T T V	*		
1	Cs-Egfr	1060	1070	1080	1090	1100
2		GACGCGTACA	AAACGATCAC	ATTCCATTGG	TGTGCCCCGT	TTATACATAT
1	Cs-Egfr	1110	1120	1130	1140	1150
2		ACATATACAT	ATGCCATATT	TATGCCACTC	AAGAGTTCGA	ACTTAAAGAG
1	Cs-Egfr	1160	1170	1180	1190	1200
2		AGACAGAACG	GCTCAAGAGA	GTGTTTGTAC	AGTTGTGTAA	AGATGACGCG
1	Cs-Egfr	1210	1220	1230	1240	1250
2		GTTCTTCATG	TGTACATATT	ACCCATCGAC	CCTCCTTTTT	TTTTTTACGA
1	Cs-Egfr	1260	1270	1280	1290	1300
2		GAGTTATTCT	ATTTTTTTAC	GTACAGTGCT	GTTACAGTGG	ATGAATGTAC
1	Cs-Egfr	1310	1320	1330	1340	1350
2		AGTTCGTTTT	ATTTTTTTGTA	CATAAGTCAA	TAAAACAGAA	TGGATTCAAA
1	Cs-Egfr	1360	1370	1380	1390	1400
2		AAAAAAAAAA	AAAAAAAAAA	AA		

### Anhang 3: Tabellarische Auswertungen der RNAi-Versuche

Der folgende Anhang enthält tabellarische Übersichten über die Ergebnisse der RNAi-Versuche in folgender Reihenfolge: *Cs-svp*, *Cs-Egfr*, *Cs-N*, *Cs-Ser*, und *Cs-AP-2*.

In jeder Tabelle enthält die erste Reihe („Kontrolle“) die Daten zu den Kontrollembryonen. Diese wurden nicht mit dsRNA behandelt, sondern zum Teil gar nicht injiziert und zum Teil mit Wasser injiziert. Die zweite Reihe („RNAi“) enthält die Daten zu den Injektionen mit dsRNA.

In jeder Tabelle zeigt die erste Spalte („Gesamt“) die Gesamtanzahl der ausgewerteten Embryonen. Die zweite Spalte („Schwere Defekte“) zeigt die Anzahl von Embryonen, die einen Phänotyp zeigen, der nicht als Phänokopie des untersuchten Gens gewertet werden kann. Hierbei handelt es sich um Embryonen, die abgestorben sind oder schwere Entwicklungsverzögerungen zeigen. Ebenfalls hierher gehören Embryos mit schweren Schäden am Kopf oder Hinterende und alle Embryos, die nicht die für jedes Gen spezifischen Kriterien erfüllten (siehe nachfolgend). Die dritte Spalte („Keine Defekte“) zeigt die Anzahl normal entwickelter Embryonen. Die vierte Spalte („Phänokopien“) schließlich zeigt die Anzahl als spezifische Phänokopien eingestufte Embryonen. Die Kriterien hierzu waren wie folgt:

- Für *Cs-svp*: verkürzte Beine; Keimstreif in voller Länge vorhanden; Umrollung mußte bereits begonnen haben; leichte Kopf- und Segmentierungsdefekte waren auf Grund des Expressionsmusters erlaubt.
- Für *Cs-Egfr*: verkürzte Beine; Umrollung und Segmente mußten weitgehend normal erscheinen; Defekte in der Entwicklung des Neuroektoderms waren auf Grund des Expressionsmusters erlaubt.
- Für *Cs-N*: verkürzte Beine; Segmentierung und Umrollung mußten weitgehend normal erscheinen; Neuroektoderm des Prosomas mußte desorganisiert erscheinen (desorganisierte Invaginationstellen in der DAPI-Ansicht erkennbar). Als schwere Phänokopien wurden noch zugelassen: Embryos mit gestörter Segmentierung und nahezu fehlender Umrollung, wenn sie stark verkürzte Beine aufwiesen.
- Für *Cs-Ser*: verkürzte Beine; Segmentierung und Umrollung mußten weitgehend normal erscheinen. Leichte Segmentierungsdefekte waren auf Grund des Expressionsmusters erlaubt.
- Für *Cs-AP-2*: verkürzte Beine; Keimstreif mußte ansonsten normal erscheinen; Verkleinerte Kopflappen waren auf Grund des Expressionsmusters zugelassen.



Tabelle 1: Auswertung der RNAi gegen *Cs-svp*

	Gesamt	Schwere Defekte	Keine Defekte	Phänokopien
Kontrolle	97 (100%)	38 (39,2%)	59 (60,8%)	0 (0%)
<i>Cs-svp</i> RNAi	341 (100%)	163 (47,8%)	23 (6,7%)	155 (45,5%)

Tabelle 2: Auswertung der RNAi gegen *Cs-Egfr*

	Gesamt	Schwere Defekte	Keine Defekte	Phänokopien
Kontrolle	103 (100%)	43 (41,7%)	60 (58,3%)	0 (0%)
<i>Cs-Egfr</i> RNAi	264 (100%)	143 (54,2%)	18 (6,8%)	103 (39,0%)

Tabelle 3: Auswertung der RNAi gegen *Cs-N*

	Gesamt	Schwere Defekte	Keine Defekte	Phänokopien
Kontrolle	115 (100%)	56 (48,7%)	59 (51,3%)	0 (0%)
<i>Cs-N</i> RNAi	362 (100%)	189 (52,2%)	23 (6,4%)	150 (41,4%)

Tabelle 4: Auswertung der RNAi gegen *Cs-Ser*

	Gesamt	Schwere Defekte	Keine Defekte	Phänokopien
Kontrolle	76 (100%)	37 (48,7%)	39 (51,3%)	0 (0%)
<i>Cs-Ser</i> RNAi	186 (100%)	90 (48,4%)	27 (14,5%)	69 (37,1%)

Tabelle 5: Auswertung der RNAi gegen *Cs-AP-2*

	Gesamt	Schwere Defekte	Keine Defekte	Phänokopien
Kontrolle	99 (100%)	42 (42,4%)	57 (57,6%)	0 (0%)
<i>Cs-AP-2</i> RNAi	229 (100%)	111 (48,5%)	75 (32,8%)	43 (18,8%)



## ***Erklärung***

Ich versichere, daß ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit- einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen- die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; daß diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; daß sie- abgesehen von den unten angegebenen Teilpublikationen- noch nicht veröffentlicht worden ist; sowie, daß ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluß des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde.

Die Bestimmungen dieser Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Herrn Prof. Dr. Diethard Tautz betreut worden.

Köln, den 29. März 2004

Nikola-Michael Prpic

Teilpublikationen:

Prpic N.M., Damen W.G.M. (2004). Expression patterns of leg genes in the mouthparts of the spider *Cupiennius salei* (Chelicerata: Arachnida). *Development Genes and Evolution* (im Druck).

Prpic N.M., Janssen R., Wigand B., Klingler M., Damen W.G.M. (2003). Gene expression in spider appendages reveals reversal of *exd/hth* spatial specificity, altered leg gap gene dynamics, and suggests divergent distal morphogen signaling. *Developmental Biology* 264, 119-140.

Prpic N.M., 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. *Developmental Biology* 260, 97-112.

## *Lebenslauf*

Name	Nikola-Michael Prpic
Geburtsdatum/-ort	13.07.1973 in München
Eltern	Rosemarie Prpic-Landgraf und Milan Prpic
Staatsangehörigkeit	deutsch
Familienstand	ledig

1980 - 1984	Grundschule in Neuried (bei München)
1984 - 1993	Gymnasium "Feodor Lynen" in Planegg (bei München)
1993	Abitur mit den Hauptfächern Biologie, Englisch und den Nebenfächern Physik, Erdkunde; Facharbeit mit dem Thema: "Die Bestimmung der Schmetterlingsarten des Schulgartens"
Juli 1993	Erlangung der Allgemeinen Hochschulreife am Feodor-Lynen-Gymnasium, Planegg
1993 - 2000	Studium der Biologie an der Ludwig-Maximilians-Universität, München
1996	Vordiplom
1999 - 2000	Diplom in den Fächern Zoologie (Hauptfach), Systematische Botanik, Anthropologie und Humangenetik, Paläontologie und Historische Geologie (Nebenfächer, letzteres extern am Institut für Paläontologie und Historische Geologie, München (Fakultät für Geowissenschaften)) Diplomarbeit mit dem Thema: "Molekularbiologische Untersuchungen zur Embryonalentwicklung der prosomalen Extremitäten bei der Spinne <i>Cupiennius salei</i> (Keyserling), 1877 (Arachnida, Araneae, Ctenidae)"
Januar 2000	Erlangung des akademischen Grades "Dipl.-Biol. Univ." an der Fakultät für Biologie der Ludwig-Maximilians-Universität, München

Januar - Mai 2000	Forschungsaufenthalt am Zoologischen Institut, München
ab März 2000	Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Genetik, Köln
Mai - Juni 2000	Teilnahme am TMR Kurs "Evolutionary Developmental Biology", an der Meeresbiologischen Station in Roscoff, Frankreich
seit August 2000	Doktorarbeit an der Universität zu Köln

## ***Vollständiges Publikationsverzeichnis***

### ***Originalarbeiten***

**Prpic N.M.,** Damen W.G.M. (2004). Expression patterns of leg genes in the mouthparts of the spider *Cupiennius salei* (Chelicerata: Arachnida). *Development Genes and Evolution* (im Druck).

Janssen R., **Prpic N.M.,** Damen W.G.M. (2004). Gene expression suggests decoupled dorsal and ventral segmentation in the millipede *Glomeris marginata* (Myriapoda: Diplopoda). *Developmental Biology* 268, 89-104.

**Prpic N.M.,** Janssen R., Wigand B., Klingler M., Damen W.G.M. (2003). Gene expression in spider appendages reveals reversal of *exd/hth* spatial specificity, altered leg gap gene dynamics, and suggests divergent distal morphogen signaling. *Developmental Biology* 264, 119-140.

**Prpic N.M.,** 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. *Developmental Biology* 260, 97-112.

**Prpic N.M.,** Wigand B., Damen W.G.M., Klingler M. (2001). Expression of *dachshund* in wild-type and *Distal-less* mutant *Tribolium* corroborates serial homologies in insect appendages. *Development Genes and Evolution* 211, 467-477.

**Prpic N.M.** (2001). A new species of *Loxosoma* from north-western Finistère, France (Spiralia, Kamptozoa (= Entoprocta), Solitaria, Loxosomatidae). *Spixiana* 24, 97-102.

**Prpic N.M.** (2000). Re-discovered type material of *Pyrameis ida* Alfken, 1899 (Lepidoptera, Nymphalidae). *New Zealand Entomologist* 23, 87-88.

**Prpic N.M.** (1999). *Vanessa braziliensis* Moore, 1838: Faunal Element of the Canary Islands? (Lepidoptera, Nymphalidae). *Nachrichtenblatt der bayerischen Entomologen* 48, 109-111.

### ***Akademische Abhandlungen***

**Prpic N.M.** (2000). Molekularbiologische Untersuchungen zur Embryonalentwicklung der prosomalen Extremitäten bei der Spinne *Cupiennius salei* (Keyserling), 1877 (Arachnida, Araneae, Ctenidae). Diplomarbeit, Fakultät für Biologie, Ludwig-Maximilians-Universität, München.

### ***Veröffentlichte Beiträge zu Symposien und Tagungen***

Damen W.G.M., Wigand B., Büttner G., **Prpic N.M.,** Tautz D., Klingler M. (2000). Genes involved in arthropod leg development. 41st Annual Drosophila Research Conference, Pittsburgh/USA. Tagungsband p. a188, Abstract 541C.

**Prpic N.M.,** Schoppmeier M., Damen W.G.M. (2001). Growth processes during arachnid appendage formation. 14. Wissenschaftliche Tagung der Gesellschaft für Entwicklungsbiologie, Ulm/Deutschland. Tagungsband p. 89.

**Prpic N.M.,** Scholten J.K., Wigand B., Damen W.G.M., Klingler M. (2001). Expression and regulation of *dachshund* in *Tribolium*. 8th Congress of the European Society for Evolutionary Biology, Aarhus/Dänemark. Tagungsband p. 223.

**Prpic N.M.,** Wigand B., Damen W.G.M. (2001). Evolution of arthropod appendage formation. 2nd Symposium "The Developmental Basis of Evolutionary Change", Chicago/USA. Tagungsband Abstract 19A.

Tautz D., Damen W.G.M., **Prpic N.M.,** Stollewerk A. (2003). Phylogenetic relationships among arthropods - the molecular and developmental view. 96. Jahrestagung der Deutschen Zoologischen Gesellschaft als gemeinsame Tagung mit der Deutschen Gesellschaft für Parasitologie, Berlin/Deutschland. Tagungsband p. 66, Abstract V-S1.3.