

Aus dem Bereich Entwicklungsbiologie  
Theoretische Medizin und Biowissenschaften  
der Medizinischen Fakultät  
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

**Funktionelle Analyse des Homeoboxgens *orthopedia* in der  
Enddarm- und Nervensystementwicklung von  
*Drosophila melanogaster***

*Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Naturwissenschaften*  
**der Medizinischen Fakultät**  
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2011

vorgelegt von Nicole Michaela Bach  
geboren am 30. November 1980 in Homburg



**Abkürzungsverzeichnis**

A	Adenin
Abb.	Abbildung
Abk.	Abkürzung
ad.	auffüllen auf...mit...
AK	Antikörper
AMP	Adenosinmonophosphat
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BAC	Bacterial Artificial Chromosome
BCIP	5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat
β-Gal	Beta-Galaktosidase
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
bzgl.	bezüglich
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
ca.	circa
CaCl <sub>2</sub>	Calciumchlorid
cDNA	komplementäre DANN
cm	Zentimeter
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
Cre	cyclisches AMP-Response Element
C-Terminus	Carboxyterminus (Protein)
CyO	Curly of Oster (nach oben gebogene Flügel)
CxD	Crossover Suppressor Dichaete (gespreizte Flügel)
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
dATP	Didesoxyadenosintriphosphat
dCTP	Didesoxycytosintriphosphat
dGTP	Didesoxyguanosintriphosphat
d.h.	das heißt
DIC	Differentieller Interphasenkontrast, Nomarski-Kontrast
Dig	Digoxigenin
dMP2	dorsal Midline Precursor 2
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DSHB	Developmental Studies Hybridoma Bank
dTTP	Didesoxythymidintriphosphat
dUTP	desoxy Uraciltriphosphat

<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglycol-bis( $\beta$ -aminoethylether)N, N, N', N'-Tetraessigsäure
EMS	Ethylmethansulfonat
et al.	<i>et alii/aliae</i> (lat.: und andere)
F <sub>1</sub>	1. Filialgeneration
Flp	Flipase
fmol	femtomol
FRT	Flp Rekombinase Target
g (Normwert)	Erdbeschleunigung ( $g = 9.80665 \text{ m/s}^2$ )
g	Gramm
G	Guanin
G <sub>0</sub>	Generation
GFP	Green fluorescent protein
h	Stunde(n)
HCl	Salzsäure
H <sub>2</sub> O	Wasser
hs	Hitzeschock
HybMix	Hybridisierungsmix
Ig	Immunglobulin
IRD	Infrared Dye
kb	Kilobasenpaare
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kaliumdihydrogenphosphat
l	Liter
lacZ	Beta-Galaktosidase-Gen
LB	Luria Bertani
LiCl	Lithiumchlorid
M	Molarität
$\mu\text{g}$	Mikrogramm
mg	Milligramm
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
MgSO <sub>4</sub>	Magnesiumsulfat
min	Minute
miRNA	microRNA
ml	Milliliter
$\mu\text{l}$	Mikroliter
$\mu\text{m}$	Mikrometer
mM	Millimolarität
MnCl <sub>2</sub>	Manganchlorid

MOPS	3-Morpholinopropansulfonsäure
MP2	Midline Precursor 2
mRNA	messengerRNA
Na	Natrium
NaCl	Natriumchlorid
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (2H <sub>2</sub> O)	di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (H <sub>2</sub> O)	Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat
NaOH	Natriumhydroxid
NBT	Nitroblau-Tetrazolium
NCBI	National Center for Biotechnology Information
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
N-terminal	aminoterminal (Protein)
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
<i>Pfu</i>	<i>Pyrococcus furiosus</i>
pg	Pikogramm
pH	Pondus hydrogenii; pH = -log c(H <sub>3</sub> O <sup>+</sup> )
PIPES	Piperazin-N,N'-bis(2-ethansulfonsäure)
RbCl <sub>2</sub>	Rubidiumchlorid
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA-Interferenz
RNase	Ribonuklease
rpm	revolutions per minute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
Sb	Stubble (kurze Borsten)
Sco	Scutoid (fehlende Borsten)
SDS	Sodiumdodecylsulfat
Ser	Serrate (gekerbte Flügel)
Sp	Sternopleural
SSC	Standard-Saline-Citrat-Puffer
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetic Acid (Essigsäure)-EDTA
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tertramethylethylendiamin
TNB	Tris-NaCl-Blockingpuffer
Tris	α,α,α-Tris-(hydroxymethyl)-methylamin

TritonX-100	Alkylphenylpolyethylenglykol
tRNA	Transfer-RNA
Tween20	Polyoxyethylen-20-sorbitanmonolaurat
U	Unit(s) (Enzymeinheit)
u.a.	unter anderem
UAS	Upstream Activating Sequence
Ubx	Ultrabithorax (Halteren größer und runder als normal)
UTR	untranslatierte Region
UV	ultraviolettes Licht
V	Volt
vMP2	ventral Midline Precursor 2
VNS	ventrales Nervensystem
<i>w</i>	<i>white</i>
wt	Wildtyp
<i>yw</i>	<i>yellow white</i>
z.B.	zum Beispiel
ZNS	zentrales Nervensystem
~	ungefähr
%	Prozent
% v/v	Volumenprozent
% w/v	Gewichtsprozent
°C	Grad Celsius

**Inhaltsverzeichnis**

<b>1. Zusammenfassung</b>	<b>1</b>
1.1 Funktionelle Analyse des Homeoboxgens <i>orthopedia (otp)</i> in der Enddarm- und Nervensystementwicklung von <i>Drosophila melanogaster</i>	1
1.2 Functional analysis of the homeobox gene <i>orthopedia (otp)</i> in hindgut and nervous system development of <i>Drosophila melanogaster</i>	2
<b>2. Einleitung</b>	<b>4</b>
2.1 Die Fruchtfliege <i>Drosophila melanogaster</i> als Modellorganismus	4
2.2 Homeoboxgene	5
2.3. Das Homeoboxgen <i>orthopedia (otp)</i>	6
2.4 Die Enddarmentwicklung bei <i>Drosophila</i>	10
2.5 Die Nervensystementwicklung bei <i>Drosophila</i>	12
2.6 Zielsetzung der Arbeit	17
<b>3. Material und Methoden</b>	<b>18</b>
<b>3.1 Material</b>	<b>18</b>
3.1.1 Antikörper	18
3.1.1.1 Primäre Antikörper	18
3.1.1.2 Sekundäre Antikörper	18
3.1.2 Bakterienstämme	19
3.1.3 DNA-Klone	19
3.1.4 Fliegenstämme	20
3.1.5 Lösungen, Puffer und Medien	21
3.1.6 Oligonukleotide (Primer)	25
3.1.7 Vektoren	26
3.1.8 Kits	27
3.1.9 Geräte	28
3.1.10 Bezugsquellen	28
<b>3.2 Methoden</b>	<b>29</b>
3.2.1 Herstellung chemisch kompetenter Zellen (Rubidiumchlorid-Methode)	29
3.2.2 Restriktionsverdau	29
3.2.3 Elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten in Agarosegelen	30
3.2.4 DNA-Isolierung aus Agarosegelen	30
3.2.5 Dephosphorylierung mit rAPid Alkaline Phosphatase	30
3.2.6 Ligation	30

3.2.7 Transformation von Plasmid-DNA in chemisch kompetente Bakterienzellen	31
3.2.8 Klonierung mit dem TOPO <sup>®</sup> TA Cloning <sup>®</sup> Kit (Invitrogen)	31
3.2.9 Klonierung mit dem TOPO <sup>®</sup> XL PCR Cloning Kit (Invitrogen)	32
3.2.10 Klonierung mit dem pCR <sup>®</sup> 8/GW/TOPO <sup>®</sup> TA Cloning Kit (Invitrogen)	32
3.2.11 Klonierung mit Gateway <sup>®</sup> LR Clonase <sup>™</sup> II Enzym Mix	33
3.2.12 Plasmid-Isolierung mittels TENS-Miniprep (Alkalische Lyse)	34
3.2.13 Plasmid-Isolierung mittels peqGOLD Plasmid Miniprep Kit	34
3.2.14 Plasmid-Isolierung mittels QIAGEN Plasmid Midi Kit	35
3.2.15 Plasmid-Isolierung großer DNA-Fragmente mittels QIAGEN Large Construct Kit	35
3.2.16 Isolierung genomischer DNA aus Fliegen	35
3.2.17 Polymerasekettenreaktion (PCR)	35
3.2.18 Sequenzierung von DNA	36
3.2.19 Herstellung einer Digoxigenin-markierten Sonde	37
3.2.20 Kontrolle der Sonden (Dot Blot)	38
3.2.21 Antikörperfärbungen an <i>Drosophila</i> Embryonen	38
3.2.22 Whole Mount <i>in situ</i> Hybridisierung an <i>Drosophila</i> Embryonen	39
3.2.23 <i>In situ</i> Hybridisierung an larvalen Gehirnen	40
3.2.24 Antikörperfärbungen an larvalen Gehirnen	41
3.2.25 Antikörperfärbungen an larvalem Enddarm	41
3.2.26 Kernfärbungen mit DAPI (4',6-Diamidin-2-Phenylindol)	42
3.2.27 Kutikulapräparation	42
3.2.28 Fliegenzucht	42
3.2.29 Absammeln von virginellen Weibchen (Jungfrauen) für Kreuzungen	43
3.2.30 P-Element-basierte Keimbahntransformation bei <i>Drosophila melanogaster</i>	43
3.2.31 Keimbahntransformation bei <i>Drosophila melanogaster</i> über PhiC31 Integrase	44
3.2.32 Durchführung Keimbahntransformation	45
3.2.32.1 Injektionsmaterial	45
3.2.32.2 Absammeln, Dechorionieren und Aufreihen von Embryonen	45
3.2.32.3 Injektion	45
3.2.32.4 Behandlung injizierter Embryonen	46
3.2.32.5 Selektion von Transformanten	46
3.2.32.6 Balancierung transgener Fliegen	46
3.2.33 Jump-Start von P-Elementen	48
3.2.34 „Ends-Out Gene Targeting“: Mobilisierung eines Donor-Konstrukts	48

3.2.35 MARCM-Analysen	50
3.2.36 Lichtmikroskopie	52
3.2.37 Dekonvolution	52
3.2.38 Konfokale Mikroskopie	52
<b>4. Ergebnisse</b>	<b>53</b>
4.1 Das embryonale Expressionsmuster des Homeoboxgens <i>orthopedia (otp)</i>	53
4.1.1 Gewebespezifische Expression der beiden <i>otp</i> -mRNA-Transkripte	53
4.1.2 Das embryonale Otp-Proteinexpressionsmuster	56
4.1.2.1 Co-Lokalisation von Otp und Brachyenteron im embryonalen Enddarm	56
4.1.2.2 Otp-Expression im ventralen Nervensystem	58
4.1.2.3 Otp-Expression im embryonalen Gehirn	61
4.2 Analyse des Enddarmphänotyps der Stämme 1024 und 13064	63
4.2.1 Verlust der Otp-Proteinexpression in den Stämmen 1024 und 13064	64
4.2.2 Bestimmung der Enddarmlänge der Stämme 1024 und 13064	65
4.2.3 Rettung des Enddarmphänotyps der Stämme 1024 und 13064	66
4.2.4 Bestimmung des Enddarmphänotyps der <i>otp</i> -Mutanten durch Färbungen mit Enddarmmarkern	68
4.2.5 Ursache des Enddarmphänotyps der <i>otp</i> -Mutanten	72
4.3 Erzeugung einer <i>otp</i> -Mutante durch „Ends-Out Gene Targeting“	74
4.3.1 Mobilisierung des pW25/otpI+II Targeting Konstrukts	75
4.3.2 Verifizierung der <i>otp</i> -Mutante mittels PCR	75
4.3.3 Komplementationsanalysen des Stamms <i>otp</i> <sup>GT3/1</sup>	77
4.3.4 Bestimmung der Letalität von <i>otp</i> <sup>GT3/1</sup>	78
4.4 <i>In vivo</i> Analyse der Enddarmentwicklung bei <i>Drosophila</i>	79
4.5 Expression von Otp im larvalen Enddarm	82
4.6 Screen zur Identifizierung von Enddarmmutanten	84
4.7 Das Expressionsmuster von <i>otp</i> im larvalen Gehirn	90
4.7.1 <i>otp</i> -mRNA-Expression im larvalen Gehirn	90
4.7.2 Otp-Proteinexpression im larvalen Gehirn	91
4.8 Reportergerneanalysen zur Identifizierung regulatorischer Elemente von <i>otp</i>	94
4.9 MARCM-Analysen	105
4.10 Identifizierung und Analyse weiterer Mutanten der 57B-Region	107
4.10.1 Komplementationsanalysen der Stämme 3311 und 7272	108
4.10.2 Identifizierung der Punktmutation der Mutante <i>Pros29</i> <sup>3311</sup>	109

4.10.3 Identifizierung der Punktmutation der Mutante CG34115 <sup>7272</sup>	111
4.10.4 Letalitätsanalysen der Mutanten <i>Pros29</i> <sup>3311</sup> und CG34115 <sup>7272</sup>	114
4.10.5 Das Embryonale Expressionsmuster von CG34115	116
<b>5. Diskussion</b>	<b>119</b>
5.1 Unterschiede zwischen dem Expressionsmuster von <i>otp</i> und <i>byn</i> im Enddarm	119
5.2 Enddarmphänotyp der <i>otp</i> -Mutanten im Vergleich zu anderen Enddarmmutanten	121
5.3 Mögliche Funktion von <i>otp</i> im larvalen und adulten Enddarm	121
5.4 Erhöhte Letalitätsraten der „Gene Targeting“ Mutanten <i>otp</i> <sup>GT3/1</sup>	122
5.5 Mögliche Ursachen des Unterschiedes zwischen der <i>otp</i> -mRNA und der Otp-Proteinexpression im ventralen Nervensystem	124
5.6 Keine morphologischen Veränderungen im Nervensystem der <i>otp</i> -Mutanten	126
5.7 Neu identifizierte regulatorische Elemente im Bereich des <i>otp</i> -Gens	128
5.8 Otp-Expression im larvalen Gehirn	131
5.9 Nicht-EMS-typische Punktmutation der Mutanten <i>Pros29</i> <sup>3311</sup> und CG34115 <sup>7272</sup>	132
5.10 Auswirkungen der Punktmutationen der Mutanten <i>Pros29</i> <sup>3311</sup> und CG34115 <sup>7272</sup>	133
5.11 Möglicher Phänotyp der Mutanten CG34115 <sup>7272</sup> und <i>Pros29</i> <sup>3311</sup>	134
5.12 Ausblick	135
<b>6. Literaturverzeichnis</b>	<b>136</b>
<b>7. Anhang</b>	<b>153</b>
<b>8. Publikationen</b>	<b>161</b>
<b>9. Danksagung</b>	<b>162</b>
<b>10. Lebenslauf</b>	<b>163</b>

## 1. Zusammenfassung

### 1.1 Funktionelle Analyse des Homeoboxgen *orthopedia (otp)* in der Enddarm- und Nervensystementwicklung von *Drosophila melanogaster*

Das Homeoboxgen *orthopedia (otp)* von *Drosophila* liegt zusammen mit dem *Drosophila retinalen Homeoboxgen (drx)* und *homeobrain (hbn)* in einem Cluster aus Homeoboxgenen in der 57B Region auf dem rechten Arm des 2.Chromosoms. *Otp* wird im Enddarmprimordium, im Enddarm, im ventralen Nervensystem und im Gehirn des *Drosophila* Embryos exprimiert. In dieser Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass die beiden *otp*-mRNA Transkripte gewebespezifisch exprimiert werden. Während das kürzere 2.3kb Transkript ausschließlich im sich entwickelnden Enddarm exprimiert wird, ist die Expression des längeren 2.9kb Transkripts auf das Nervensystem beschränkt. Durch genauere Analyse des Expressionsmustern im Enddarm konnte nachgewiesen werden, dass *otp* im „large intestine“, im Rektum und in den Analpatten, aber nicht im „small intestine“ exprimiert wird. Im ventralen Nervensystem unterscheidet sich die *otp*-mRNA-Expression von der Otp-Proteinexpression. Während die mRNA entlang des gesamten Nervensystems exprimiert wird, wird das Protein nur in den Thorakal- und den ersten beiden Abdominal-Segmenten exprimiert. Durch Co-Lokalisationsstudien konnte nachgewiesen werden, dass Otp im embryonalen Nervensystem ausschließlich in Neuronen exprimiert wird.

Um die Funktion von *otp* zu untersuchen, wurde die *otp*-Mutante *otp*<sup>GT3/1</sup> mit Hilfe von „Ends-Out Gene Targeting“ erzeugt. Zusätzlich dazu wurden die beiden EMS-Mutanten *otp*<sup>1024</sup> und *otp*<sup>13064</sup> aus einem vorangegangenen EMS-Mutagenese-Screen der 57B Region analysiert. Alle drei Allele sind embryonal letal und zeigen einen starken Enddarmphänotyp. Die Enddarmlänge ist auf ~25% der wildtypischen Länge reduziert. Mit Hilfe von Färbungen mit verschiedenen Enddarmmarkern konnte nachgewiesen werden, dass sich in den *otp*-Mutanten das „small intestine“ und das Rektum weitgehend normal entwickeln, während das „large intestine“ fast komplett fehlt. Die Analpatten sind reduziert und de-lokalisiert. Als Ursache des Enddarmphänotyps konnte Apoptose im Enddarmprimordium und im sich entwickelnden Enddarm nachgewiesen werden. Der Enddarmphänotyp kann durch eine Enddarm-spezifische Expression eines *otp*-Minigens gerettet werden.

Neben der Expression im embryonalen Enddarm wird *otp* auch im larvalen und adulten Enddarm exprimiert. Im larvalen Gehirn konnte eine *otp*-Expression in mehreren Clustern im zentralen Gehirn und im Ventralganglion nachgewiesen werden. Während *otp* im zentralen Gehirn ausschließlich in sekundären Neuronen exprimiert wird, konnte in den Thorakal-

Segmenten des Ventralganglions eine Expression von *otp* in primären und sekundären Neuronen nachgewiesen werden.

Um regulatorische Elemente von *otp* zu identifizieren, wurden Reporter-gen-Analysen durchgeführt. Dabei konnte im gesamten Intronbereich nur ein regulatorisches Element von *otp* nachgewiesen werden, welches eine Reporter-genexpression im ventralen Nervensystem des Embryos und im larvalen Gehirn induziert. In 5'-Bereich von *otp* konnten drei *otp*-spezifische regulatorische Elemente identifiziert werden, von denen jedes die Expression von *otp* in spezifischen Clustern des larvalen Gehirns reguliert.

Mittel MARCM- (mosaic analysis with a repressible cell marker) Analysen konnte eine erste Zuordnung der Expression von *otp* im larvalen Gehirn zu spezifischen Lineages erfolgen.

Neben der Analyse von *otp* wurden noch zwei weitere Gene der 57B Region untersucht. So konnte nachgewiesen werden, dass es sich bei der EMS-Mutante 7272 um ein Allel des Gens CG35114 handelt. Das Allel CG34114<sup>7272</sup> ist embryonal letal und es konnte eine Punktmutation im Startcodon nachgewiesen werden. Bei der EMS-Mutante 3311 handelt es sich um ein *Pros29*-Allel, diese zeigt eine teilweise embryonale Letalität. In der Spleiß-Donorstelle des ersten Introns konnte eine Punktmutation nachgewiesen werden.

## **1.2 Functional analysis of the homeobox gene *orthopedia* (*otp*) in hindgut and nervous system development of *Drosophila melanogaster***

The *Drosophila* homeobox gene *orthopedia* (*otp*) is localized in a cluster of homeobox genes in the 57B region on the right arm of the second chromosome together with *Drosophila* retinal homeobox gene (*drx*) and *homeobrain* (*hbn*). *Otp* is expressed in the hindgut primordium, hindgut, ventral nerve cord and brain of the *Drosophila* embryo.

In this work, it is shown that the two different *otp*-mRNA transcripts are expressed tissue specifically, with the shorter 2.3kb transcript being exclusively expressed in the developing hindgut and the larger 2.9kb transcript being restricted to the nervous system. Analyzing the hindgut expression pattern in detail it could be demonstrated that *otp* is expressed in the large intestine, rectum and anal pads but not in the small intestine. In the ventral nerve cord *otp*-mRNA expression differs from *Otp*-protein expression with *Otp*-protein only being expressed in the thoracic and first two abdominal segments. Colocalization studies revealed that *Otp*-expression in the embryonic nervous system is restricted to neurons.

To analyze the function of *otp* the mutant *otp*-allele *otp*<sup>GT3/1</sup> was generated by ends-out gene targeting. In addition two EMS-induced alleles - *otp*<sup>1024</sup> and *otp*<sup>13064</sup> - isolated in a previous genetic screen for mutants of the 57B region were analyzed. All three *otp*-alleles show

embryonic lethality with a severe hindgut phenotype. The hindgut length is reduced to ~25% of wildtype length. Stainings with different hindgut markers showed that the small intestine and rectum develop quite normal in *otp*-mutants, whereas the large intestine is nearly completely missing. The anal pads are reduced and delocalized. This phenotype is due to apoptosis in the hindgut primordium and developing hindgut and can be rescued by hindgut/anal pad-specific expression of an *otp*-minigene.

Besides from being expressed in the embryonic hindgut, *otp* is expressed in the larval and adult hindgut as well. In the larval brain, *otp*-expression can be detected in several cell clusters in the central brain and ventral ganglia. Whereas *otp* is only expressed in secondary neurons in the central brain, *otp* can be detected in primary and secondary neurons in the thoracic segments of the ventral ganglia.

In order to identify enhancer elements of the *otp* gene, reporter gene analyses were performed. In the intronic region of *otp*, only one *otp*-specific enhancer element driving *otp*-expression in the embryonic ventral nerve cord and larval brain could be detected. In the 5' region of *otp*, three *otp*-specific enhancer elements could be identified, each of them driving the expression of *otp* in different cell clusters of the larval brain.

MARCM (mosaic analysis with a repressible cell marker) analysis were carried out in order to assign *otp*-expressing neurons to specific lineages in the larval brain.

Besides the analysis of the *otp* gene, two other genes of the 57B region were analyzed. It could be demonstrated that the EMS-induced mutant 7272 is an allele of the CG34115 gene. The CG34115<sup>7272</sup> allele shows embryonic lethality and a point mutation in the start codon could be molecularly verified. The EMS-induced mutant 3311 is a *Pros29* allele, showing partial embryonic lethality. Here a point mutation in the splice donor site of the first intron could be detected.

## 2. Einleitung

### 2.1 Die Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* als Modellorganismus

Die Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* wurde bereits 1910 von Thomas Hunt Morgan in die genetische Forschung eingeführt und war somit einer der ersten Organismen, der für genetische Analysen verwendet wurde. Heute zählt *Drosophila* zu den am besten erforschten Entwicklungssystemen.

*Drosophila* besitzt eine Reihe von Vorteilen, die sie zu einem guten Modellorganismus macht. Die Fruchtfliege ist klein und kann daher einfach und kostengünstig in großer Anzahl im Labor gehalten werden. *Drosophila* hat eine kurze Generationszeit (etwa 10-12 Tage bei 24°C) und eine hohe Fertilität (ein Weibchen legt bis zu 100 Eier pro Tag), so dass in relativ kurzer Zeit mehrere Generationen und viele Nachkommen untersucht werden können. Sie besitzt nur 4 Chromosomenpaare - drei Autosomen (diese werden als 2.-4.Chromosompaar bezeichnet, wobei das 4.Chromosom so klein ist, dass es oft vernachlässigt wird) und ein Geschlechtschromosomenpaar (XX bzw. XY; das X-Chromosom wird auch als 1.Chromosom bezeichnet). Es stehen sogenannte Balancerchromosomen mit sichtbaren genetischen Markern zur Verfügung, die es ermöglichen, letale Allele in einem heterozygoten Zustand stabil zu halten. Das Genom ist komplett sequenziert (Adams et al., 2000), es besteht aus 165 Millionen Basenpaaren und enthält ~13700 Gene, die etwa 20% des Genoms ausmachen. Viele Gene sind hochkonserviert, so konnten z.B. zu ~75% aller menschlichen Krankheitsgene homologe Sequenzen bei *Drosophila* identifiziert werden (Bier et al., 2005). Außerdem stehen viele Mutanten zur Verfügung und es wurde eine Vielzahl von Methoden zur genetischen Manipulation entwickelt.

Die Embryonalentwicklung von *Drosophila* dauert nur etwa 24 Stunden und wird in 17 Stadien unterteilt (Campos-Ortega und Hartenstein, 1997). Die Entwicklung beginnt mit dem Eindringen des Spermiums durch die Mikrophyle in das anteriore Ende des Eis. Nach Verschmelzung der Zellkerne folgen eine Reihe schneller mitotischer Teilungen, dabei handelt es sich um Kernteilungen, ohne dass sich das Zytoplasma teilt. Es bildet sich ein Synzytium, in dem sich viele Zellkerne ein Zytoplasma teilen. Nach 9 Teilungen wandern die Zellkerne an die Peripherie und bilden im Stadium 4 das synzytiale Blastoderm. Während der Entwicklungsstadien 1-4 können Proteine aufgrund des Synzytiums frei im kompletten Embryo diffundieren. Am posterioren Ende des Embryos bilden sich die Polzellen, die späteren Keimzellen. Von der Oberfläche werden Membranen eingezogen und es bildet sich im Stadium 5 das zelluläre Blastoderm. Die Gastrulation beginnt im Stadium 6 mit der

Einstülpung des zukünftigen Mesoderms in der Bauchregion, wodurch es zur Bildung der sogenannten Ventralfurche kommt. Außerdem bildet sich zeitgleich die Kopffurche. Ab Stadium 9 delaminieren die Neuroblasten vom Ektoderm. Während der Gastrulation breitet sich der Keimstreif, der aus dem invaginierten Mesoderm und dem darüber liegenden Ektoderm besteht, aus. Ab Stadium 10/11 sind die ersten Anzeichen der Segmentierung zu erkennen und es können 14 Parasegmente unterschieden werden: drei, die an der Bildung von Kopfstrukturen beteiligt sind, drei Thorax- und acht Abdominal-Segmente. Ab Stadium 12 zieht sich der Keimstreif wieder zurück. Nach Abschluss der Organogenese füllen sich im Stadium 17 die Tracheen mit Luft.

Die Larve schlüpft nach 24 Stunden, sie häutet sich zweimal und durchläuft somit drei sogenannte Larvalstadien. Nach Ende des dritten Larvalstadiums verpuppt sich die Larve und durchläuft eine Metamorphose. Die Organe und Gliedmaße der adulten Fliege sind bereits in der Larve in Form von Imaginalscheiben vorhanden. Nach etwa 10-12 Tagen (bei 24°C) schlüpft die adulte Fliege.

## 2.2 Homeoboxgene

Transkriptionsfaktoren (TFs) (auch trans-Elemente) sind Proteine, die an spezifischen DNA-Sequenzen binden und dadurch die Transkription regulieren. Nach der Struktur der DNA-Bindedomäne unterscheidet man z.B. basische Helix-Loop-Helix-TFs, basische Leucin-Zipper-TFs und Homeodomänenproteine.

Als Homeodomänenproteine bezeichnet man eine Familie von Transkriptionsfaktoren, die durch eine 60 Aminosäure lange DNA-Bindedomäne, die sogenannte Homeodomäne charakterisiert werden. Die Homeodomäne wurde erstmals bei Proteinen entdeckt, die bei *Drosophila* homeotische Transformationen hervorrufen (McGinnis et al., 1984). Unter homeotischen Transformationen versteht man die Transformation eines ganzen Segments oder einer ganzen Struktur in eine andere verwandte Struktur, wie z.B. die Umwandlung einer Antenne in ein Bein bei einer dominanten *Antennapedia*-Mutation. Die homeotischen Gene bilden bei *Drosophila* zwei Komplexe, den fünf Gene umfassenden *Antennapedia*-Komplex und den drei Gene umfassenden *Bithorax*-Komplex (Lewis et al., 1978; Kaufmann et al., 1980). In beiden Komplexen stimmt die Reihenfolge der Gene auf dem Chromosom mit der räumlichen und zeitlichen Reihenfolge der Expression während der Entwicklung entlang der Längsachse überein (Carroll, 1995).

Die Homeodomäne wird durch eine 180bp lange DNA-Sequenz codiert, die als Homeobox bezeichnet wird. Sie faltet sich in drei Helices, die letzten beiden bilden ein Helix-Turn-Helix

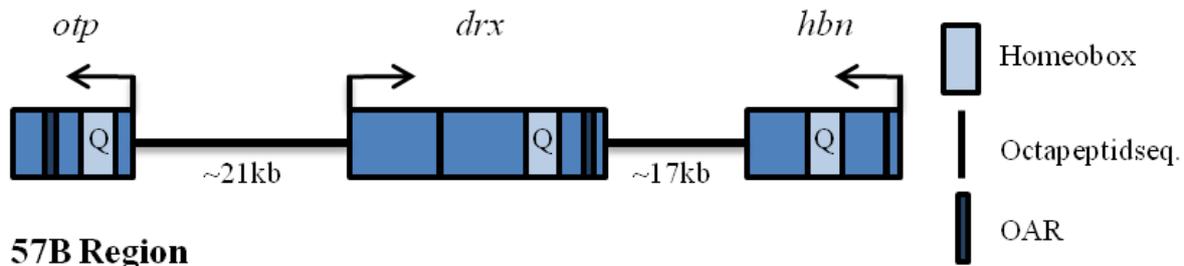
Motiv. Dieses Motiv ist charakteristisch für Transkriptionsfaktoren die in der großen Furche der DNA-Doppelhelix binden (Otting et al., 1990; Percival-Smith et al., 1990). Die dritte Helix ist die Erkennungshelix, in diesem Bereich findet die DNA-Bindung statt.

Homeoboxgene lassen sich in zwei Hauptklassen unterteilen, in HOX-Gene, die mit dem *Drosophila* Gen *Antennapedia* verwandt sind und in Gene, die mit dem Gen *paired (prd)* verwandt sind (siehe Galliot et al., 1999). Die Gene der *prd*-Klasse lassen sich aufgrund des Aminosäurerests an Position 50 der Homeodomäne, der eine Schlüsselrolle in der Spezifizierung der DNA-Bindung spielt (Treisman et al., 1989; Pellizzari et al., 1997), in drei Unterklassen unterteilen. Gene des Pax- oder auch *prd*-Typs haben einen Serin-Rest an Position 50 (S<sub>50</sub>) und über die Homeodomäne hinaus eine zweite DNA-Bindedomäne, die Prd-Domäne (Bopp et al., 1986; Frigerio et al., 1986). Gene, die mit *orthodenticle* verwandt sind, haben einen Lysin-Rest an Position 50 und werden somit als K<sub>50</sub> *prd*-like bezeichnet. Q<sub>50</sub> *prd*-like Gene haben einen Glutaminrest an Position 50, ihnen fehlt wie den K<sub>50</sub> *prd*-like Genen die Prd-Domäne (Miller et al., 1992; White et al., 1992; Schneitz et al., 1993).

Viele Homeodomänenproteine besitzen N-terminal zur Homeodomäne eine Octapeptidsequenz (Burri et al., 1989; Schneitz et al., 1993), die als transkriptioneller Repressor dient (Smith und Jaynes, 1996). Viele *prd*-like Q<sub>50</sub> Homeodomänenproteine besitzen am Carboxyterminus eine OAR- (*otp*, *aristaless*, *rx*) Domäne (Furukawa et al., 1997), die als Transaktivator dient (Simeone et al., 1994).

### **2.3 Das Homeoboxgen *orthopedia (otp)***

Auf dem rechten Arm des 2.Chromosoms von *Drosophila* konnte in der 57B Region ein Cluster von drei Homeoboxgenen identifiziert werden (Walldorf et al., 2000). Dabei handelt es sich um die drei Q<sub>50</sub> *prd*-like Homeoboxgene *orthopedia (otp)*, *Drosophila retinales Homeoboxgen (drx)* und *homeobrain (hbn)*. In Abbildung 2.1 ist die chromosomale Lokalisierung der Gene dargestellt. *Drx* und *hbn* besitzen neben der Homeodomäne eine Octapeptidsequenz (Eggert et al., 1998; Walldorf et al., 2000), *drx* und *otp* eine OAR-Domäne (Furukawa et al., 1997; Eggert et al., 1998).



### 57B Region

**Abb.2.1. Chromosomale Lokalisierung der drei Homeoboxgene *orthopedia (otp)*, *Drosophila retinales Homeoboxgen (drx)* und *homeobrain (hbn)* in der 57B Region auf dem rechten Arm des 2. Chromosoms von *Drosophila*.** Dargestellt sind außerdem die Lage der Homeobox, der Octapeptidsequenz und der OAR-Domäne. Der Pfeil über den Genen deutet die Leserichtung an.

*Hbn* wird bei *Drosophila* bereits im Blastodermstadium in einem hufeisenförmigen Streifen im anterioren Bereich des Embryos exprimiert. Es wird während der gesamten Embryonalentwicklung im Gehirn und ventralen Nervensystem exprimiert (Walldorf et al., 2000). *Hbn*-Mutanten zeigten einen starken Gehirnphänotyp, das Protocerebrum fehlt und die präorale Hirnkommisur wird nicht gebildet (Kaspar, 2008). Im Gegensatz zu den anderen beiden Genen der 57B Region konnte bisher kein Vertebraten-Homolog zu *hbn* identifiziert werden.

*Drx* wurde als Homolog des Vertebratengens *Rx* bei *Drosophila* identifiziert und ist in der Evolution hoch konserviert (Eggert et al., 1998). Die Homeodomäne zwischen *Drosophila* und Maus zeigt 98% Identität. *Drx* wird früh in der procephalischen Region und im Clypeolabrum exprimiert. Später findet eine Expression im Gehirn und Nervensystem statt (Eggert et al., 1998). Während *Rx* bei Vertebraten eine Rolle bei der Augen- und Gehirnentwicklung spielt und bei Mutanten eine Deformation des Vorderhirns und ein Augenphänotyp nachgewiesen werden konnte (Mathers et al., 1997; Winkler et al., 2000; Zhang et al., 2000; Ishikawa et al., 2001; Loosli et al., 2001; Tucker et al., 2001) wird *drx* bei *Drosophila* nur für die Gehirn- und Clypeusentwicklung, nicht jedoch für die Augenentwicklung benötigt (Davis et al., 2003; Wild, 2004).

Das Homeoboxgen *orthopedia (otp)* wurde gleichzeitig bei *Drosophila* und der Maus entdeckt (Simeone et al., 1994). Der Name setzt sich aus den Namen der Gene *orthodenticle* und *Antennapedia* zusammen, mit denen *otp* eine hohe Sequenzhomologie im Bereich der Homeodomäne aufweist (Simeone et al., 1994). *Otp* ist in der Evolution hochkonserviert, es wurde außer bei *Drosophila* und der Maus bei mehreren Invertebraten und Vertebraten identifiziert. Dabei kann zwischen den Spezies vor allem eine hohe Konservierung der Homeodomäne nachgewiesen werden. In Abbildung 2.2 ist die *Otp*-Homeodomäne verschiedener Spezies dargestellt. Die Homeodomäne zeigt eine Aminosäureidentität von

95% zwischen *Drosophila* und dem Seeigel und eine Aminosäureidentität von 93,33% zwischen *Drosophila* und der Napfschnecke *Patella vulgata* sowie den Vertebraten Zebrafisch, Huhn, Maus und Mensch. Unter den Vertebraten ist die Homeodomäne zu 100% identisch.

Spezies	Homeodomäne	Identität [%]
<i>Drosophila</i>	QKRHRTRFTPAQLNELERCFSKTHYPDIFMREEIAMRIGLTESRVQVWFQNRRAKWKKRK	
Seeigel	-----N-A-----V-----	95%
<i>Patella</i>	-----S-A-----M-L-----	93%
Zebrafisch	-----S-A-----L-L-----	93,33%
Huhn	-----S-A-----L-L-----	93,33%
Maus	-----S-A-----L-L-----	93,33%
Mensch	-----S-A-----L-L-----	93,33%

**Abb.2.2. Evolution der Otp-Homeodomäne.** Dargestellt sind die Aminosäuresequenzen der Homeodomänen von Otp aus *Drosophila*, Seeigel, *Patella vulgata*, Zebrafisch, Huhn, Maus und Mensch.

Otp wird bei dem Seeigel *Paracentrotus lividus* als *Plotp* bezeichnet und ist ein Schlüsselregulator der Morphogenese des embryonalen Skelettsystem (DiBernardo et al., 1999; DiBernardo et al., 2000; Cavalieri et al., 2003).

Das *otp*-Gen der Napfschnecke *Patella vulgata* wird als *Pv-otp* bezeichnet und ist an der Entwicklung des apikalen sensorischen Organs beteiligt (Nederbragt et al., 2002).

Beim Zebrafisch *Danio rerio* konnten zwei *otp* orthologe Gene identifiziert werden - *otp1* und *otp2* (DelGiacco et al., 2006) bzw. *otpa* und *otpb* (Blechman et al., 2007). Dies ist auf eine Genomduplikation beim Zebrafisch im Verlauf der Evolution zurückzuführen. Otp1 zeigt auf Proteinebene 78% Sequenzidentität, Otp2 81% Sequenzidentität mit dem murinen Otp. Von beiden *otp* Genen existieren zwei Spleißformen. *Otp1* wird in spezifischen Zellen des Diencephalon exprimiert, in der preoptischen Region und im posterioren Tuberculum, wo eine Expression auf catecholaminerge Neuronen beschränkt ist (DelGiacco et al., 2006).

Beim Huhn wird *otp* in spezifischen Regionen des Hypothalamus exprimiert (Caqueret et al., 2005).

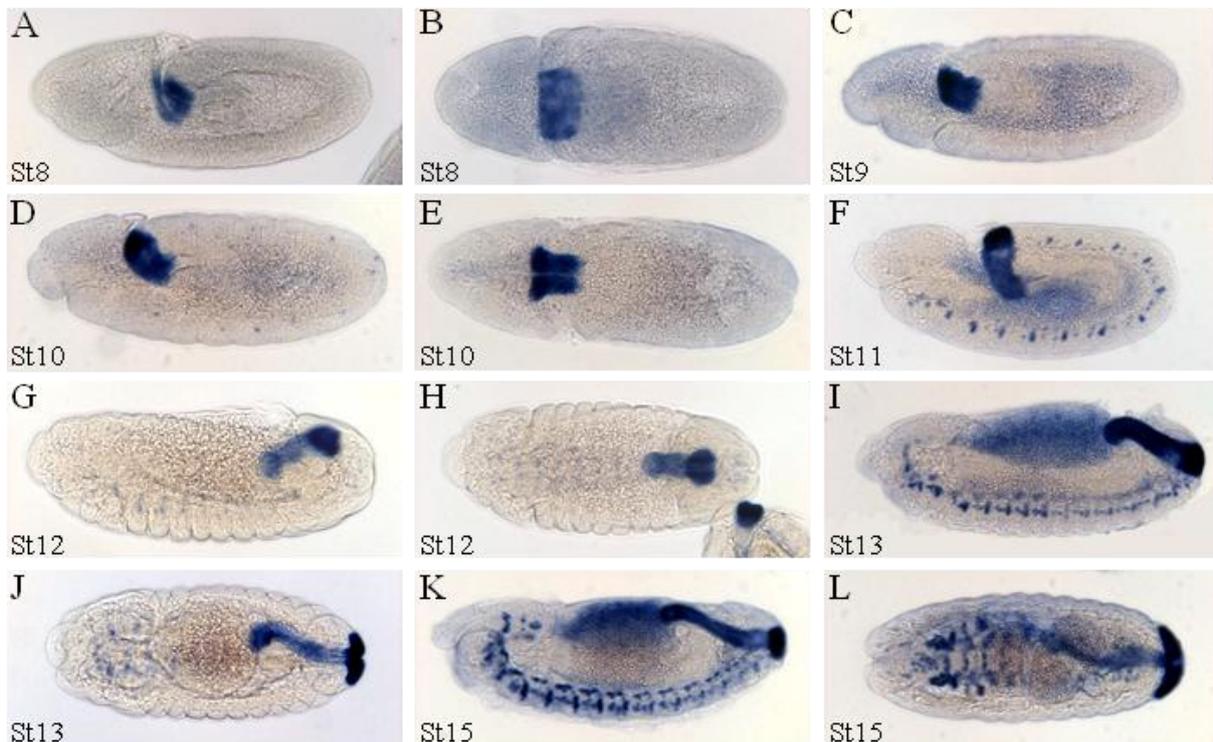
Bei der Maus wird *otp* in Diencephalon, Rhombencephalon und im Rückenmark exprimiert (Simeone et al., 1994). Otp wird für die Entwicklung des Hypothalamus benötigt und dort im *Nucleus paraventricularis*, im *Nucleus supraopticus*, im *Nucleus periventricularia anterior* und im *Nucleus acuatus* exprimiert (Acampora et al., 1999; Acampora et al., 2000). Homozygote *otp -/-* Mäuse sterben kurz nach der Geburt aufgrund neuroendokriner Defekte im Hypothalamus (Acampora et al., 1999).

Auch bei Menschen konnte Otp identifiziert werden (Lin et al., 1999). Die humane Otp-Aminosäuresequenz zeigt 99% Sequenzidentität mit der Aminosäuresequenz der Maus und

das Gen ist in der chromosomalen Region 5q13.3 lokalisiert. In fetalem Gewebe (19. Wochen) kann eine Expression in distinkten Bereichen des Vorderhirns nachgewiesen werden. Otp wird im Hypothalamus und im *Corpus amygdaloideum* exprimiert. Die meisten Otp-exprimierenden Zellen haben eine gestreckte längliche Form, was darauf hindeutet, dass es sich um migrierende Zellen handelt. Es wird vermutet, dass Otp beim Menschen eine Funktion in der emotionalen und neuroendokrinen Hirnfunktion besitzt (Lin et al., 1999).

Während *otp* also bei Invertebraten in verschiedenen Geweben exprimiert wird und an verschiedensten Musterbildungsprozessen beteiligt ist, wird *otp* bei Vertebraten nur in neuronalen Geweben exprimiert. Bei allen bisher untersuchten Vertebraten (Zebrafisch, Huhn, Maus, Mensch) kann eine essenzielle Funktion von *otp* für die richtige Determinierung von Zelllinien im neuroendokrinen Hypothalamus nachgewiesen werden. In allen Spezies (Invertebraten und Vertebraten) ist die Expression ausschließlich auf Gewebe ektodermaler Herkunft beschränkt.

In Abbildung 2.3 ist das embryonale Expressionsmuster der *otp*-mRNA bei *Drosophila* dargestellt.



**Abb.2.3. Das embryonale Expressionsmuster der *otp*-mRNA.** Dargestellt sind *in situ* Hybridisierungen mit einer *otp*-Sonde an Wildtyp-Embryonen. (A,B) Seitenansicht bzw. Aufsicht auf einen Embryo im Stadium 8. (C) Seitenansicht eines Embryos im Stadium 9. (D,E) Seitenansicht bzw. Aufsicht auf einen Embryo im Stadium 10. (F) Seitenansicht eines Embryos im Stadium 11. (G,H) Seitenansicht bzw. Aufsicht auf einen Embryo im Stadium 12 während des Keimstreifrückzugs. (I,J) Seitenansicht bzw. Aufsicht auf einen Embryo im Stadium 13. (K,L) Seitenansicht bzw. Aufsicht auf einen Embryo im Stadium 15. Bei allen Bildern liegt der anteriore Pol links, es handelt sich um lichtmikroskopische Aufnahmen.

Die Expression beginnt in Stadium 8 im Enddarmprimordium. Ab Stadium 11 findet zusätzlich eine Expression entlang des ventralen Nervensystems statt. Gegen Ende der Embryonalentwicklung kann eine Expression im Enddarm, den Analplatten, entlang der ventralen Nervensystems und im Gehirn nachgewiesen werden.

Potentielle *otp*-Mutanten, die eine Mutation im *otp*-Gen oder in einem der beiden benachbarten Gene besitzen, zeigen einen Enddarmphänotyp (Bach, 2005).

## 2.4 Die Enddarmentwicklung bei *Drosophila*

Der embryonale Enddarm von *Drosophila* ist ein einzellschichtiges, ektodermales Epithelium, das von einer viszeralen Muskelschicht umgeben wird (Tepass und Hartenstein, 1994; Campos-Ortega und Hartenstein, 1997; Kusch und Reuter, 1999). Er bildet sich aus einer Gruppe von Zellen, die sich im Blastodermstadium am posterioren Ende des Embryos befinden und als Enddarmprimordium bezeichnet werden (Campos-Ortega und Hartenstein, 1997). Das Enddarmprimordium ist ein Ring aus etwa 200 Blastodermzellen, die während der Gastrulation einen kurzen, weiten Sack bilden. In relativ kurzer Zeit verwandelt sich dieser

Epitheliumsack in eine lange, röhrenförmige Struktur, die aus etwa 700 Zellen besteht (Harbecke und Janning, 1989; Campos-Ortega und Hartenstein, 1997; Iwaki et al., 2001). Eine Reihe von Genen ist an der Bildung des Enddarmprimordiums beteiligt. Das Gen *tailless* aktiviert die Gene *brachyenteron*, *forkhead* und *wingless*, die alle im Enddarmprimordium exprimiert werden und für die Enddarmentwicklung benötigt werden (Mahoney und Lengyel, 1987; Pignoni et al., 1990; Weigel et al., 1990; Kispert et al., 1994; Diaz et al., 1996; Singer et al., 1996). Unabhängig von *tailless* wird außerdem noch *caudal* im Enddarmprimordium exprimiert. Die Gene *caudal*, *brachyenteron*, *forkhead* und *wingless* zeigen dabei eine evolutionäre Konservierung in der Enddarmentwicklung.

Weder Apoptose noch Proliferation spielt eine entscheidende Rolle bei der Morphogenese des Enddarms (Iwaki et al., 2001; Lengyel und Iwaki, 2002). So zeigt sowohl der Enddarm in Mutanten denen Apoptosegene fehlen, als auch in *string*-Mutanten, bei denen die postblastodermalen Teilungen fehlen, eine wildtypische Morphologie (Hartenstein und Posakony, 1990; Iwaki et al., 2001; Lengyel und Iwaki, 2002). Wichtige Prozesse bei der Enddarmmorphogenese sind dagegen die Veränderung von Zellform und Zellgröße sowie die Reorganisation von Zellen (Lengyel und Iwaki, 2002).

Der embryonale Enddarm ist entlang der anterior-posterioren (AP) Achse und entlang der dorsoventralen (DV) Achse unterteilt. Entlang der AP Achse bildet der Enddarm drei morphologisch zu unterscheidende Regionen: das „small intestine“, das „large intestine“ und das Rektum (Hoch und Pankratz, 1996; Iwaki et al., 2001; Takashima und Murakami, 2001). Das „small intestine“ ist der am weitesten anterior gelegen Teil des Enddarms und ist mit dem Mitteldarm verbunden. Das „large intestine“ ist der zentrale und längste Teil des Enddarms und als einziger Teil auch entlang der DV Achse unterteilt. Die dorsale Region bildet den äußeren Teil der Enddarmschleife, die ventrale Region den inneren Teil der Enddarmschleife. Zwei Reihen von sogenannten „boundary cells“ sind zwischen diesen Regionen organisiert und bilden außerdem zwei Ringe an der anterioren und posterioren Grenze des „large intestine“ (Murakami et al., 1999; Takashima und Murakami, 2001; Lengyel und Iwaki, 2002). In den Zellen des „large intestine“ findet ab Stadium 13 Endoreplikation statt (Smith und Orr-Weaver, 1991), welche zu einer Zellvergrößerung und zu einer Verlängerung des gesamten „large intestine“ führt (Fuss et al., 2001; Takashima und Murakami, 2001). Das posteriore Ende des Enddarms ist das Rektum, das mit den Analplatten verbunden ist.

Eine große Anzahl von Genen ist nötig, um die Musterbildung entlang der AP Achse in „small intestine“, „large intestine“ und Rektum zu gewährleisten. Die Bildung und Aufrechterhaltung des „large intestine“ erfordert eine Expression der Gene *brachyenteron*,

*dichaete*, *raw*, *lines* und *mummy*, während *drumstick* und *bowl* für die Bildung und Aufrechterhaltung des „small intestine“ benötigt werden (Harbecke und Lengyel, 1995; Singer et al., 1996; Jack und Myette, 1997; Blake et al., 1998; Liu et al., 1999; Sanchez-Soriano und Russell, 2000; Iwaki et al., 2001).

Das T-Box-Gen *brachyenteron* (*byn*) spielt eine entscheidende Rolle bei der Bildung des „large intestine“. Die Expression von *byn* beginnt im Blastodermstadium an der posterioren Kappe des Embryos in einem Streifen. Im Laufe der Embryonalentwicklung wird *byn* im Enddarmprimordium und später im Enddarm und den Analplatten exprimiert (Kispert et al., 1994). In *byn*-Mutanten ist der Enddarm aufgrund von Apoptose stark verkürzt und das „large intestine“ fehlt, außerdem sind die Analplatten reduziert (Singer et al., 1996; Lengyel und Iwaki, 2002). In *byn*-Mutanten kann keine Expression von *otp* im Enddarmprimordium und im Enddarm nachgewiesen werden, die Expression von *otp* im Nervensystem ist dagegen unverändert (Singer et al., 1996). *Otp* ist ein direktes Zielgen von *byn*, es wird im Enddarm dosisabhängig über multiple Bindungsstellen aktiviert (Kusch et al., 2002). Bei dem regulatorischen Element handelt es sich um einen 1.8kb großen Bereich 950bp upstream des Transkriptionsstarts für das Enddarm-spezifische *otp*-Transkript. Innerhalb dieses Bereichs konnten 15 *Byn*-Bindestellen mit einer Consensus-Sequenz nachgewiesen werden. Die Bindestellen sind hochkonserviert, auch das Maus Homolog-*Brachyury* kann eine Expression von *otp* in *Drosophila* induzieren (Kusch et al., 2002).

Der larvale und adulte Enddarm von *Drosophila* ist ebenfalls entlang der AP Achse in drei Regionen unterteilt - in Pylorus, Ileum und Rektum. Der adulte Enddarm bildet sich während der Metamorphose aus zwei Teilen. Der anteriore Teil (Pylorus und Ileum) bildet sich aus dem sogenannten „larval imaginal ring“, einem Teil des larvalen Pylorus, das Rektum bildet sich aus Zellen der Genitalscheibe (Robertson, 1936). Vor dem Schlüpfen der Fliege verbinden sich die beiden Teile. Das larvale Ileum und Rektum sind nicht an der Bildung des adulten Enddarms beteiligt, sie degenerieren vollständig. Die Gene *caudal* und *byn* sind sowohl an der frühen Entwicklung des embryonalen, als auch des adulten Enddarms beteiligt (Lengyel und Iwaki, 2002).

## **2.5 Die Nervensystementwicklung bei *Drosophila***

Einige der frühesten Studien über das Nervensystem von Insekten beschäftigten sich mit der stereotypen Anordnung von Neuroblasten in den Ventralganglien der Wanderheuschrecke (Bate, 1976) und des Tabakswärmers (Booker und Truman, 1987). Sogar bei den primitiven, flügellosen Silberfischchen konnte eine hohe Konservierung der Anzahl und

Position der Neuroblasten in den thorakalen Ganglien nachgewiesen werden (Truman und Ball, 1998). Im Gehirn des Grashüpfers sind 130 Neuroblasten in einem stereotypen Muster im Protocerebrum, im Deutocerebrum und im Tritocerebrum organisiert (Zacharias et al., 1993). Auch *Drosophila* besitzt eine stereotype Anordnung von Neuroblasten in den Ventralganglien und im Gehirn (Doe, 1992; Younossi-Hartenstein et al., 1996; Urbach und Technau, 2003). Die Ähnlichkeiten in der Organisation des Nervensystems zwischen den Insekten ermöglichen es, die Neurogenese beispielhaft an einer Spezies, in diesem Fall *Drosophila*, zu untersuchen.

Das zentrale Nervensystem von *Drosophila* besteht aus dem Gehirn und dem ventralen Nervensystem. Das ventrale Nervensystem (VNS) bildet sich während der Gastrulation aus dem ventralen Neuroektoderm. Alle Zellen des Neuroektoderm besitzen das Potential, neuronale Vorläuferzellen, sogenannte Neuroblasten zu werden (Bate 1976; Doe und Goodman, 1985). Zwei Gruppen von Genen spielen eine entscheidende Rolle dabei, ob eine Zelle ein neuronales Schicksal einschlägt oder zu einer Epidermiszelle wird. Während die proneutralen Gene des *Achaete-Scute*-Komplexes die Neurogenese einleiten, unterdrücken die neurogenen Gene die Neurogenese und leiten eine epidermale Entwicklung ein (siehe Ghysen und Dambly-Choudiere, 1989). Zellen, in denen die proneuralen Gene exprimiert werden, sind in Gruppen von 5-6 Zellen angeordnet und werden als proneurale Cluster bezeichnet. Kurz nach Bildung der proneuralen Cluster beginnt eine der Zellen - der spätere Neuroblast - das proneurale Gen *achaete* stärker zu exprimieren als die anderen Zellen, die Zelle wächst und delaminiert ins Innere des Embryos (Skeath und Carroll, 1992). Nach Auswahl des Neuroblasten wird in den anderen Zellen des Clusters die Expression von *achaete* durch die neurogenen Gene mittels Lateralinhibition gehemmt (Skeath und Carroll, 1992), diese entwickeln sich zu Epidermiszellen. Die Lateralinhibition erfolgt dabei über den Notch-Signalweg. Bei Mutanten eines neurogenen Genes (*Notch*, *Delta*, *Enhancer of split*, *big brain* oder *neuralized*) entwickeln sich alle Zellen eines proneuralen Clusters zu Neuroblasten (Skeath und Carroll, 1992).

Das ventrale Nervensystem entsteht aus ~30 Neuroblasten pro Hemisegment, im Gegensatz zum Grashüpfer gibt es zwischen den thorakalen und abdominalen Segmenten keine Unterschiede in der Anzahl und Anordnung der Neuroblasten (Doe, 1992). Die Neuroblasten des ventralen Nervensystems delaminieren in Wellen. Die Mehrheit der Neuroblasten teilt sich asymmetrisch in eine Ganglienmutterzelle (GMC) und einen Neuroblasten (Bauer, 1904). Die Ganglienmutterzelle teilt sich wiederum in zwei postmitotische Neurone. Ein besonderer Fall stellt im ventralen Nervensystem die „Midline Precursor 2“ (MP2) Zelle dar, die sich nur

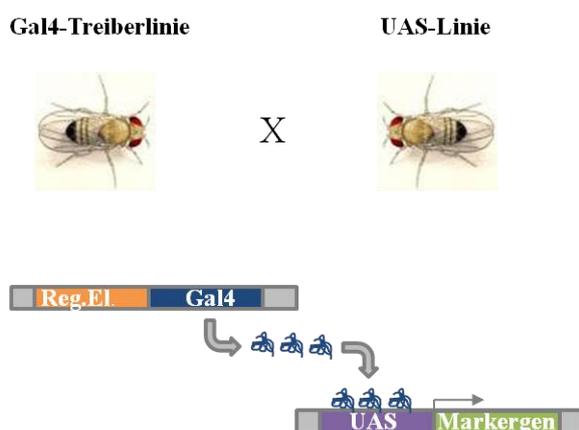
einmal in die zwei Neurone vMP2 und dMP2 teilt (Thomas et al., 1984; Doe et al., 1988). Außerdem befindet sich in jedem Hemisegment mindestens eine Gliavorläuferzelle, die sich symmetrisch in Gliazellen teilt (Jacobs, 1989). Durch diesen Prozess produziert jeder Neuroblast eine invariante und einzigartige Lineage (Bossing et al., 1996; Schmidt et al., 1997). Jeder Neuroblast besitzt aufgrund des Zeitpunkts und Position der Delamination sowie der Genexpression eine einzigartige Identität (Doe, 1992; Broadus et al., 1995; Berger et al., 2001). Insgesamt produzieren die 30 Neuroblasten etwa 350 Zellen pro Hemisegment, die ein sogenanntes Hemi-Neuromer bilden, davon 30 Gliazellen, 30 Motoneurone und ~290 Interneurone (Ito et al., 1995; Bossing et al., 1996; Landgraf et al., 1997; Schmidt et al., 1997).

Das Gehirn von *Drosophila* entsteht aus dem procephalischen Neuroektoderm. Es bildet sich in den Stadien 9 bis 11 der Embryonalentwicklung aus einem Cluster von etwa 100 Neuroblasten (Younossi-Hartenstein et al., 1996; Urbach und Technau, 2003). Im procephalischen Neuroektoderm ist die Größe der proneuralen Cluster variabel, aus einem proneuralen Cluster können auch mehrere Neuroblasten delaminieren (Younossi-Hartenstein et al., 1996; Urbach et al., 2003). Dies deutet darauf hin, dass die Lateralinhibition im procephalischen Neuroektoderm weniger effizient ist als im ventralen Neuroektoderm. Auch delaminieren die Neuroblasten nicht in Wellen, sondern kontinuierlich (Urbach et al., 2003). Während der Embryonalstadien teilen sich die Neuroblasten stammzellartig und produzieren zwei Hemisphären aus je 1500 primären Neuronen. In seltenen Fällen kann der Neuroblast auch eine Gliazelle oder eine transient amplifizierende Gangliemutterzelle bilden (Boone und Doe, 2008). Zellen, die zu einer Lineage gehören, haften aneinander und sind zur Zeit der Neuropil-Bildung (Stadium 11-15) als kegelförmige Cluster aus 10-20 Zellen zu erkennen (Younossi-Hartenstein et al., 2006). Axone von Neuronen, die von einem Neuroblast gebildet wurden, bilden Bündel, die sogenannten primären Axonbündel (PABs) (Younossi-Hartenstein et al., 2006). Bis zum Stadium 15 bestehen die PABs hauptsächlich aus kurzen, unverzweigten Axonen, die ins Zentrum des Gehirns konvergieren und das Neuropil bilden, das von einem Kortex aus Zellkörpern umgeben ist (Younossi-Hartenstein et al., 2006). Frühgeborene Neurone bilden dabei ein Gerüst aus sogenannten Pionier-Bahnen („pioneer tracts“), an denen sich die PABs orientieren (Nassif et al., 1998). Die Verzweigung der primären Axone in den Stadien 16-17 führt zu einer Vergrößerung des Neuropilvolumens. Gegen Ende der Embryonalentwicklung wandern die Gliazellen ins Neuropil ein und bilden Septen um einzelne Neuropil-Kompartimente (Younossi-Hartenstein et al., 2006).

Nach einer kurzen Ruhezeit teilen sich die Neuroblasten in den Larvalstadien wieder und bilden die sogenannten sekundären Neurone. Die Bezeichnung primäre bzw. sekundäre Neurone gibt dabei Auskunft über den Zeitpunkt ihrer Entstehung, unter primären Neuronen versteht man alle embryonal gebildeten Neurone, unter sekundären Neuronen alle larval gebildeten Neurone. Die sekundären Neurone projizieren sekundäre Axonbahnen (SATs) entlang der bereits bestehenden primären Axonbahnen (PATs). Am Ende der Larvalentwicklung besteht eine vollständige Lineage aus einem Neuroblasten und seinen primären und sekundären Neuronen. Das larvale Gehirn zeigt eine Untergliederung in zwei Gehirnhemisphären und dem Ventralganglion (Herweck, 1931).

Um einzelne Zelllinien sichtbar zu machen, kann man sich das UAS-Gal4-System (Brand und Perrimon, 1993) und MARCM- (= mosaic analysis with a repressible cell marker) Analysen (Lee und Luo, 1999; Lee und Luo 2001) zu Nutze machen.

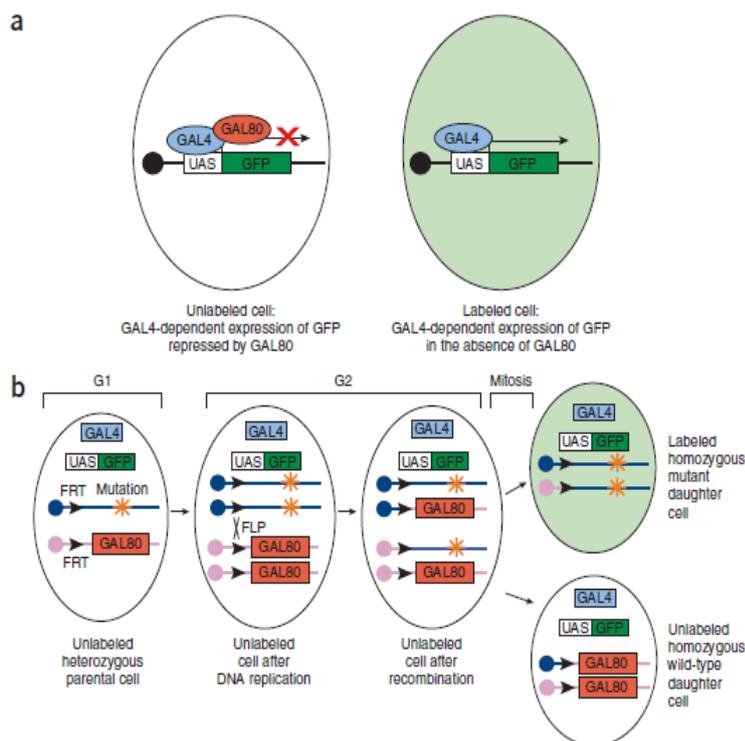
Mit dem UAS-Gal4-System kann eine gezielte Fehlexpression eines Gens in einem bestimmten Gewebe durchgeführt werden (Brand und Perrimon, 1993). Es handelt sich dabei um ein binäres System aus dem Hefe-Transkriptionsfaktor Gal4 und der UAS- (= Upstream Activating Sequence) Region, an der Gal4 spezifisch bindet und dadurch die Transkription eines dahinter geschalteten Gens aktiviert. Das Prinzip des Systems ist in Abbildung 2.4 dargestellt. Es besteht aus zwei Fliegenlinien, einer Treiberlinie, die das Gal4-Gen unter Kontrolle eines spezifischen regulatorischen Elements enthält und einer UAS-Linie, die ein Gen oder Markergen unter Kontrolle der UAS-Region enthält. Kreuzt man die beiden Linien, so entstehen in der F<sub>1</sub> Fliegen, welche die beiden Konstrukte tragen. Das Gal4-Protein bindet an der UAS-Region und aktiviert dadurch die Expression des Markergens in allen Geweben, in denen das spezifische regulatorische Element aktiv ist.



**Abb.2.4. Schematische Darstellung des UAS-Gal4-Systems.** Die Treiberlinie enthält das Gal4-Gen unter Kontrolle eines spezifischen regulatorischen Elements (reg.El.), die UAS-Linie ein Markergen unter Kontrolle der UAS-Region. Kreuzt man die beiden Linien, so entstehen in der F<sub>1</sub> Fliegen, welche die beiden Konstrukte tragen. Das Gal4-Protein bindet an der UAS-Region und aktiviert dadurch die Expression des Markergens in allen Geweben, in denen das spezifische regulatorische Element aktiv ist.

Die Trennung in zwei Fliegenlinien ermöglicht eine Vielzahl von Kombinationen zwischen den verschiedenen Linien. So steht eine Reihe von Treiberlinien zur Verfügung, die eine Expression von Gal4 in spezifischen neuronalen Zelllinien ermöglichen. Durch Kombination mit UAS-Linien, die ein Markergen wie z.B. das Fluoreszenzprotein GFP (= Green Fluorescent Protein) tragen, kann diese dann sichtbar gemacht werden.

Das MARCM-System ermöglicht eine positive Markierung einer kleinen Population wildtypischer oder mutanter Zellen (Lee und Luo, 1999; Lee und Luo, 2001; Wu und Luo, 2006). Dabei werden homozygot mutante Zellen aus heterozygoten Vorläufern durch mitotische Rekombination erzeugt. Das System kombiniert das Gal80-Repressorprotein mit dem oben beschriebenen UAS-Gal4-System und dem Flp-FRT-System (Abb.2.5). Die Flp-Rekombinase ist ein Enzym, das in der DNA Doppelstrangbrüche und Rekombination an FRT- (Flp-Rekombinase Target) Stellen induziert.



**Abb.2.5. Schematische Darstellung des MARCM-Systems.** (a) In Zellen, die Gal80 enthalten wird die Gal4 gesteuerte Expression von UAS-GFP reprimiert. Dagegen wird in Zellen ohne Gal80 die Expression von UAS-GFP durch Gal4 aktiviert. (b) MARCM Fliegen benötigen: FRT-Stellen auf beiden homologen Chromosomen, Gal80 distal zu einer FRT-Stelle, Flp-Rekombinase, Gal4, UAS-Markergen und optional eine Mutation distal zur FRT-Stelle. Durch mitotische Rekombination an den FRT-Stellen entstehen zwei Tochterzellen, von denen jede homozygot für den Chromosomenarm distal zur FRT-Stelle ist. In einer der Tochterzellen führt die Gal80 Expression zu Repression der Gal4 gesteuerten Expression des UAS-Markergens, die Zelle ist nicht markiert. In der anderen Tochterzelle führt der Verlust von Gal80 zu einer Gal4 gesteuerten Markergenexpression, die Zelle ist markiert (aus Wu und Luo, 2006).

In Anwesenheit von Gal80 wird die Gal4 gesteuerte Expression des Markergens reprimiert, die Zellen sind somit nicht markiert (Abb.2.5.a). In Zellen ohne Gal80 erfolgt dagegen die Gal4 gesteuerte Expression des Markergens, die Zellen sind markiert (Abb.2.5.a). Nach Flp-FRT abhängiger mitotischer Rekombination entstehen zwei Tochterzellen, von denen eine kein Gal80 enthält (Abb.2.5.b). In dieser Zelle ist Gal4 also wieder aktiv und kann somit die

Expression eines Markergens (z.B. UAS-GFP) aktivieren, wodurch diese Zellen und alle ihre Nachkommen positiv markiert sind.

## 2.6 Zielsetzung der Arbeit

Zielsetzung der Arbeit war die umfassende Analyse der Funktion des Homeoboxgens *orthopedia* in der Enddarm- und Nervensystementwicklung von *Drosophila*.

Dazu sollte zuerst das bisher nur grob und ausschließlich auf mRNA-Ebene beschriebene embryonale Expressionsmuster von *otp* genauer bestimmt werden. So sollte mittels *in situ* Hybridisierung das mRNA-Muster von *otp* bestimmt werden und dies anschließend mit dem Expressionsmuster des Otp-Proteins verglichen werden. Mit Hilfe von Doppel-Antikörperfärbungen mit spezifischen Enddarm- und Nervensystem-Markern sollte außerdem nachgewiesen werden, in welchen Bereichen des Enddarms und des Nervensystems *otp* exprimiert wird.

Außerdem sollte mit Hilfe von Rettungsexperimenten nachgewiesen werden, dass es sich bei den in eigener Vorarbeit identifizierten potentiellen *otp*-Mutanten, die aus einem EMS-Mutagenese-Screen stammen, tatsächlich um *otp*-Mutanten handelt. Diese sollten anschließend phänotypisch analysiert werden. Zusätzlich dazu sollte mittels homologer Rekombination eine *otp*-Mutante erzeugt werden und diese molekular verifiziert werden. Dazu standen bereits Fliegen zur Verfügung, die ein Konstrukt zum „Ends-Out Gene Targeting“ stabil in ihrer Keimbahn tragen.

Mittels *in situ* Hybridisierungen und Antikörperfärbungen sollte das larvale Expressionsmuster von *otp* bestimmt werden, das bisher noch unbekannt war. Wie im Embryo sollten auch hier mit Hilfe von Doppel-Antikörperfärbungen Co-Lokalisationsstudien durchgeführt werden.

Mit Hilfe umfassender Reporter-gen-Analysen sollte der komplette Intron-Bereich sowie der 5'-Bereich des *otp*-Gens auf regulatorische Elemente untersucht werden. Dabei lag der Schwerpunkt auf der Suche nach regulatorischen Elementen für eine *otp*-Expression im Nervensystem, da das regulatorische Element für die Expression von *otp* im Enddarm schon beschrieben war.

Mittel MARCM-Analysen sollten eine erste Zuordnung der Expression von *otp* im larvalen Gehirn zu spezifischen Lineages erfolgen.

### 3. Material und Methoden

#### 3.1 Material

##### 3.1.1 Antikörper

###### 3.1.1.1 Primäre Antikörper

Antigen	Spezies und Isotyp	Verdünnung	Bezugsquelle / Referenz
BP102	Maus IgG, monoklonal	1:5	DSHB
Crumbs (Crb)	Maus IgG, monoklonal	1:5	DSHB
Dachshund (Dac)	Maus IgG, monoklonal	1:10	DSHB
Digoxigenin (Dig)	Schaf Fab-Fragment, polyklonal	1:2000	Roche
<i>Drosophila</i> retinales Homeoboxgen (Drx)	Kaninchen IgG, polyklonal	1:400	Davis et al., 2003
Embryonic lethal abnormal vision (Elav)	Ratte IgG, monoklonal	1:30	DSHB
Engrailed (4D9) (En)	Maus IgG, monoklonal	1:5	DSHB
Futsch (22C10)	Maus IgG, monoklonal	1:5	DSHB
$\beta$ -Galaktosidase ( $\beta$ -Gal)	Kaninchen IgG, polyklonal	1:1000	Cappel (jetzt ICN)
Neurotactin (BP106)	Maus IgG, monoklonal	1:20	DSHB
Orthopedia (Otp)	Meerschweinchen IgG, polyklonal	1:400	Bach, 2005
Reversed polarity (Repo)	Maus IgG, monoklonal	1:20	DSHB
Sex combs reduced (Scr)	Maus IgG, monoklonal	1:5	DSHB

###### 3.1.1.2 Sekundäre Antikörper

Antigen	Konjugation	Spezies und Isotyp	Verdünnung	Bezugsquelle
Kaninchen IgG	Alexa Fluor <sup>®</sup> 488	Ziege IgG	1:1000	Invitrogen
Kaninchen IgG	Alexa Fluor <sup>®</sup> 568	Ziege IgG	1:1000	Invitrogen
Maus IgG	Alexa Fluor <sup>®</sup> 488	Ziege IgG	1:1000	Invitrogen
Maus IgG	Alexa Fluor <sup>®</sup> 568	Ziege IgG	1:1000	Invitrogen
Maus IgG	Alexa Fluor <sup>®</sup> 647	Ziege IgG	1:200	Invitrogen
Meerschweinchen IgG	Alexa Fluor <sup>®</sup> 488	Ziege IgG	1:1000	Invitrogen
Meerschweinchen IgG	Alexa Fluor <sup>®</sup> 568	Ziege IgG	1:1000	Invitrogen
Ratte IgG	Alexa Fluor <sup>®</sup> 488	Ziege IgG	1:1000	Invitrogen
Ratte IgG	Alexa Fluor <sup>®</sup> 568	Ziege IgG	1:1000	Invitrogen

### 3.1.2 Bakterienstämme

Bei allen benutzten Wirtsbakterienstämmen handelt es sich um Derivate von *E. coli* K12 bzw. *E. coli* W (Mach1).

**DH5 $\alpha$** : F<sup>-</sup> endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG  $\Phi$ 80dlacZ $\Delta$ M15  $\Delta$ (lacZYA-argF)U169, hsdR17(r<sub>K</sub><sup>-</sup> m<sub>K</sub><sup>+</sup>),  $\lambda$ -

Verwendet für die Transformation von Plasmidvektoren (Hanahan, 1985).

**TOP10F'**: F'[lacI<sup>q</sup> Tn10(tet<sup>R</sup>)] mcrA  $\Delta$ (mrr-hsdRMS-mcrBC)  $\phi$ 80lacZ $\Delta$ M15  $\Delta$ lacX74 deoR nupG recA1 araD139  $\Delta$ (ara-leu)7697 galU galK rpsL(Str<sup>R</sup>) endA1  $\lambda$ <sup>-</sup>

Verwendet für die Transformation von pCR<sup>®</sup>II-TA-TOPO<sup>®</sup>- und pCR<sup>®</sup>-XL-TOPO<sup>®</sup>-Konstrukten (Grant *et al.*, 1990).

**Mach1**:  $\Delta$ recA1398 endA1 tonA  $\Phi$ 80 $\Delta$ lacM15  $\Delta$ lacX74 hsdR(r<sub>K</sub><sup>-</sup> m<sub>K</sub><sup>+</sup>)

Verwendet für die Transformation von pCR<sup>®</sup>8/GW/TOPO<sup>®</sup>-Konstrukten.

### 3.1.3 DNA-Klone

Gen	Klon	Größe	Bezugsquelle / Referenz
<i>dri/rtn</i>	LD35748 (cDNA-Klon)	3.4kb	DGRC
<i>hh</i>	cDNA-Klon	750bp	Mohler und Vani (1992)
<i>otp</i>	cW26/2 Eco1.7 (cDNA-Klon, der Exons 3-9 enthält)	1.7kb	U. Walldorf (unveröffentlicht)
<i>otp</i>	$\lambda$ W50 BS1.6 (genomischer Klon, der Exons 1-2 enthält)	1.6kb	U. Walldorf (unveröffentlicht)
<i>upd</i>	AT13666 (cDNA-Klon)	2.5kb	DGRC

## 3.1.4 Fliegenstämme

Stamm	Beschreibung	Herkunft
<i>yw</i> <sup>67c23</sup>	Stamm für P-Element-basierte Keimbahntransformation; Wildtyp-Kontrolle	U.Walldorf
Bl 24871: <i>y</i> <sup>1</sup> M{vas-int.Dm}ZH-2A <i>w</i> *; PBac{y[+]-attP-3B}VK00033	Stamm für ΦC31-basierte Keimbahntransformation	J.Bischof und K.Basler
Bl 8622: <i>y</i> <sup>1</sup> <i>w</i> <sup>67c23</sup> ; P{CaryP}attP2	Stamm für ΦC31-basierte Keimbahntransformation	R. Nusse
<i>otp</i> <sup>1024</sup>	EMS-Mutante	U.Walldorf
<i>otp</i> <sup>13064</sup>	EMS-Mutante	U.Walldorf
<i>Pros29</i> <sup>3311</sup>	EMS-Mutante	U.Walldorf
CG34115 <sup>7272</sup>	EMS-Mutante	U.Walldorf
<i>yw</i> <sup>1118</sup> ; Sco/CyO; +/+	Balancer 2.Chromosom	U.Walldorf
<i>w</i> <sup>1118</sup> ; +/+; TM6B Tb/TM3 Sb	Balancer 3.Chromosom	U.Walldorf
CyO/Sp; Δ2-3Sb/Ubx	Stamm für Jump-Start	Robertson et al., 1988
<i>w</i> ; 70-Flp 70-I- <i>SceI</i> /TM3 Ser	Stamm zur Mobilisierung des Targeting-Konstrukts beim „Gene Targeting“	K.Golic
UAS-nlacZ	Kernlokalisierte β-Galaktosidase-Expression	S.Hayashi
<i>byn</i> <sup>apro</sup>	Enhancer-Trap-Stamm	Murakami et al., 1995
Bl 12342: P{PZ}I(2)07806 <sup>07806</sup> cn <sup>1</sup> /CyO; ry <sup>506</sup>	Enhancer-Trap-Stamm	A.Spradling
DGRC 202812: <i>y</i> <sup>1</sup> <i>w</i> <sup>67c23</sup> ; P{GSV6}GS10771/SM1	P-Element-Insertionsstamm	Kyoto Stock Center
TUG G13: <i>yw</i> hsFLP; FRTG13, tubP-GAL80; tubP-GAL4, UAS-mCD8::GFP /TM6 Tb,Hu	MARCM-Treiberstamm	B.Bello
Bl 1956: <i>w</i> *; P{FRT( <i>w</i> <sup>hs</sup> )}G13	FRT-Stelle in der 42B-Region	N.Perrimon
Bl 7998: <i>w</i> <sup>1118</sup> ; Df(2R)Exel7166/CyO	Defizienzstamm	Exelixis, Inc.

### 3.1.5 Lösungen, Puffer und Medien

Die Lösungen wurden, wenn nicht anders angegeben, bei RT aufbewahrt. Alle mit \* versehenen Lösungen wurden autoklaviert. Lösungsmittel ist, wenn nicht anders vermerkt, H<sub>2</sub>O<sub>deion.</sub>

#### **Ampicillinstammlösung** (-20°C, aliquotiert):

100mg/ml Ampicillin-Natriumsalz

#### **Apfelsaftagarplatten:**

8g Agar-Agar in 250ml H<sub>2</sub>O, autoklavieren;

8g Zucker zu 80ml Apfelsaft geben, aufkochen, Apfelsaft-Zuckerlösung zum Agar geben, Platten gießen und bei 4°C lagern.

#### **Canadabalsam-Salicylat-Gemisch:**

2 Teile Canadabalsam + 1 Teil Methylsalicylat

#### **Chloramphenicolstammlösung** (-20°C, aliquotiert):

12.5mg/ml Chloramphenicol in Ethanol

#### **Drosophila-Standardfuttermedium:**

200g Fadenagar in 15 Liter H<sub>2</sub>O aufkochen, 550g Rübensirup und 2kg Malzextrakt zugeben; 450g Trockenhefe, 250g Sojamehl und 2kg Maismehl in 10 Liter H<sub>2</sub>O verrühren, zum Fadenagar-Rübensirup-Malzextrakt-Gemisch geben und aufkochen; auf 60°C abkühlen lassen, 160ml Propionsäure und 75g Nipagin (4-Hydroxybenzoesäuremethylester) zugeben, in Glasröhrchen abfüllen, bei 18°C lagern.

#### **Embryonenwaschlösung:**

0.7% (w/v) NaCl, 0.03% (v/v) TritonX-100

#### **Ethidiumbromidstammlösung** (4°C, im Dunkeln gelagert):

10mg/ml in H<sub>2</sub>O

#### **Färbepuffer für *in situ* Hybridisierung:**

100mM NaCl, 50mM MgCl<sub>2</sub>, 100mM Tris-HCl pH9.5, 1mM Levamisol, 0.1% Tween20

**Fixativ für *in situ* Hybridisierung:**

1x PBS, 10% Formaldehyd, 50mM EGTA

**Hoyer's Medium:**

15g Gummi arabicum, 100g Chloralhydrat, 8ml Glycerol, 50ml H<sub>2</sub>O<sub>deion.</sub>

**Hybridisierungslösung (HybMix):**

50% deionisiertes Formamid, 5x SSC, 100µg/ml sonifizierte, gekochte Lachssperma-DNA, 100µg/ml tRNA *E. coli*, 50µg/ml Heparin, 0.1% Tween20

**Kanamycinstammlösung (-20°C, aliquotiert):**

100mg/ml Kanamycinsulfat in H<sub>2</sub>O

**LB-Medium\*:**

1% (w/v) NaCl, 1% (w/v) Trypton, 0.5% (w/v) Hefeextrakt

**LB-Agarplatten\*:**

LB-Medium + 1.5% Bacto-Agar

**Lithiumchlorid/Kaliumacetat-Lösung (genomische DNA aus Fliegen):**

1 Teil 5M Kaliumacetat + 2.5 Teile 6M Lithiumchlorid

**Lysispuffer (genomische DNA aus Fliegen):**

100mM Tris-HCl (pH7.5), 100mM EDTA, 100mM NaCl, 0.5% (w/v) SDS

**Natriumhypochloridlösung:**

1.4% (w/v) Natriumhypochlorid in H<sub>2</sub>O

**PBL:**

100mM Lysin-HCl, 50mM Natrium-Phosphat-Puffer pH7.4 (4°C)

**PBS\*<sub>AK-Färbung</sub> (10x):**

1.75M NaCl, 18.6mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>(H<sub>2</sub>O), 84.1mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>(2H<sub>2</sub>O), pH7.4

**PBS\*<sub>In situ</sub> (10x):**

1.3M NaCl, 70mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>(2H<sub>2</sub>O), 30mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>(H<sub>2</sub>O), pH7.4

**PBT<sub>In situ</sub>:**

0.1% Tween20 in 1x PBS<sub>In situ</sub>

**PBX<sub>BSA</sub>:**

0.1% (v/v) TritonX-100, 0.1% (w/v) Albumin Fraktion V in 1x PBS<sub>AK-Färbung</sub>

**PBX<sub>0.5%</sub>:**

0.5% (v/v) TritonX-100 in 1xPBS<sub>AK-Färbung</sub>

**PEM\*:**

100mM PIPES, 1mM EGTA, 1mM MgCl<sub>2</sub>, pH7.1

**Puffer 1 zur Herstellung kompetenter Bakterien (sterilfiltriert):**

30mM Kaliumacetat, 100mM RbCl, 10mM CaCl<sub>2</sub>, 50mM MnCl<sub>2</sub> (Zugabe erst nach Einstellen des pH-Wertes), 15% (v/v) Glycerol (Zugabe erst nach Einstellen des pH-Wertes), pH5.8

**Puffer 2 zur Herstellung kompetenter Bakterien (sterilfiltriert):**

10mM MOPS, 75mM CaCl<sub>2</sub>, 10mM RbCl, 15% (v/v) Glycerol (Zugabe erst nach Einstellen des pH-Wertes), pH6.5

**Puffer PI (Dot Blot):**

150mM NaCl, 100mM Tris-HCl (pH7.5)

**Puffer PII (Dot Blot) :**

0.5% Blocking-Reagenz (in 10%igem Maleinsäurepuffer gelöst, autoklaviert, bei -20°C gelagert) in PI-Puffer bei 60°C gelöst

**Puffer PIII (Dot Blot):**

100mM NaCl, 50mM MgCl<sub>2</sub>, 100mM Tris-HCl (pH9.5)

**SOB\*:**

2% (w/v) Trypton, 0.5% (w/v) Hefeextrakt, 8.6mM NaCl, 2.5mM KCl, 10mM MgCl<sub>2</sub>  
(Zugabe nach Autoklavieren)

**SOC\*:**

20mM Glukose in SOB (Zugabe nach Autoklavieren)

**Spectinomycinstammlösung** (-20°C, aliquotiert):

100mg/ml Spectinomycindihydrochloridpentahydrat in H<sub>2</sub>O

**SSC (20x):**

3M NaCl, 0.3M Na-Citrat, pH7

**Stopp-Lade-Puffer (6x):**

1mM EDTA, 10mM Tris-HCl (pH8.0), 0.1% (w/v) SDS, 30% (v/v) Glycerol,  
0.25% (w/v) Bromphenolblau, 0.25% (w/v) Xylencyanol

**TAE-Puffer (10x):**

400mM Tris-HCl (pH7.4), 200mM Natriumacetat, 10mM EDTA

**TBE-Puffer:**

90mM Tris-HCl, 90mM Natriumtetraborat Decahydrat, 10mM EDTA

**TENS:**

10mM Tris-HCl (pH 8.0), 1mM EDTA, 100mM NaOH, 0.5% (w/v) SDS

**TE-Puffer\*** (pH8.0):

10mM Tris-HCl, 1mM EDTA

**TNB:**

0.1M Tris-HCl (pH7.5), 0.15M NaCl, 0.5% (w/v) "Blocking-Reagenz" (TSA-Kit)

### 3.1.6 Oligonukleotide (Primer)

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')	Schmelztemperatur (2°C+4°C Regel)
10036-1	TCGCACCTCGGTTTCTTCTAC	64°C
10036-2	GGCAATAGTTATTCCACCGATC	64°C
byn1	G TTCCTGGTGGCAAGGCAGAG	68°C
byn2	AGATGTTGCGGCCACTGCACAC	70°C
CG34115-F1	TTGGTAGCTCGCCTGGCAATG	66°C
CG34115-R1	TTGGTAGCTCGCCTGGCAATG	66°C
CG34115-F2	CACGCCAATAGATGGAGCTTAG	66°C
CG34115-R2	CCAAGAGCGCCATCTATTGTTC	66°C
drxG1for	TCAATATGGCGGCTGACGATTAATCAACGC	88°C
drxG1rev	AACTAACTGCACTTACTGCCCTACGCCAGATG	100°C
drxG2for	ATAATCCTTGTGGCATGGCAGTCAGTACATGTTG	98°C
drxG2rev	TGAGTTTACCATACACACGCATTGGAGATACACC	102°C
otpGT3*	<u>GGCGCGCCTCAA</u> AATAGGGCTTAAAACA	84°C
otpGT4*	<u>GGCGCGCCATA</u> AAACAGAATGCGTGCCAG	90°C
otpGT5*	<u>GCGGCCGCTG</u> AGGGTCACGATGACACTAG	96°C
otpGT6*	<u>GGTACCTGTA</u> AGGATAATAGCGTAAGGAG	84°C
otpGT7*	<u>GGCGCGCCCC</u> ACCATGACGATCACATG	94°C
otpGT8	<u>CGTACGAGCT</u> GAGTCCGGAGGAGCAC	86°C
otpGT9	TTCTGACTCAGCAGGAATAGGG	53°C
otpGT10	TTTGT CAGCCAGCTTACTAAGAGAC	53°C
otpG1for	AGAAGAACGCCTGTAGGATGCAGAGGGATG	92°C
otpG1rev	AAGTGGTTGCTAGAGCGGGTCGGCTATACTC	96°C
otpG1rev2	CTGTTTAATTGATAGCATTTTTTACACTTCGGGCAC	96°C
otpG2for	ACAAAATAGGCGAAATGAGCACTAGGAGCGG	92°C
otpG2rev	TTTTGTCACTGCCTTTCATTTGATTGCGCG	86°C
otp4for	CAAATTACACCCGAGCTCACCAG	70°C
otp4rev	TTTGAATGCCTGGCATGAGCATG	68°C
otp5for	ACTTTTACCCCCTCGAAATTTAACG	70°C
otp5rev	CGACAAATACATACAGCTAAATCGGG	74°C
otp6for	AAAAGTGATGCATATGCTCTAATAAG	68°C
Gtotp0	GAGCAGCCCAGATTCCATGC	64°C
Gtotp5	CGTCCGGCACTTTGGCACG	64°C
ple1	CGGTCTCACCGAGGACGAG	64°C
ple2	GGTATGGTGAGTTAACGTGG	60°C
Pros1	TCGTGTGGCAGTCTGGCAACC	68°C
Pros2	AAATATATGGCCTGTGACCCTTG	66°C

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')	Schmelztemperatur (2°C+4°C Regel)
Pros4	GACCCTTAATCAATAATAATGCATCC	70°C
Pros5	AGGGTCACAGGTATATTTAAC	66°C
pW25I	GAGTGCCGTTTACTGTGCG	60°C
pW25II	CGTGCTCATCGCGAGTACG	62°C
Reaper1	GTCATTGAATAAGAGAGACACC	62°C
Reaper2	GCAATTTTTAGCCAACCTTCGAC	62°C
TAR <sup>1)</sup>	GAGCTCGGATCCACTAGTAACG	68°C
TAU <sup>2)</sup>	GGCCCTCTAGATGCATG	54°C

\*angefügte Restriktionsschnittstellen sind durch unterstrichene Sequenzen dargestellt

<sup>1)</sup>IRD-800 gekoppelt; <sup>2)</sup>IRD-700 gekoppelt

### 3.1.7 Vektoren

Bezeichnung	Vektorkarte	Verwendung
pCR <sup>®</sup> II-TOPO <sup>®</sup> (Invitrogen)		Klonierung von PCR-Produkten
pCR <sup>®</sup> -XL-TOPO <sup>®</sup> (Invitrogen)		Klonierung von großen PCR-Produkten (3-10kb)
pCR <sup>®</sup> 8/GW/TOPO <sup>®</sup> (Invitrogen)		Klonierung von PCR-Produkten für Gateway-Klonierungen

Bezeichnung	Vektorkarte	Verwendung
pBPGUw (Pfeiffer et al., 2008)		Reportergenanalysen
pBPGw (Pfeiffer et al., 2008)		Reportergenanalysen
pHPelican		Reportergenanalysen
pRed H-Stinger		In vivo Analysen

### 3.1.8 Kits

Bezeichnung	Bezugsquelle
QIAGEN Plasmid Midi Kit	Qiagen GmbH (Hilden)
QIAGEN Large Construct Kit	Qiagen GmbH (Hilden)
peqGOLD Plasmid Miniprep Kit	Peqlab Biotechnologie GmbH (Erlangen)
peqGOLD Gel Extraction Kit	Peqlab Biotechnologie GmbH (Erlangen)
SequiTherm EXCEL™ II DNA-Sequencing Kit LC	Biozym Scientific GmbH (Hessisch Oldendorf)
pCR®8/GW/TOPO® TA Cloning Kit	Invitrogen GmbH (Darmstadt)
TOPO® TA Cloning® Kit	Invitrogen GmbH (Darmstadt)
TOPO® XL PCR Cloning Kit	Invitrogen GmbH (Darmstadt)
TSA™ Fluorescein System	PerkinElmer (Rodgau)

### 3.1.9 Geräte

Gerät	Bezugsquelle
Bio-rad Photometer SmartSpec™ 3000	Bio-rad (München)
Bio-rad My cycler™ Thermal Cycler	Bio-rad (München)
Bio-rad Power-Supply	Bio-rad (München)
Brutschrank	Memmert (Schwabach)
UV-Crosslinker	Biostep (Jahnsdorf)
Eppendorf 5415R Kühlzentrifuge	Eppendorf (Hamburg)
Eppendorf Concentrator 5301	Eppendorf (Hamburg)
Eppendorf FemtoJet	Eppendorf (Hamburg)
Eppendorf MasterCycler personal	Eppendorf (Hamburg)
Eppendorf miniSpin plus Tischzentrifuge	Eppendorf (Hamburg)
Fluoreszenz-Binokular SZX12	Olympus (Hamburg)
Fluoreszenzmikroskop BX 61	Olympus (Hamburg)
Gel-Elektrophorese-System	Peqlab (Erlangen)
Heizschrank Celsius 2000	Memmert (Schwabach)
Kamera CC-12	Olympus (Hamburg)
LI-COR 4300 DNA-Analyser	LI-COR (Bad Homburg)
Mikromanipulator	Leitz (Wetzlar)
Mikroskop Axiovert 25	Zeiss (Oberkochen)
Nadelzieher	GETRA (München)
Peqlab Multi-Shaker Rotator RS-24	Peqlab (Erlangen)
QLC-100 konfokales Mikroskop	Visitech International (Sunderland, UK)
Schüttelinkubator Unitron	INFORS (Einsbach)
Sorvall® Evolution RC-Kühlzentrifuge	Sorvall (Langenselbold)
Taumler Nutator	Becton Dickinson (Sparks, USA)
UV-Gel-Dokumentationssystem Intas Gel Jet Imager	Intas (Göttingen)

### 3.1.10 Bezugsquellen

#### Chemikalien:

Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe), Sigma Aldrich GmbH (Seelze)

#### Enzyme und Feinchemikalien:

Biozym Scientific GmbH (Hessisch Oldendorf), Fermentas GmbH (St.Leon-Rot), GenScript (Piscataway, New Jersey), Invitrogen GmbH (Darmstadt), New England Biolabs (Ipswich, Massachusetts), Peqlab Biotechnologie GmbH (Erlangen), PerkinElmer (Rodgau), Qiagen GmbH (Hilden), Roche Applied Science (Mannheim), VectorLabs INC. (Burlingame, CA)

## 3.2 Methoden

### Molekularbiologische Methoden

#### 3.2.1 Herstellung chemisch kompetenter Zellen (Rubidiumchlorid-Methode)

Als „kompetent“ bezeichnet man Zellen, die mit geeigneten Methoden so vorbehandelt wurden, dass sie leicht in Lösung befindliche DNA aufnehmen können.

10ml LB-Medium wurden mit einer Kolonie von am Vortag ausgestrichenen *E. coli* DH5 $\alpha$ -angeimpft und über Nacht bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Am folgenden Tag wurden 200ml LB-Medium mit 2ml der Übernachtskultur angeimpft und so lange bei 37°C unter Schütteln inkubiert, bis eine OD<sub>600</sub> von 0.5 bis 0.7 erreicht war, d.h. die Kultur sich in der logarithmischen Wachstumsphase befand. Die Zellen wurden in gekühlte Zentrifugenbecher überführt, 5min auf Eis inkubiert und danach 5min bei 4°C und 6000xg (Sorvall Evolution RC, SLA-1500-Rotor) zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Bakterienpellet in 80ml kaltem Puffer1 resuspendiert. Die Zellsuspension wurde 5min auf Eis inkubiert und anschließend 5min bei 4°C und 6000xg zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Bakterienpellet in 8ml kaltem Puffer2 resuspendiert. Die Zellen wurden zu 250 $\mu$ l in vorgekühlte Reaktionsgefäße aliquotiert, sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

#### Kompetenzkontrolle der DH5 $\alpha$ - Bakterien gemessen in Kolonienzahl/ $\mu$ g DNA:

Die Transformationseffizienz sollte ca.  $1 \times 10^7$  Kolonien/ $\mu$ g DNA betragen.

Für die Transformation von je 100 $\mu$ l Bakterien wurde Plasmid-DNA in verschiedenen Verdünnungsstufen eingesetzt: 10ng, 1ng, 100pg und 10pg.

Anschließend wurden die Transformationsansätze auf antibiotikumhaltigen Agarplatten (entsprechend der Resistenz des Plasmid-Vektors) ausplattiert und die Kolonien am nächsten Tag ausgezählt. Zusätzlich wurden 100 $\mu$ l Bakterien ohne Plasmid als Negativkontrolle ausplattiert. Eine Transformationseffizienz von  $1 \times 10^7$  Kolonien/ $\mu$ g DNA liegt vor, wenn ca. 100 Klone bei der kleinsten DNA-Menge (10pg) erhalten werden.

#### 3.2.2 Restriktionsverdau

Die Reaktionsbedingungen eines Restriktionsverdaus sind für jedes Enzym spezifisch. Die Puffer- und Temperaturbedingungen wurden den Herstellerangaben entsprechend gewählt. Testverdaus wurden eine Stunde, präparative Verdaus drei Stunden inkubiert. Verwendet wurden Enzyme der Firmen Fermentas GmbH und New England Biolabs.

### 3.2.3 Elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten in Agarosegelen

Soweit nicht anders beschrieben wurden 1%ige Agarosegele verwendet. Die Agarose wurde mit 1xTAE aufgekocht und die Agarose-Lösung nach kurzem Abkühlen luftblasenfrei in eine entsprechende Kammer mit Kamm gegossen. Nach dem Polymerisieren des Gels wurde die Gelkammer mit 1xTAE gefüllt, der Kamm wurde herausgezogen und die vorbereiteten DNA-Proben (DNA + 1/5 Volumen 6xStopp-Lade-Puffer) in die Geltaschen pipettiert. Die Proben wurden unter einer konstant angelegten Spannung (80-130V, je nach Größe des Gels) aufgetrennt. Nach Beendigung der Auftrennung wurde das Gel 15min in Ethidiumbromid-Lösung (0.1% Ethidiumbromid-Stammlösung in 1xTAE) gefärbt und mit Hilfe des INTAS-Geldokumentationssystems im UV-Licht fotografiert und ausgewertet.

### 3.2.4 DNA-Isolierung aus Agarosegelen

DNA-Fragmente wurden mit Hilfe des peqGOLD Gel Extraction Kit der Firma Peqlab aus Agarose-Gelen isoliert. Die Durchführung erfolgte dabei nach der Arbeitsanleitung des Herstellers.

### 3.2.5 Dephosphorylierung mit rAPid Alkaline Phosphatase

Linearisierte Vektor-DNA wurde dephosphoryliert um eine Religation des Vektors während der Ligation mit Fremd-DNA zu verhindern. Dazu wurden 17µl des entsprechenden Verdau (1µg DNA) mit 2µl 10x Phosphatasepuffer und 1µl rAPid Alkaline Phosphatase versetzt und 30min bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde 3min bei 75°C abgestoppt und direkt für die Ligation eingesetzt.

### 3.2.6 Ligation

Unter Ligation versteht man die enzymatische Verknüpfung der Enden zweier Nukleinsäure-Moleküle mit Hilfe einer Ligase. DNA-Ligasen katalysieren unter Abspaltung von ATP die Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen einer freien 5'-Phosphat-Gruppe und einer im gleichen Strang eines doppelsträngigen DNA-Moleküls gegenüberliegenden freien 3'-Hydroxylgruppe.

Für die Ligation wurde verdaute, dephosphorylierte Vektor-DNA mit isolierter Fremd-DNA (in einem Konzentrationsverhältnis von 1:3), 1µl T4-Ligase und 1µl 10xLigasepuffer in einem Gesamtvolumen von 10µl 3h bei 24°C inkubiert. Nach anschließender 10-minütiger Inkubation bei 65°C wurde der gesamte Ligationsansatz zur Transformation in chemisch kompetente Zellen verwendet.

### 3.2.7 Transformation von Plasmid-DNA in chemisch kompetente Bakterienzellen

Bei der Transformation von Bakterienzellen wird isolierte DNA durch einen kurzen Hitzeschock in kompetente Wirtszellen eingeschleust.

Pro Transformationsansatz wurden 100µl bei -80°C gelagerte, kompetente Zellen auf Eis aufgetaut. Der komplette Ligationsansatz (10µl) wurde zugegeben und sanft mit den Bakterien vermischt. Das Gemisch wurde 30min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien 90s einem Hitzeschock von 42°C ausgesetzt und sofort weitere 5min auf Eis inkubiert. Zu dem Ansatz wurden 250µl SOC-Medium gegeben und 45min bei 37°C und 200rpm im Schüttelinkubator geschüttelt. Die Bakterien wurden je nach Antibiotikum-resistenz des Plasmids auf den entsprechenden LB-Agarplatten ausplattiert. Die Platten wurden umgedreht über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Am folgenden Tag konnten die gewachsenen Einzelklone in 2ml LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum angeimpft und anschließend analysiert werden.

### 3.2.8 Klonierung mit dem TOPO<sup>®</sup> TA Cloning<sup>®</sup> Kit (Invitrogen)

PCR-Amplifikate unter 3kb wurden mit dem TOPO<sup>®</sup> TA Cloning<sup>®</sup> Kit der Firma Invitrogen kloniert. Der darin enthaltene Vektor pCR<sup>®</sup> II-TA-TOPO<sup>®</sup> liegt linearisiert vor, hat 3'T-Überhänge und an die 3'-Enden ist das Enzym Topoisomerase I kovalent gebunden. Die Topoisomerase I kann aufgrund ihrer Ligationseigenschaften das PCR-Amplifikat, das durch die *Taq*-Polymerase erzeugte 3'A-Überhänge besitzt, direkt mit dem Vektor ligieren (Shuman, 1994). Dies ermöglicht eine schnelle und effiziente Klonierung.

PCR-Amplifikate, die bei Auftrennung im Agarose-Gel keine einzelnen Banden ergaben, wurden zuvor mit dem peqGOLD Gel Extraction Kit reisoliert. Für die TOPO-Klonierung wurden 0.5µl bis 4µl PCR-Amplifikat mit 1µl „Salt-Solution“ in einem Gesamtvolumen von 5µl vermischt. Zuletzt erfolgte die Zugabe von 1µl des TOPO<sup>®</sup>-Vektors. Der Ansatz wurde vorsichtig gemischt und 5min bei RT inkubiert. 2µl des Ansatzes wurden zu 50µl *E. coli* One Shot<sup>®</sup> TOP10F' Zellen gegeben, sanft vermischt und 30min auf Eis inkubiert. Es folgte ein Hitzeschock von 30s bei 42°C. Danach wurden 250µl SOC-Medium zugegeben und das Reaktionsgefäß horizontal 1h lang bei 37°C und 200rpm im Schüttelinkubator geschüttelt. Der Ansatz wurde anschließend auf LB-Agarplatten mit Kanamycin (50µg/ml) ausplattiert und über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Am folgenden Tag konnten die gewachsenen Einzelklone in 2ml LB-Medium mit Kanamycin (50µg/ml) angeimpft und anschließend analysiert werden.

### 3.2.9 Klonierung mit dem TOPO<sup>®</sup> XL PCR Cloning Kit (Invitrogen)

Das TOPO<sup>®</sup> XL PCR Cloning Kit ermöglicht eine effiziente Klonierung von großen PCR-Produkten (3-10kb). Das Prinzip dieser Klonierung entspricht dem des TOPO<sup>®</sup> TA Cloning<sup>®</sup> Kits (3.2.8).

Der pCR<sup>®</sup>-XL-TOPO<sup>®</sup> Vektor erlaubt jedoch eine direkte Selektion von Rekombinanten durch Zerstörung des letalen *E. coli*-Gens *ccdB* (Bernard et al., 1994). Der Vektor enthält das *ccdB* Gen fusioniert an den C-Terminus des LacZ $\alpha$  Fragmentes. Das CcdB-Protein interferiert mit der DNA-Gyrase (Bernard und Couturier, 1992) und hemmt das Wachstum der meisten *E. coli* Stämme (z.B. DH5 $\alpha$ , TOP10). Die Ligation eines großen PCR-Produktes verhindert die Expression dieses *lacZ $\alpha$ -ccdB* Genes, so dass nur positive Rekombinanten wachsen. Zellen, die nicht-rekombinante Vektoren enthalten, sterben ab.

Für die TOPO<sup>®</sup>-Klonierungsreaktion wurden 4 $\mu$ l des PCR-Produktes mit 1 $\mu$ l pCR<sup>®</sup>-XL-TOPO<sup>®</sup> Vektor vorsichtig vermischt und 5min bei RT inkubiert. Es wurde 1 $\mu$ l 6x TOPO<sup>®</sup> Cloning Stop Solution zugegeben und gemischt. 2 $\mu$ l dieser Reaktion wurden zu 50 $\mu$ l One Shot<sup>®</sup> TOP10F' Zellen gegeben, vorsichtig gemischt und 30min auf Eis inkubiert. Es folgte ein Hitzeschock von 30s bei 42°C und eine 2-minütige Inkubation auf Eis. Nach Zugabe von 250 $\mu$ l SOC-Medium wurden die Reaktionsgefäße für eine Stunde bei 37°C und 200rpm horizontal im Schüttelinkubator geschüttelt. Der Ansatz wurde auf LB-Agarplatten mit Kanamycin (50 $\mu$ g/ml) ausplattiert und über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Am folgenden Tag konnten die gewachsenen Einzelklone in 2ml LB-Medium mit Kanamycin (50 $\mu$ g/ml) angeimpft und anschließend analysiert werden.

### 3.2.10 Klonierung mit dem pCR<sup>®</sup>8/GW/TOPO<sup>®</sup> TA Cloning Kit (Invitrogen)

Das pCR<sup>®</sup>8/GW/TOPO<sup>®</sup> TA Cloning Kit ermöglicht eine schnelle und effiziente Klonierung von PCR Produkten. Darüber hinaus ist der Vektor pCR<sup>®</sup>8/GW/TOPO<sup>®</sup> durch das Vorhandensein von flankierenden attL1 und attL2 Stellen ideal geeignet für eine „Gateway“-Klonierung in verschiedene Zielvektoren.

Das Prinzip dieser Klonierung entspricht dem des TOPO<sup>®</sup> TA Cloning<sup>®</sup> Kits (3.2.8) und wurde auch entsprechend durchgeführt. Die einzigen Änderungen sind die Transformation in Mach1-Zellen und das Ausplattieren auf LB-Agar-Platten mit Spectinomycin (100 $\mu$ g/ml) aufgrund der Antibiotikumresistenz des Vektors. Am folgenden Tag konnten die gewachsenen Einzelklone in 2ml LB-Medium mit Spectinomycin (100 $\mu$ g/ml) angeimpft und anschließend analysiert werden.

### 3.2.11 Klonierung mit Gateway® LR Clonase™ II Enzym Mix

Die Gateway-Technologie beschreibt eine Klonierungsmethode, die auf der sequenz-spezifischen Rekombination des Lambda Phagen basiert (Landy, 1989), und somit die Einschränkungen der traditionellen Restriktionsenzym-basierten Klonierungsmethode umgeht.

Die Lambda-basierte Rekombination besteht aus zwei Hauptkomponenten: den Rekombinationssequenzen („attachment sites“) und einem Protein, das die Rekombinationsreaktion katalysiert (Clonase). Die „attachment (*att*) sites“ dienen dabei als Bindestelle für die Rekombinationsproteine.

Die wildtypischen „*att*-sites“ wurden in der Gateway-Technologie modifiziert, um die Effizienz und Spezifität der Rekombinationsreaktion zu erhöhen.



**Abb.3.1. LR-Clonase-Reaktion.** Die LR-Clonase katalysiert eine Rekombination zwischen einem Entry-Klon, der ein Gen von Interesse flankiert von „*attL* sites“ enthält und einem Zielvektor, der das *ccdB*-Gen flankiert von „*attR* sites“ enthält. Dadurch kommt es zur Bildung eines Expressionsklons, der das Gen von Interesse im Zielvektor flankiert von „*attB* sites“ enthält und eines Nebenprodukts aus dem Entry-Vektor und dem *ccdB*-Gen (aus Gateway®Technology, Version E, Mai 2010, Invitrogen).

Bei der LR-Reaktion führt eine Rekombination zwischen den „*attL* sites“ des Entry-Klons und den „*attR* sites“ des Zielvektors zur Bildung von „*attB* sites“ im Expressionsklon. Diese Reaktion wird von einem LR-Clonase™ Enzym Mix katalysiert (Abb.3.1).

Die meisten Gateway-Zielvektoren enthalten das *ccdB*-Gen zwischen den „*att* sites“, da dies eine negative Selektion erlaubt. Das CcdB-Protein interferiert mit der DNA-Gyrase (Bernard und Couturier, 1992) und hemmt das Wachstum der meisten *E. coli*-Stämme (z.B. DH5 $\alpha$ , TOP10). Findet eine Rekombination zwischen dem Entry-Klon und dem Zielvektor statt, wird das *ccdB*-Gen durch das Gen von Interesse ersetzt.

In dieser Arbeit wurden die Entry-Klone ausschließlich durch Klonierung mit dem pCR®8/GW/TOPO® TA Cloning Kit (Invitrogen) (3.2.10) erzeugt. Zielvektoren waren pBPGUw und pBPGw (Pfeiffer et al., 2008).

Es wurde folgende Clonase-Reaktion angesetzt: 50ng Entry-Klon, 50ng Zielvektor und 1 $\mu$ l LR-Clonase in einem Gesamtvolumen von 5 $\mu$ l. Die Reaktion wurde 1 Stunde bei RT inkubiert und durch 10min Inkubation mit 0.5 $\mu$ l Proteinase K (2 $\mu$ g/ $\mu$ l) bei 37°C abgestoppt. Für die anschließende Transformation wurden 2 $\mu$ l der Clonase-Reaktion zu 50 $\mu$ l TOP10F'

Zellen gegeben und 30min auf Eis inkubiert. Nach 30s Hitzeschock bei 42°C wurden die Zellen auf Eis überführt, 250µl SOC Medium zugegeben und eine Stunde bei 37°C und 200rpm horizontal im Schüttelinkubator geschüttelt. Der Ansatz wurde auf LB-Agar mit Ampicillin (100µg/ml) ausplattiert und über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Am folgenden Tag konnten die gewachsenen Einzelklone in 2ml LB-Medium mit Ampicillin (100µg/ml) angeimpft und anschließend analysiert werden.

### **3.2.12 Plasmid-Isolierung mittels TENS-Miniprep (Alkalische Lyse)**

Bei der alkalischen Lyse bewirkt eine SDS/NaOH-Lösung eine Auflösung der Zellwand. Unter diesen alkalischen Bedingungen kommt es zur Denaturierung der chromosomalen und der Plasmid-DNA. Bei der folgenden Zugabe von Natriumacetat werden die chromosomale DNA und andere zelluläre Bestandteile präzipitiert. Die Plasmid-DNA wird wieder in die supercoiled-Form überführt und befindet sich im Überstand.

2ml LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum wurden mit einer Bakterienkolonie angeimpft und mindestens sechs Stunden bei 37°C und 230rpm im Schüttelinkubator inkubiert. 1.5ml dieser Kultur wurden in ein Reaktionsgefäß überführt und für 2min bei 13000xg zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und die Bakterien in 50µl P1 (Qiagen) resuspendiert. Anschließend wurden 300µl TENS und 150µl 3M Natriumacetat (pH 5.2) zugegeben und gut gemischt. Das Gemisch wurde 3min bei 13000xg in einer Eppendorf Tischzentrifuge abzentrifugiert und der Überstand in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Zu dem Überstand wurde 1ml eiskaltes 100% Ethanol gegeben und wiederum 2min bei 13000xg zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und 500µl 70% Ethanol zum DNA-Pellet gegeben. Nach 2-minütiger Zentrifugation bei 13000xg wurde der Überstand dekantiert und das Pellet nach dem Trocknen im Rotationsverdampfer (Eppendorf Concentrator 5301) in 30-50µl sterilem H<sub>2</sub>O<sub>deion.</sub> aufgenommen.

### **3.2.13 Plasmid-Isolierung mittels peqGOLD Plasmid Miniprep Kit**

Zur Gewinnung kleinerer Mengen reiner DNA wurde eine Plasmid-Isolierung mittels peqGOLD Plasmid Miniprep Kit durchgeführt. Dazu wurde aus einer 5ml Übernachtskultur Plasmid-DNA gemäß den Angaben des Herstellers isoliert.

### **3.2.14 Plasmid-Isolierung mittels QIAGEN Plasmid Midi Kit**

Zur Gewinnung größerer Mengen reiner DNA wurde eine Plasmid-Isolierung in größerem Maßstab mittels Plasmid Midi Kit durchgeführt. Auch diese Methode beruht auf dem Prinzip der alkalischen Lyse. Dazu wurde aus einer 250ml Übernachtkultur gemäß den Angaben des Herstellers Plasmid-DNA isoliert.

### **3.2.15 Plasmid-Isolierung großer DNA Fragmente mittels QIAGEN Large Construct Kit**

Das QIAGEN Large Construct Kit wurde für die Aufreinigung großer Konstrukte (bis zu 250kb) verwendet. Dazu wurden aus einer 500ml Übernachtkultur reine Plasmid-DNA entsprechend der Angaben des Handbuchs isoliert.

### **3.2.16 Isolierung genomischer DNA aus Fliegen**

Fünfzehn Fliegen wurden mit CO<sub>2</sub> betäubt, in einem Reaktionsgefäß auf Eis gesammelt und für 30min bei -20°C eingefroren. Anschließend wurden die Fliegen in 200µl Lysispuffer mit einem Mikropistill gründlich zerrieben. Nach 30min Inkubation bei 65°C wurden 400µl LiCl/Kaliumacetat-Lösung (RT) zugegeben, gründlich gemischt und mindestens 10min auf Eis inkubiert. Danach wurde der Ansatz 15min bei RT und 13000xg in einer Eppendorf Tischzentrifuge abzentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Zu diesem Überstand wurden 300µl Isopropanol gegeben, gut gemischt und das Gemisch 15min bei RT und 13000xg zentrifugiert. Das DNA-Pellet wurde mit 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und in 75µl TE durch sanftes Mischen gelöst.

### **3.2.17 Polymerasekettenreaktion (PCR)**

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) ist ein biotechnisches Verfahren zur Vermehrung eines DNA-Abschnitts außerhalb der Zelle. Dazu müssen flankierende Sequenzen des zu amplifizierenden DNA-Abschnitts bekannt sein, zu denen man chemisch komplementäre DNA-Oligonukleotide (Primer) synthetisiert. Als DNA-Polymerase verwendet man dabei die thermostabile *Taq*-Polymerase aus *Thermus aquaticus* oder die *Pfu*-Polymerase aus *Pyrococcus furiosus*. Die *Pfu*-Polymerase verfügt im Gegensatz zur *Taq*-Polymerase über eine Proofreading-Funktion.

Es wurde folgender Ansatz pipettiert:

1µg Template-DNA

5µl 10xPCR-Puffer mit Mg<sup>2+</sup> (GenScript) oder 10x*Pfu*-Puffer (Fermentas)

1µl dNTP-Mix (10mM, Fermentas)

1µl Primer 1 (50pmol/µl)

1µl Primer 2 (50pmol/µl)

1µl *Taq*-DNA-Polymerase (GenScript, 5U/µl) oder *Pfu*-Polymerase (Fermentas, 2.5U/µl)

ad. 50µl steriles H<sub>2</sub>O<sub>deion.</sub>

Reaktionsbedingungen:

Ereignis	Zeit	Temperatur	Zyklen
Denaturierung	3min	95°C	1
Denaturierung	1min	95°C	} 30
Annealing	1min	X°C	
Elongation	Ymin	72°C	
Endelongation	10min	72°C	1

Die verwendete Annealing-Temperatur X war dabei von den Schmelztemperaturen der verwendeten Primer abhängig, die Elongationszeit Y richtet sich nach der Länge der zu amplifizierenden DNA-Fragmente und der verwendeten DNA-Polymerase (~1min pro 1kb bei *Taq*- bzw. ~3min pro 1kb bei *Pfu*-Polymerase).

Für die Durchführung der Reaktionen wurden der Bio-rad My cycler<sup>TM</sup> Thermal Cycler oder der Eppendorf Mastercycler personal verwendet.

### 3.2.18 Sequenzierung von DNA

Plasmid-DNA wurde nach der Kettenabbruch-Methode (Sanger et al., 1977) sequenziert. Für die Sequenzierung wurde der SequiTherm EXCEL<sup>TM</sup> II DNA-Sequencing Kit der Firma BIOzym<sup>TM</sup> verwendet. Eingesetzt wurden fluoreszenzmarkierte Primer. Pro Sequenzierungsreaktion wurden vier Reaktionsgefäße vorbereitet, in denen 2µl G-Terminationsmix, A-Terminationsmix, T-Terminationsmix bzw. C-Terminationsmix vorgelegt wurde. Anschließend wurde ein Mastermix aus 300fmol Template-DNA, 7.2µl 3.5x Sequenzier-Puffer, 1µl Primer IRD700 (2pmol/µl), 1µl Primer IRD800 (2pmol/µl) und 1µl SequiTherm EXCEL<sup>TM</sup> II DNA-Polymerase (5U/µl) zusammenpipettiert und mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> auf 17µl aufgefüllt. Jeweils 4µl dieses Mastermixes wurden zu den verschiedenen Stopp-Nukleotiden gegeben.

Die Sequenzier-PCR wurde nach folgendem Programm im Bio-rad My cycler™ Thermal Cycler durchgeführt:

Ereignis	Zeit	Temperatur	Zyklen
Denaturierung	5min	95°C	1
Denaturierung	30sec	95°C	} 30
Annealing	30sec	62°C	
Elongation	60sec	72°C	

Nach Beendigung der PCR wurden zu jedem Ansatz 3µl Stopp-/Ladepuffer gegeben, die Reaktionsansätze 5min bei 95°C denaturiert und auf ein Polyacrylamid-Sequenziergel aufgetragen.

Zur Herstellung des Sequenziergels wurden 29ml Rapidgel XL (40%), 105g Harnstoff, 25ml 10xTBE und 150ml H<sub>2</sub>O gemischt. Diese Gel-Stammlösung ist für fünf 40cm-Gele ausreichend und wurde bei 4°C gelagert. Kurz vor dem Gießen eines Gels wurden 40ml der Stammlösung filtriert, und es wurden 30µl TEMED und 292µl 10% APS zugegeben, die ein Auspolymerisieren der Gelmatrix verursachen.

Die Elektrophorese erfolgte bei 1500V/50W in 1xTBE-Laufpuffer über 6 bis 10 Stunden in einem automatischen Sequenzierapparat (LI-COR 4300 DNA-Analyzer). Die Auswertung der Sequenzen erfolgte mit Hilfe der LI-COR-Software (Programm e-Seq).

### 3.2.19 Herstellung einer Digoxigenin-markierten DNA-Sonde

Zur Herstellung einer DNA-Sonde wurden 100ng einer gewünschten reisolierten cDNA mit 5µl Random Primer (p(dN)<sub>6</sub>) (0.2mg/ml) in einem Gesamtvolumen von 12µl 5min aufgeköcht. Nachdem dieser Mix im Eiswasserbad abgekühlt war, wurden 2µl 10xKlenow-Puffer, 2µl dATP dCTP dGTP Mix (alle 1mM), 1.3µl dTTP (1mM), 0.7µl Dig-UTP (1mM), 0.5µl H<sub>2</sub>O und 1.5µl Klenow-Fragment (2U/µl) zugegeben. Es erfolgte eine Inkubation bei 14°C über Nacht.

Am nächsten Tag wurde 1µl Klenow-Fragment zugegeben und erneut für 4h bei RT inkubiert. Durch Zugabe von 20µl 0.1M EDTA-Lösung und 10min Inkubation bei 65°C wurde die Enzymreaktion abgestoppt. Zur Fällung der DNA wurden 1/10 Volumen 3M LiCl, 0.04µg Glycogen und 3.5 Volumen 100% Ethanol (eiskalt) zugegeben und über Nacht bei -20°C inkubiert. Die gefällte DNA wurde 30min bei 4°C und 13000xg abzentrifugiert, mit 70% Ethanol gewaschen und nach dem Trocknen in 100µl HybMix aufgenommen.

### 3.2.20 Kontrolle der Sonden (Dot Blot)

Um zu überprüfen, ob die Markierung der Sonden (3.2.19) erfolgreich war, wurden diese einem sogenannten Dot Blot unterzogen, bevor sie für *in situ* Hybridisierungen eingesetzt wurden. Die Digoxigenin- (Dig-) markierten Sonden wurden in 2xSSC 1:10, 1:100 und 1:1000 verdünnt. Je 1µl der unverdünnten Sonde sowie der verschiedenen Verdünnungsstufen wurden in einem Raster auf eine Nylonmembran pipettiert. Durch 2min Bestrahlung mit UV-Licht in einem UV-Crosslinker wurde die DNA mit der Nylonmembran fest verbunden. Die Membran wurde kurz in Puffer PI gespült und dann 30min in Puffer PII inkubiert. Nach kurzem Waschen in Puffer PI erfolgte eine 30min Inkubation mit einem AP-gekoppelten Anti-Dig-Antikörper (1:2000 in Puffer PI). Die Membran wurde zweimal 15min in Puffer PI gewaschen und 2min in Puffer PIII äquilibriert. Nun erfolgte eine Inkubation mit Puffer PIII mit 4,5µl NBT (10mg/ml) und 3,5µl BCIP (50mg/ml) pro ml bis zu einer Farbentwicklung. Gute Sonden zeigen nach spätestens 5min in allen Verdünnungsstufen ein Signal.

## Histologische Methoden

### 3.2.21 Antikörperfärbungen an *Drosophila*-Embryonen

*Drosophila*-Embryonen sind von zwei Schutzhüllen umgeben, der inneren Vittelinmembran und dem äußeren Chorion, welche beide beim Fixieren entfernt werden müssen. Zum Absammeln von Embryonen wurden die Fliegen in luftdurchlässigen Gelegebechern auf mit Hefe bestrichene Apfelsaftplatten gesetzt. Die Apfelsaftplatten mit den abgelegten Embryonen wurden 2min mit Natriumhypochloridlösung überschichtet, dadurch wird das Chorion entfernt. Die dechorionierten Embryonen wurden in ein Netzchen überführt und mit Embryonenwaschlösung mehrmals gespült. Anschließend wurden die Embryonen in ein Reaktionsgefäß mit einem Zwei-Phasen-Gemisch aus 750µl PEM mit 3.7% Formaldehyd und 750µl Heptan überführt und durch 12min schnelles Rotieren (Peqlab Multi-Shaker Rotator RS-24) fixiert. Beide Phasen wurden abgenommen, 750µl Heptan und 750µl Methanol zugegeben und 2min kräftig geschüttelt. Dadurch wird die Vittelinmembran zerstört, die Embryonen sinken ab. Die Embryonen wurden dreimal mit Methanol gewaschen und direkt zur Antikörperfärbung eingesetzt oder bei -20°C gelagert.

Fixierte Embryonen wurden dreimal gespült und viermal 30min auf dem Taumler mit PBX<sub>BSA</sub> gewaschen. Anschließend wurden unspezifische Bindungsstellen durch 30minütige Inkubation mit TNB abgeblockt und die Embryonen wurden mit dem in TNB verdünnten,

primären Antikörper (Verdünnung siehe 3.1.1.1) über Nacht bei 4°C bewegt inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Embryonen dreimal gespült und fünfmal 30min mit PBX<sub>BSA</sub> gewaschen und anschließend wieder 30min mit TNB geblockt. Die Inkubation mit den sekundären fluoreszenzgekoppelten Antikörpern (Verdünnung siehe 3.1.1.2) erfolgte zwei Stunden bei RT. Die Embryonen wurden dreimal gespült und siebenmal 30min mit PBX<sub>BSA</sub> gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurde das PBX<sub>BSA</sub> vollständig abgenommen, die Embryonen in Vectashield® Mounting Medium (VectorLabs) aufgenommen und auf einen Objektträger gegeben. Die Färbungen wurden an einem Fluoreszenzmikroskop (Olympus BX61) analysiert, die Aufnahmen erfolgten mit der Software CellP (Olympus), die Bildbearbeitung mit ImageJ und Adobe Photoshop.

### 3.2.22 Whole Mount *in situ* Hybridisierung an *Drosophila*-Embryonen

Zum Absammeln von Embryonen wurden die Fliegen in luftdurchlässigen Gelegebechern auf mit Hefe bestrichene Apfelsaftplatten gesetzt. Die Apfelsaftplatten mit den abgelegten Embryonen wurden 2min mit Natriumhypochloridlösung überschichtet. Die dechorionierten Embryonen wurden in ein Netzchen überführt und mit Embryonenwaschlösung mehrmals gespült. Anschließend wurden die Embryonen in ein Reaktionsgefäß mit einem Zwei-Phasen-Gemisch aus 750µl Fixativ *in situ* und 750µl Heptan überführt und durch 15min schnelles Rotieren (Peqlab Multi-Shaker Rotator RS-24) fixiert. Beide Phasen wurden abgenommen, 750µl Heptan und 750µl Methanol zugegeben und 3min kräftig geschüttelt. Dadurch wird die Vittelinmembran zerstört, die Embryonen sinken ab. Die Embryonen wurden dreimal mit Methanol gewaschen und direkt zur *in situ* Hybridisierung eingesetzt oder bei -20°C gelagert. Fixierte Embryonen wurden einmal in Methanol gespült und durch zweimaliges Spülen in 50% Methanol / 50% PBT<sub>insitu</sub> rehydriert. Danach wurden die Embryonen 20min in PBT mit 5% Formaldehyd fixiert und dreimal 5min in PBT<sub>insitu</sub> gewaschen. Die Embryonen wurden 3min mit ProteinaseK (50µg/ml) bei 37°C verdaut und durch zweimaliges Spülen mit Glycinpuffer (2mg/ml in PBT<sub>insitu</sub>) wurde der Verdau abgestoppt. Nach zweimal 5min Waschen in PBT<sub>insitu</sub> folgte wieder eine 20minütige Fixierung in PBT<sub>insitu</sub> mit 5% Formaldehyd. Dann wurden die Embryonen fünfmal 5min in PBT<sub>insitu</sub> gewaschen. Zur Prähybridisierung des Antikörpers wurden so behandelte Embryonen über Nacht bei 4°C mit einem Alkalische-Phosphatase- (AP-) gekoppelten Anti-Digoxigenin-Antikörper (1:200 in PBT<sub>insitu</sub> verdünnt) inkubiert. Die Embryonen für die Hybridisierung wurden nun zweimal 10min in 50% PBT<sub>insitu</sub> / 50% HybMix sowie einmal 10min in HybMix gewaschen. Die Embryonen wurden 2h in HybMix bei 48°C (Wasserbad) prähybridisiert. Dig-markierte

Sonden (3.2.20) wurden 15min bei 95°C denaturiert, 1:10 mit HybMix verdünnt und zu den prähybridisierten Embryonen gegeben. Die Hybridisierung erfolgte bei 48°C über Nacht.

Am nächsten Tag wurden die Embryonen zweimal 2min und einmal 20min in HybMix, 20min in 50%HybMix / 50% PBT<sub>insitu</sub> und viermal 20min in PBT<sub>insitu</sub> bei 48°C gewaschen. Nach 20min Waschen in PBT<sub>insitu</sub> bei RT wurden die Embryonen zwei Stunden mit dem prähybridisierten AP-gekoppelten Anti-Dig-Antikörper (1:2000) bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Embryonen einmal 2min, einmal 10min und dreimal 20min in PBT<sub>insitu</sub> gewaschen. Die Embryonen wurden zweimal 2min in Färbepuffer äquilibriert und bis zu einer Farbentwicklung in 1ml Färbepuffer mit 4,5µl NBT (10mg/ml) und 3,5µl BCIP (50mg/ml) inkubiert. Nach erfolgter Farbentwicklung wurde die Färbereaktion durch dreimal Spülen in PBT<sub>insitu</sub> abgestoppt und die Embryonen durch Spülen in einer aufsteigenden Alkoholreihe (30%, 50%, 70%, 90%, 100%) dehydriert. Die Embryonen wurden in einem Canadabalsam-Salicylat-Gemisch eingedeckt und unter einem Lichtmikroskop (Olympus BX61) mit Differentiellem Interphasenkontrast (DIC) und der Software CellP (Olympus) dokumentiert. Die Bildbearbeitung erfolgte mit Adobe Photoshop.

### 3.2.23 *In situ* Hybridisierung an larvalen Gehirnen

Gehirne von Larven des dritten Larvalstadiums wurden in 1xPBS freipräpariert und 20min in 4% Paraformaldehyd in 1xPBS unter Schütteln fixiert. Nach 5min Waschen in 1xPBS folgte ein erneuter Fixierschritt in 0.5% Glutaraldehyd in 1xPBS. Darauf folgten zwei Spülschritte in 1xPBS und zweimal 5min Waschen in PBT<sub>insitu</sub>. Die Gehirne wurden 3min bei 37°C mit ProteinaseK (50µg/ml in PBT<sub>insitu</sub>) verdaut und der Verdau durch zweimal 2min Waschen in 2mg/ml Glycin abgestoppt. Nach zweimal 5min Waschen in PBT<sub>insitu</sub> wurden die Gehirne erneut in 4% Paraformaldehyd in PBS fixiert. Es folgten fünfmal 5min Waschen in PBT<sub>insitu</sub>, 10min in 50% PBT<sub>insitu</sub> / 50% HybMix und 10min in HybMix. Die Gehirne wurden 1-2 Stunden in 100µl HybMix bei 48°C prähybridisiert. Dig-markierte Sonden (3.2.20) wurden 15min bei 95°C denaturiert, 1:10 mit HybMix verdünnt und zu den prähybridisierten Gehirnen gegeben. Die Hybridisierung erfolgte bei 48°C über Nacht.

Am nächsten Tag wurden die Gehirne einmal 2min und anschließend jeweils 20min in einer absteigenden HybMix-Reihe (80%, 60%, 40%, 20%, 0% in PBT<sub>insitu</sub>) bei 48°C gewaschen. Nach 20min Waschen mit PBT<sub>insitu</sub> bei RT folgte die Inkubation mit dem AP-gekoppelten Anti-Dig-Antikörper (1:2000) für zwei Stunden bei RT. Anschließend wurden die Gehirne viermal 20min in PBT<sub>insitu</sub> gewaschen. Die Gehirne wurden zweimal 2min in Färbepuffer äquilibriert und bis zu einer Farbentwicklung in 1ml Färbepuffer mit 4,5µl NBT (10mg/ml)

und 3,5µl BCIP (50mg/ml) inkubiert. Nach erfolgter Farbentwicklung wurde die Färbereaktion durch fünfmal Spülen in  $PBT_{in situ}$  abgestoppt. Die Gehirne wurden in 80% Glycerol eingebettet und unter einem Lichtmikroskop (Olympus BX61) mit der Software CellP (Olympus) dokumentiert. Die Bildbearbeitung erfolgte mit Adobe Photoshop.

### 3.2.24 Antikörperfärbungen an larvalen Gehirnen

Gehirne von Larven des dritten Larvalstadiums wurden in 1xPBS präpariert und auf Eis gesammelt. Die Gehirne wurden 1h in einer Mischung aus 3Volumen PBL und einem Volumen 8%igem Paraformaldehyd fixiert. Die Gehirne wurden dreimal mit 1xPBS gespült. Für eine spätere Färbung mit Anti-Neurotactin-Antikörpern wurden die Gehirne 5min mit Methanol inkubiert.

Die fixierten Gehirne wurden dreimal in  $PBX_{0.5\%}$  gespült und anschließend viermal 30min in  $PBX_{0.5\%}$  gewaschen. Nach 30min Blocken in TNB erfolgte die Inkubation mit den primären Antikörpern in TNB verdünnt (Verdünnung siehe 3.1.1.1) bei 4°C über Nacht. Am nächsten Tag wurden die larvalen Gehirne dreimal in  $PBX_{0.5\%}$  gespült und fünfmal 30min in  $PBX_{0.5\%}$  gewaschen. Nach 30min Blocken in TNB erfolgte die Inkubation mit den sekundären Antikörpern in TNB verdünnt (Verdünnung siehe 3.1.1.2) über Nacht bei 4°C. Nach dreimal Spülen und siebenmal 30min Waschen in  $PBX_{0.5\%}$  wurden die Gehirne in Vectashield® Mounting Medium (VectorLabs) eingebettet und unter einem Fluoreszenzmikroskop (Olympus BX61) analysiert. Die Aufnahmen erfolgten mit der Software CellP (Olympus), die Bildbearbeitung mit ImageJ und Adobe Photoshop.

### 3.2.25 Antikörperfärbungen an larvalem Enddarm

Enddarm von Larven des dritten Larvalstadiums wurde in 1xPBS präpariert und auf Eis gesammelt. Der Enddarm wurde 20min in 10% Formaldehyd in 1xPBS fixiert und dreimal mit 1xPBS gespült. Der fixierte Enddarm wurde dreimal in  $PBX_{BSA}$  gespült und anschließend viermal 30min in  $PBX_{BSA}$  gewaschen. Nach 30min Blocken in TNB erfolgte die Inkubation mit den in TNB verdünnten, primären Antikörpern (Verdünnung siehe 3.1.1.1) bei 4°C über Nacht. Am nächsten Tag wurde der larvale Enddarm dreimal in  $PBX_{BSA}$  gespült und fünfmal 30min in  $PBX_{BSA}$  gewaschen. Nach 30min Blocken in TNB erfolgte die Inkubation mit den in TNB verdünnten, sekundären Antikörpern (Verdünnung siehe 3.1.1.2) über Nacht bei 4°C. Nach dreimal Spülen und siebenmal 30min Waschen in  $PBX_{BSA}$  wurde der Enddarm in Vectashield® Mounting Medium (VectorLabs) eingebettet und unter einem Fluoreszenz-

mikroskop (Olympus BX61) analysiert. Die Aufnahmen erfolgten mit der Software CellP (Olympus), die Bildbearbeitung mit Adobe Photoshop.

### **3.2.26 Kernfärbungen mit DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol)**

DAPI ist eine DNA-interkalierende Substanz, die zur Färbung von Zellkernen verwendet wird und durch Anregung im UV-Bereich Cyanblau fluoresziert.

Mit Antikörpern gefärbte Embryonen (3.2.22) oder larvaler Enddarm (3.2.25) wurden vor dem Einbetten in Vectashield<sup>®</sup> Mounting Medium (VectorLabs) 2min mit DAPI-Lösung (1µg/ml) inkubiert. Anschließend wurde fünfmal mit PBX<sub>BSA</sub> gespült und einmal 30min in PBX<sub>BSA</sub> gewaschen. Die Embryonen oder larvaler Enddarm wurden in Vectashield<sup>®</sup> Mounting Medium (VectorLabs) eingebettet und unter einem Fluoreszenzmikroskop (Olympus BX61) analysiert. Die Aufnahmen erfolgten mit der Software CellP (Olympus), die Bildbearbeitung mit ImageJ und Adobe Photoshop.

### **3.2.27 Kutikulapräparation**

Mutante Fliegenstämme wurden zur Eiablage über Nacht in luftdurchlässigen Gelegebechern auf mit Hefe bestrichene Apfelsaftplatten gesetzt. Die Gelege wurden anschließend 24h bei 24°C inkubiert. Die kompletten Gelege (mit Embryonen und Larven) wurden 2min mit Natriumhypochloridlösung überschichtet. Die dechorionierten Embryonen und Larven wurden in ein Netzchen überführt und mit Embryonenwaschlösung mehrmals gespült. Embryonen wurden mit einer Präpariernadel auf einen Objektträger mit 50µl Hoyer's Medium überführt und es wurde ein Deckglas aufgelegt. Die Präparate wurden eine Stunde bei 60°C inkubiert und lichtmikroskopisch ausgewertet (Olympus BX61). Die Aufnahmen erfolgten mit der Software CellP (Olympus), die Bildbearbeitung mit Adobe Photoshop.

## Arbeiten mit *Drosophila melanogaster*

### **3.2.28 Fliegenzucht**

Die verschiedenen *Drosophila*-Stämme wurden auf Fliegenfutter gehalten. Die Stammhaltung erfolgte bei 18°C und 65% Luftfeuchtigkeit, wobei die Generationszeit 21 Tage beträgt. Um eine Verkürzung der Generationszeit auf etwa 14 Tage zu erreichen, wurden Fliegen, die für Versuche benötigt wurden, bei 24°C und 80% Luftfeuchtigkeit gehalten.

### 3.2.29 Absammeln von virginellen Weibchen (Jungfrauen) für Kreuzungen

Zum gezielten Absammeln von Jungfrauen für Kreuzungen wurden die adulten Fliegen der entsprechenden Stämme durch Abschütteln entfernt, und die Becher mit den darin verbleibenden Larven und Puppen bei 24°C und 80% Luftfeuchtigkeit inkubiert. Frisch geschlüpfte Weibchen wurden spätestens 12 Stunden danach abgesammelt, bevor die männlichen Tiere fertil wurden. Die männlichen Tiere wurden entfernt.

Gekreuzt wurde je eine Fliege des einen Geschlechts mit drei Fliegen des anderen Geschlechts, die Haltung erfolgte bei 24°C und 80% Luftfeuchtigkeit.

### 3.2.30 P-Element-basierte Keimbahntransformation bei *Drosophila melanogaster*

Die P-Element-Transformation ist eine Methode, um Fremd-DNA in Form von spezifisch klonierten Transformationskonstrukten stabil in die Keimbahn von *Drosophila*-Fliegen zu integrieren, um somit transgene *Drosophila*-Stämme zu erzeugen (Rubin und Spradling, 1982). Die Integration erfolgt dabei zufällig und ungerichtet.

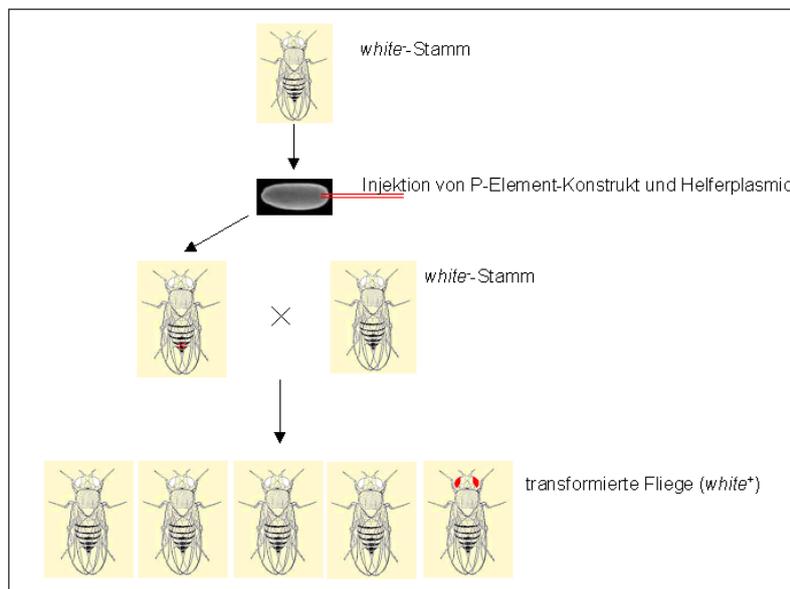
Transformationsvektoren müssen dabei folgende Kriterien erfüllen: Sie müssen über ein Plasmidgerüst mit Replikationsursprung („ori“) und Antibiotika-Resistenz verfügen, um eine Klonierung in *E. coli* zu ermöglichen. Sie sollten zusätzlich mindestens einen „Polylinker“ enthalten, der die Integration von Fremd-DNA in den Vektor erlaubt.

Sie müssen Teile eines P-Elementes mit charakteristischen terminalen invertierten Sequenzwiederholungen („inverted repeats“) besitzen, über die sie in das Genom integriert werden können. Durch eine interne Deletion ist die Transposase-Aktivität des P-Elements ausgeschaltet, damit die Konstrukte stabil integriert bleiben.

Sie tragen als Selektionsmarker eine Wildtyp-Kopie des *white*<sup>+</sup>-Gens. Die Keimbahntransformation erfolgt in das Genom von *yellow-white*-(yw) Fliegen, die keine Wildtyp-Kopie des *white*<sup>+</sup>-Gens besitzen und daher phänotypisch weißen Augen haben. Daher lassen sich Transformanten leicht anhand ihrer roten Augen selektieren.

Da Transformationsvektoren wie oben beschrieben keine Transposase-Aktivität mehr besitzen, können sie in *trans* mit Hilfe eines Helfer-Plasmids mobilisiert werden. Verwendet wurde dazu der Δ2-3 Helfer-Plasmid, der ein modifiziertes P-Element mit einer Deletion des Introns zwischen dem zweiten und dritten Exon enthält (Laski et al., 1986). Es kann aufgrund einer Inaktivierung seiner „inverted terminal repeats“ selbst nicht ins Genom integrieren, aber aktiv Transposase produzieren. Werden beide Plasmide, Transformationsvektor und das Δ2-3 Helfer-Plasmid, co-injiziert, kann eine stabile Integration des Transformationsvektors in das Genom von *Drosophila melanogaster* erzielt werden.

In Abbildung 3.2 ist das Prinzip der P-Element-Transformation bei *Drosophila melanogaster* dargestellt.



**Abb. 3.2. P-Element-Transformation bei *Drosophila melanogaster*.** Das P-Element-Konstrukt wird mit dem Helferplasmid in den posterioren Pol von ca. 30min alten Embryonen des Stammes *yw* (*white*<sup>-</sup>, weiße Augen) injiziert. In einigen Fällen führt die Injektion zur Integration des Konstrukts in Keimzellen. Die erste Generation von Fliegen, bei denen nur ein Teil der Keimzellen transformiert ist, wird mit dem Ausgangsstamm rückgekreuzt. Unter den daraus entstandenen Nachkommen sollten rotäugige (*white*<sup>+</sup>) Fliegen auftauchen, bei denen auch die somatischen Zellen transformiert sind (aus Kaspar, 2008).

### 3.2.31 Keimbahntransformation bei *Drosophila melanogaster* über PhiC31-Integrase

Ein Nachteil der P-Element-basierten Keimbahntransformation (3.2.30) bei *Drosophila* ist die zufällige und ungerichtete Integration der Fremd-DNA in das Genom. Mit Hilfe des neu entwickelten PhiC31-Systems ist eine gerichtete Keimbahntransformation möglich (Groth et al., 2004). Der Bakteriophage PhiC31 codiert für eine Integrase, die eine Rekombination zwischen bakteriellen „attachment sites“ (*attB*) und Phagen-spezifischen „attachment sites“ (*attP*) vermittelt und somit stabile Rekombinanten erzeugt (Thorpe und Smith, 1998). Obwohl das *Drosophila*-Genom „Pseudo *attP* sites“ enthält, konnte keine Integration an diesen Stellen nachgewiesen werden (Groth et al., 2004). Es wurden Fliegenstämme erzeugt, die „*attP* sites“ an verschiedenen Stellen im Genom besitzen. Die Entwicklung einer endogener PhiC31-Quelle unter der Kontrolle des *nanos*-Promotors führte zu einer weiteren Verbesserung des Systems (Bischof et al., 2007). Es sind nun eine Vielzahl von Fliegenstämmen erhältlich, die neben den „*attP* sites“ an verschiedenen Stellen im *Drosophila* Genom zusätzlich auch eine endogene PhiC3-Integrase-Quelle besitzen. Transformationsvektoren für diese Methode der Keimbahntransformation müssen neben einem Markergen (z.B. *white*<sup>+</sup>-Gen) zusätzlich „*attB* sites“ besitzen. Durch Injektion dieser Transformationsvektoren in oben genannte

Fliegenstämme kann somit eine gerichtete, effiziente Integration ins *Drosophila*-Genom erfolgen.

### **3.2.32 Durchführung Keimbahntransformation**

#### **3.2.32.1 Injektionsmaterial**

Hochreine DNA des Transformationskonstrukts (ca. 0.5µg/µl) und des Δ2-3 Helfer-Plasmids (0.1-0.2µg/µl) (nur bei P-Element-basierter Keimbahntransformation) wurde in angegebener Konzentration in H<sub>2</sub>O<sub>deion.</sub> aufgenommen. Vor der Injektion wurde das Injektionsmaterial 15min bei 13000xg und 4°C abzentrifugiert (Eppendorf 5415R Kühlzentrifuge).

#### **3.2.32.2 Absammeln, Dechorionieren und Aufreihen von Embryonen**

Zum Absammeln von Embryonen wurden die Fliegen in luftdurchlässigen Gelegebechern auf mit Hefe bestrichene Apfelsaftplatten gesetzt. Alle 30min wurden die Embryonen abgesammelt, mit Natriumhypochlorid-Lösung dechorioniert, in ein Netzchen überführt und mit Embryonenwaschlösung mehrmals gespült. Die Embryonen wurden dann unter einem Binokular auf dem Rand einer Apfelsaftplatte mit Hilfe einer Präpariernadel so aufgereiht, dass der anteriore Teil der Embryonen zum Rand der Platte zeigte. Um die Embryonen auf ein Deckglas zu transferieren, wurde doppelseitiges Klebeband (Tesa Photo Film Tape, 12mm breit) benutzt, das Deckglas wurde anschließend auf einen Objektträger gelegt. Anschließend wurden die Embryonen für 8-10min in einer Kammer mit Silikagel (orange) getrocknet und dann mit Voltaef<sup>®</sup> 10S-Öl dünn überschichtet, damit sie im weiteren Verlauf nicht austrockneten.

#### **3.2.32.3 Injektion**

Die Injektion wurde unter einem inversen Mikroskop (Zeiss Axiovert 25), kombiniert mit einem Mikromanipulator (Leitz), durchgeführt. Als Injektionsnadeln wurden Glaskapillaren (Ø 1mm, WPI) verwendet, die mit Hilfe eines Magnetheizgerätes der Firma GETRA (Einstellungen: Magnet: 210, Heizung: 250°C) gezogen wurden. Mit Hilfe einer Microloader-Spitze (Eppendorf) wurden 1-2µl Injektionsmaterial in die Spitze der Injektionsnadel gefüllt und diese in den Mikromanipulator eingesetzt. Der Objektträger mit den aufgereihten Embryonen wurde auf dem Objektisch positioniert und vorsichtig gegen die Injektionsnadel bewegt, um diese an der Spitze abzubrechen und somit zu schärfen. Anschließend wurde eine kleine DNA-Menge in den posterioren Pol des Embryos injiziert. Die injizierte DNA-Menge

wurde mittels aufgebauten Drucks des Injektionsgeräts (Eppendorf FemtoJet) reguliert. Mittels Steuerung des Injektionsgerätes wurde so eine genau definierte Menge an DNA in die Embryonen injiziert. Nachdem alle Embryonen eines Objektträgers injiziert waren, wurde dieser in eine feuchte Kammer gelegt und über Nacht bei 24°C inkubiert.

#### **3.2.32.4 Behandlung injizierter Embryonen**

Am nächsten Tag wurden die Embryonen mit dem Deckglas auf eine Apfelsaftplatte gelegt, die in der Mitte dünn mit Hefe bestrichen wurde. Nach Bedarf wurden die Embryonen noch mit Voltaef<sup>®</sup> 10S-Öl überschichtet und die Platten bei 24°C und 80% Luftfeuchtigkeit inkubiert. Die in den darauf folgenden Tagen geschlüpften Larven wurden mit einem Platinspatel vorsichtig in ein Futterröhrchen überführt und bei 24°C und 80% Luftfeuchtigkeit weiter aufgezogen.

#### **3.2.32.5 Selektion von Transformanten**

Frisch geschlüpfte Fliegen ( $G_0$ -Generation) wurden mit *yw*-Fliegen des anderen Geschlechts rückgekreuzt und bei 24°C und 80% Luftfeuchtigkeit gehalten. Bei den Nachkommen dieser Kreuzung ( $G_1$ -Generation) wurde die Augenfarbe untersucht, denn erst hier wird das *white*<sup>+</sup>-Markergen des Transformationsvektors, der in der  $G_0$  in die Keimbahn integriert wurde, exprimiert. Um getrennte Linien zu erhalten wurden die  $G_1$ -Transformanten weiter mit *yw*-Fliegen gekreuzt. Die nächste Generation  $G_2$  wurde mit Fliegen von Balancerstämmen gekreuzt. So konnte ein stabiler Stamm erzeugt werden und gleichzeitig die chromosomale Lokalisation des P-Element-Transformationsvektors festgestellt werden.

#### **3.2.32.6 Balancierung transgener Fliegen**

Unter Balancieren versteht man die heterozygote Stabilisierung von Mutationen, Deletionen oder P-Element-Insertionen.

Balancerchromosomen zeichnen sich durch folgende Eigenschaften aus: sie verfügen über vielfache Inversionen, die eine Rekombination unterdrücken, sie tragen ein oder mehrere dominante Markergene und sie besitzen einen rezessiven Letalfaktor.

Um die Lokalisation von Insertionen auf dem zweiten oder dritten Chromosom nachzuweisen, wurden unabhängige Transformanten mit einem zweitchromosomalen Balancerstamm *yw*; *Sco*/*CyO*; *+/+*; und einem drittchromosomalen Balancerstamm *w*<sup>1118</sup>; *+/+*; *CxD*/*TM3Sb* gekreuzt. In der  $G_1$ -Generation wurde auf eine Kombination von Markern des Transformationsvektors (rote Augen) und nach oben gebogenen Flügeln (*CyO*) für eine

Insertion auf dem zweiten Chromosom bzw. kurze Borsten (TM3Sb) für eine Insertion auf dem dritten Chromosom selektiert. Solche Fliegen wurden dann jeweils untereinander gekreuzt, so dass in der G<sub>2</sub>-Generation alle Fliegen das P-Element tragen: Zum einen heterozygote Fliegen die das P-Element über Balancer tragen zum anderen Fliegen die homozygot für das P-Element sind (falls diese Fliegen lebensfähig sind). Fliegen, die homozygot für den Balancer sind, können aufgrund der rezessiven Letalfaktoren nicht auftreten.

**Testkreuzung mit dominantem Marker für das 2.Chromosom**

**Testkreuzung mit dominantem Marker für das 3.Chromosom**

1.) Einkreuzen des Balancers in die heterozygote Linie:

1.) Einkreuzen des Balancers in die heterozygote Linie:

$$\frac{yw}{yw} ; \frac{P[w^+]}{+} \times \frac{yw}{yw} ; \frac{CyO}{Sco}$$

$$\frac{yw}{yw} ; \frac{P[w^+]}{+} \times \frac{w^{1118}}{w^{1118}} ; \frac{CxD}{TM3Sb}$$

$$\frac{yw}{yw} ; \frac{P[w^+]}{Sco} \quad \frac{yw}{yw} ; \frac{+}{CyO}$$

$$\frac{w^{1118}}{yw} ; \frac{P[w^+]}{CxD} \quad \frac{w^{1118}}{yw} ; \frac{+}{CxD}$$

$$\frac{yw}{yw} ; \frac{+}{Sco} \quad \boxed{\frac{yw}{yw} ; \frac{P[w^+]}{CyO}}$$

Phänotyp: rote Augen,  
nach oben gebogene Flügel

$$\frac{w^{1118}}{yw} ; \frac{+}{TM3Sb} \quad \boxed{\frac{w^{1118}}{yw} ; \frac{P[w^+]}{TM3Sb}}$$

Phänotyp: rote Augen,  
kurze Borsten

2.) Selbstung der merkmals tragenden Nachkommenschaft:

2.) Selbstung der merkmals tragenden Nachkommenschaft:

$$\boxed{\frac{yw}{yw} ; \frac{P[w^+]}{CyO}} \quad \boxed{\frac{yw}{yw} ; \frac{P[w^+]}{CyO}}$$

$$\boxed{\frac{w^{1118}}{yw} ; \frac{P[w^+]}{TM3Sb}} \quad \boxed{\frac{w^{1118}}{yw} ; \frac{P[w^+]}{TM3Sb}}$$

$$\frac{yw}{yw} ; \frac{P[w^+]}{CyO} \quad \frac{yw}{yw} ; \frac{P[w^+]}{P[w^+]}$$

$$\frac{yw/w^{1118}}{yw/w^{1118}} ; \frac{P[w^+]}{TM3Sb} \quad \frac{yw/w^{1118}}{yw/w^{1118}} ; \frac{P[w^+]}{P[w^+]}$$

Phänotyp: rote Augen,  
nach oben gebogene Flügel

Phänotyp: rote Augen,  
kurze Borsten

**Abb. 3.3. Kreuzungsschema für das Balancieren transgener Fliegen.** Die Fliegen werden sowohl mit einem zweitchromosomalen Balancerstamm (yw; Sco/CyO) als auch mit einem Balancerstamm für das dritte Chromosom (w<sup>1118</sup>; CxD/TM3Sb) gekreuzt. In der G<sub>1</sub>-Generation werden Fliegen selektiert, die eine Kombination von Markern des Transformationsvektors (rote Augen, P[w<sup>+</sup>]) und des jeweiligen Balancerchromosoms (zweites Chromosom: nach oben gebogene Flügel (CyO), drittes Chromosom: kurze Borsten (TM3Sb)) tragen. Diese Fliegen werden jeweils untereinander weiter gekreuzt. Wurde der Transformationsvektor in das zweite Chromosom integriert, treten in der G<sub>2</sub>-Generation der entsprechenden Kreuzung ausschließlich rotäugige Fliegen auf, die entweder geradeflügelig sind (homozygot für das P-Element) oder nach oben gebogene Flügel besitzen (heterozygot für das P-Element). Wurde der Transformationsvektor in das dritte Chromosom integriert, treten in der G<sub>2</sub>-Generation der entsprechenden Kreuzung nur rotäugige Fliegen auf, die entweder normal lange Borsten (homozygot für das P-Element) oder kurze Borsten (heterozygot für das P-Element) besitzen.

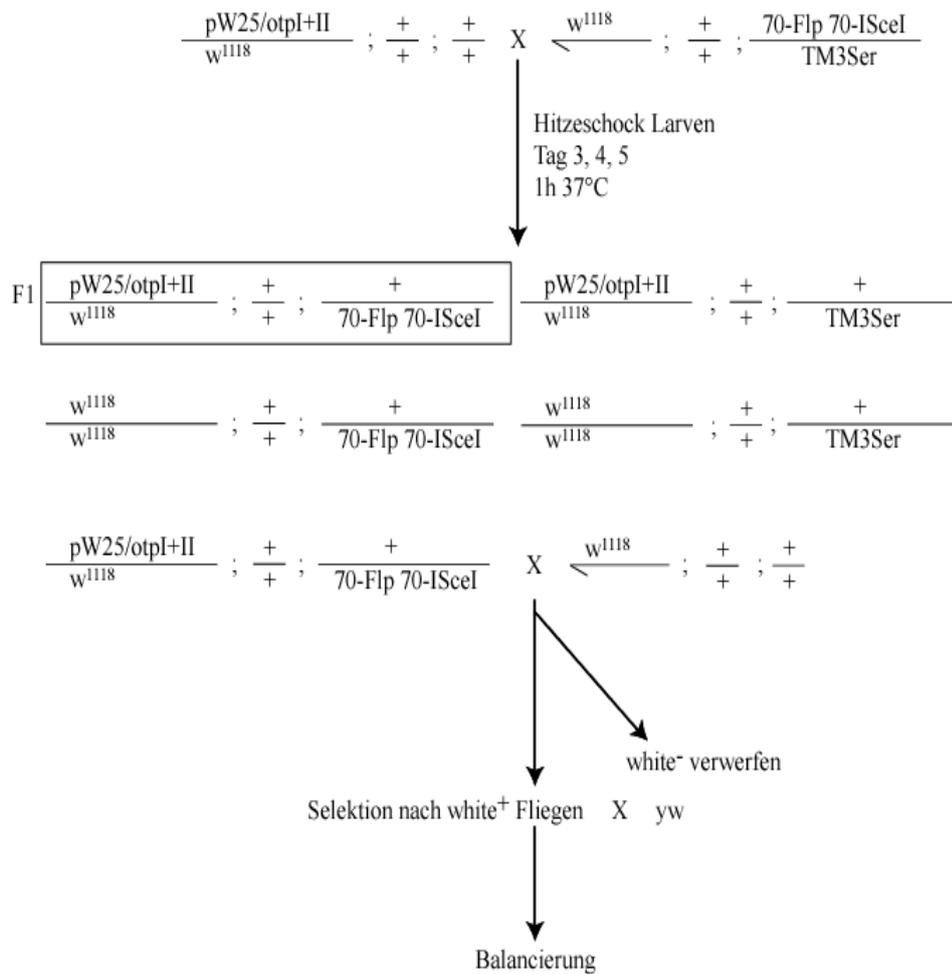
### 3.2.33 Jump-Start von P-Elementen

Unter einem Jump-Start von P-Elementen versteht man die spätere Mobilisierung eines bereits im Genom integrierten P-Elements. Da die P-Element-basierte Keimbahntransformation ungerichtet erfolgt, können nicht immer Transformanten mit einer Integration auf dem gewünschten Chromosom erzeugt werden. Da die zur Keimbahntransformation verwendeten P-Elemente keine Transposase-Aktivität besitzen, muss diese über einen zweiten Fliegenstamm bereit gestellt werden. Dazu wurden balancierte Transformanten des gewünschten Stamms mit Fliegen des Stamms *CyO/Sp; Δ2-3Sb/Ubx* gekreuzt. Bei den Nachkommen erfolgte eine Selektion auf rote Augen sowie auf die Marker *CyO* (gebogene Flügel) und *Sb* (kurze Borsten), d.h. auf Fliegen die sowohl das P-Element, als auch die  $\Delta 2-3$  Transposase besitzen, diese werden mit *yw* Fliegen gekreuzt. Die  $\Delta 2-3$  Transposase ermöglicht, dass das P-Element von seinem Integrationsort an eine andere Stelle im Genom springt. Nun erfolgte eine Selektion auf rotäugige Fliegen (mit P-Element) mit normalen Borsten (ohne Transposase) und geraden Flügeln oder *CyO*. Diese wurden zuerst mit *yw* zurückgekreuzt und dann balanciert (3.2.32.6). Durch die Balancierung konnte die neue Lokalisierung des P-Elements bestimmt werden.

### 3.2.34 „Ends-Out Gene Targeting“: Mobilisierung eines Donor-Konstrukts

Die Mobilisierung des Targeting-Konstrukts oder auch Donor-Konstrukts erfolgt durch Einkreuzen eines Fliegenstammes, der die Gene der Flp-Rekombinase und des Enzyms *I-SceI* unter Kontrolle eines Hitzeschockpromotors trägt (*70-Flp 70-I-SceI*), wodurch eine gezielte Expression der Flp-Rekombinase und des Enzyms *I-SceI* induziert werden kann. Befindet sich die Zielsequenz für die homologe Rekombination, in diesen Fall also eine Sequenz innerhalb des *otp*-Gens, auf dem 2.Chromosom, so wählt man dafür einen Fliegenstamm, der die Flp-Rekombinase und das *I-SceI*-Gen auf dem 3.Chromosom trägt. Für den späteren Nachweis einer Mobilisierung des Donor-Konstrukts ist es auch von Vorteil, wenn sich dieses nicht auf dem gleichen Chromosom wie die Zielsequenzen für die homologe Rekombination befindet. Da die Lage des Donorkonstrukts einen Einfluss auf die Effizienz des „Ends-Out Gene Targeting“ hat (Rong et al., 2002), werden, wenn möglich, mehrere unabhängige Transformanten für die Durchführung verwendet. In Abbildung 3.4 ist das genaue Kreuzungsschema dargestellt. Nachdem Fliegen, welche das Donor-Konstrukt auf dem X-Chromosom, tragen mit Fliegen mit *70-Flp 70-I-SceI* auf dem 3.Chromosom gekreuzt wurden, werden die Nachkommen dieser Kreuzung dreimal - am 3., 4. und 5.Tag- einem Hitzeschock von jeweils einer Stunde bei 37°C unterzogen. Dadurch kommt es durch

Aktivierung der Flp-Rekombinase und des Enzyms I-SceI zu dem oben beschriebenen Ausschneiden und Linearisieren des Konstrukts. Weibliche Nachkommen der F<sub>1</sub>-Generation, die nicht den Marker Ser (eingekerbte Flügel) tragen werden mit *yw* Fliegen rückgekreuzt. Die Auswahl von weiblichen Tieren erfolgt, da in der weiblichen Keimbahn eine höhere Effizienz für homologe Rekombination existiert (Rong und Golic, 2000; Rong et al., 2002). Die Nachkommen dieser 2.Kreuzung werden nun auf *white*<sup>+</sup>-Fliegen selektiert. *white*<sup>-</sup>-Fliegen werden hingegen verworfen, bei diesen wurde das Konstrukt zwar ausgeschnitten, es kam jedoch nicht zu einer homologen Rekombination. Für das Zustandekommen von *white*<sup>+</sup>-Fliegen gibt es mehrere Möglichkeiten. Zu einen könnte das Donor-Konstrukt gar nicht ausgeschnitten worden sein und somit kam es auch zu keiner homologen Rekombination, es handelt sich also um die Ausgangsfliegen. Dieser Fall ist jedoch sehr selten, da die Effizienz der Flp-Rekombinase über 99% beträgt (Golic und Golic, 1996). Eine zweite Möglichkeit ist das sogenannte „non-targeted event“, also eine Rekombination, aber nicht an der gewünschten Stelle im Genom. Die dritte Möglichkeit ist die homologe Rekombination an der gewünschten Stelle. Die *white*<sup>+</sup>-Fliegen werden mit *yw* Fliegen rückgekreuzt und über Balancierung die Lokalisierung des Konstrukts bestimmt.



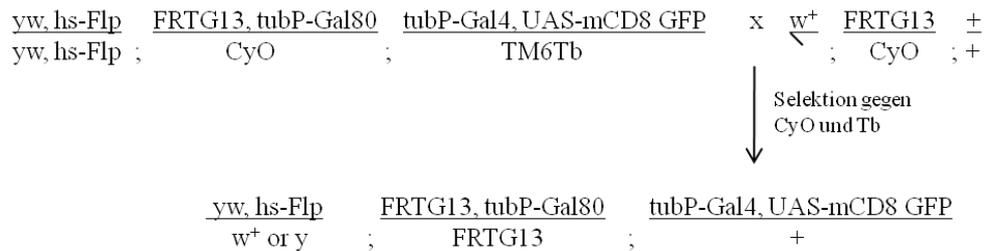
**Abb.3.4. Kreuzungsschema „Ends-Out Gene Targeting“.** In der 1.Kreuzung werden Fliegen, die das Donorkonstrukt pW25/otpl+II auf dem X-Chromosom tragen mit Fliegen gekreuzt, die die Gene Flp und I-SceI unter Kontrolle eines Hitzeschockpromotors (70-Flp 70-I-SceI) auf dem 3.Chromosom tragen. Die Larven dieser Kreuzung werden drei Hitzeschocks von jeweils einer Stunde bei 37°C unterzogen. Weibliche Nachkommen dieser Kreuzung, die nicht den Marker Ser (eingekerbte Flügel) (durch Kasten hervorgehoben) tragen, werden mit yw Fliegen rückgekreuzt. Bei den Nachkommen erfolgte eine Selektion auf white<sup>+</sup> Fliegen, diese wurden zuerst mit yw zurückgekreuzt und dann balanciert, um eine Mobilisierung des white<sup>+</sup> Markers vom Donor-Chromosom nachzuweisen.

### 3.2.35 MARCM-Analysen

Das 1999 von Lee und Luo entwickelte MARCM- (mosaic analysis with a repressible cell marker) System ermöglicht eine positive Markierung einer kleinen Population wildtypischer oder mutanter Zellen bei *Drosophila* (Lee und Luo, 1999; Lee und Luo, 2001; Wu und Luo, 2006). Dabei werden homozygot mutante Zellen aus heterozygoten Vorläufern durch mitotische Rekombination erzeugt. Das System kombiniert das UAS-Gal4-System mit dem Gal80-Repressor und dem Flp-FRT-System.

Der verwendete MARCM-Treiberstamm TUG G13 (B. Bello, unveröffentlicht) enthält folgende Komponenten: hs-Flp (Flp unter Kontrolle eines Hitzeschockpromotors), FRTG13

(FRT-Stellen auf dem rechten Arm des 2.Chromosoms in der 42B1 Region), tubP-Gal80 (Gal80 unter Kontrolle des tubulin-Promotors), tubP-Gal4 (Gal4 unter Kontrolle des tubulin-Promotors), UAS-mCD8::GFP (membrangebundenes GFP als Markergen). Zur Erzeugung wildtypischer Klone wurde dieser MARCM-Treiberstamm mit dem Stamm FRT G13 (Bl 1956) gekreuzt, dieser enthält FRT-Stellen an der gleichen Position wie der MARCM-Treiberstamm (Abb.3.5).



**Abb.3.5. Kreuzungsschema MARCM-Analyse.** Kreuzung zwischen MARCM-Treiberstamm und FRT-Stamm für das zweite Chromosom. In der F1 wird gegen die Marker CyO und Tb selektiert.

Die Nachkommen der Kreuzung werden gegen die Marker CyO und Tb selektiert und geselbstet. Diese Fliegen werden sechs bis acht Stunden zur Eiablage in Gelegebecher mit Apfelsaftplatten gesetzt. Die Apfelsaftplatten werden danach 24 Stunden bei 24°C inkubiert und dann werden die Larven einem Hitzeschock von einer Stunde bei 37°C im Wasserbad unterzogen. Die Larven werden nach einer Erholungsphase in Futterröhrchen überführt und bei 24°C weiter inkubiert. Larven des dritten Larvalstadiums werden auf eine GFP-Expression im Gehirn untersucht, die Gehirne werden freipräpariert, fixiert und zur Antikörperfärbung eingesetzt (3.2.25).

## Mikroskopie

### **3.2.36 Lichtmikroskopie**

Für Hellfeld-, DIC- (differentieller Interphasenkontrast) und Fluoreszenzaufnahmen wurde im Rahmen dieser Arbeit das aufrechte Mikroskop BX61 mit der Kamera CC12 und der Software CellP der Firma Olympus verwendet. Durch einen motorisierten Tisch ist die Aufnahme sogenannter z-Stapel (Bildstapel mit unterschiedlichen Fokusebenen) mit festgelegtem Abstand möglich. Diese z-Stapel lassen sich dann zu einem Bild mit optimaler Schärfe kombinieren. Zur Auswertung der z-Stapel wurde das Programm ImageJ (nih.gov) benutzt.

### **3.2.37 Dekonvolution**

Unter Dekonvolution versteht man die Umkehrung einer Faltungsoperation. Es handelt sich dabei um eine mathematische Funktion, die unter anderem in der Bildbearbeitung verwendet wird, um ein Bild zu schärfen. Dabei versuchen sogenannte Dekonvolutions-Filter, die Unschärfe mathematisch zu erfassen und rückgängig zu machen. Einer dieser Filter ist der Wiener-Filter oder auch Wiener-Kolmogoroff-Filter, der in den 1940er Jahren von Norbert Wiener und Andrei Nikolajewitsch Kolmogoroff unabhängig voneinander entwickelt wurde. Er führt zu einer optimalen Rauschunterdrückung. Alle Fluoreszenzaufnahmen wurden mit dem Wiener-Filter der Software CellP der Firma Olympus nachbearbeitet.

### **3.2.38 Konfokale Mikroskopie**

Um eine bessere Auflösung zu erreichen, wurde bei der Analyse verschiedener Präparate ein konfokales Mikroskop benutzt (QLC-100, Visitech International).

## 4. Ergebnisse

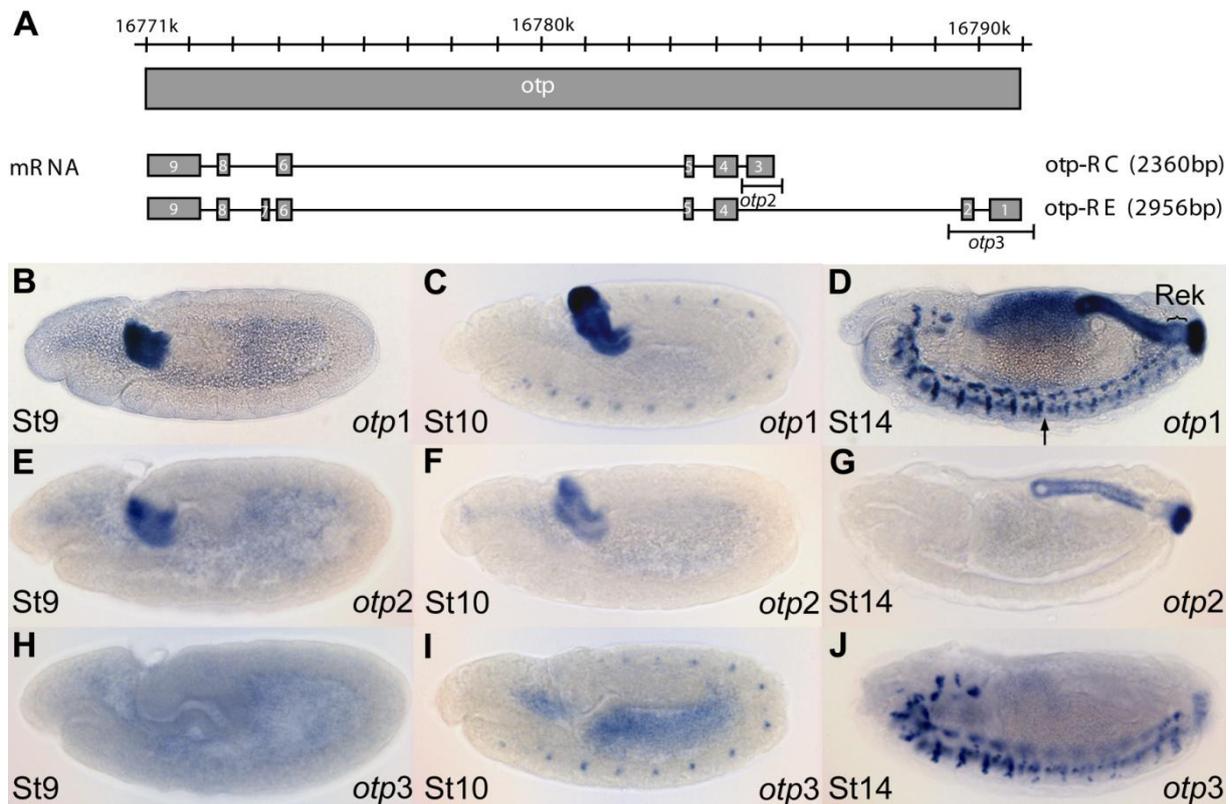
### 4.1 Das embryonale Expressionsmuster des Homeoboxgens *orthopedia* (*otp*)

Das Homeoboxgen *orthopedia* (*otp*) liegt in einem Cluster aus drei Homeoboxgenen auf dem rechten Arm des zweiten Chromosoms von *Drosophila*. Im Embryo wird *otp* im Enddarmprimordium, im Enddarm, im ventralen Nervensystem und im Gehirn exprimiert (Simeone et al., 1994). Während nur ein *otp*-Transkript nachgewiesen werden konnte, wurde die Existenz eines zweiten alternativen mRNA-Transkripts aufgrund eines großen offenen Leserasters vermutet (Simeone et al., 1994), welches inzwischen im Rahmen des *Drosophila* Genom Projekts auch identifiziert werden konnte. Durch Northern Blot Analysen konnte gezeigt werden, dass die beiden Transkripte eine unterschiedliche zeitliche Expression aufweisen (Walldorf, unveröffentlicht). Während das kleinere 2.3kb Transkript bereits in 3-6 Stunden alten Embryonen nachgewiesen werden kann, wird das größere 2.9kb Transkript erst in 9-12 Stunden alten Embryonen exprimiert. Die Expression der beiden Transkripte wird während der gesamten Embryonalentwicklung aufrechterhalten und auch in allen Larvalstadien können beide Transkripte nachgewiesen werden (Walldorf, unveröffentlicht).

Im Folgenden sollte nun bestimmt werden, ob neben der unterschiedlichen zeitlichen Verteilung der beiden Transkripte auch eine unterschiedliche räumliche Verteilung nachgewiesen werden kann. Desweiteren sollte das embryonale Expressionsmuster auf Proteinebene bestimmt werden und es sollte untersucht werden, ob es Unterschiede zwischen dem mRNA- und dem Proteinexpressionsmuster gibt.

#### 4.1.1 Gewebespezifische Expression der beiden *otp*-mRNA-Transkripte

Zuerst sollte nun analysiert werden, ob eine gewebespezifische Expression der beiden *otp*-Transkripte vorliegt. Da sich die beiden *otp*-mRNA-Transkripte im 5'-Ende unterscheiden, können spezifische Sonden zum Nachweis der beiden Transkripte hergestellt werden. Die Exons 1 und 2 sind spezifisch für das längere 2.9kb Transkript (bei flybase.org als *otp*-RE bezeichnet; siehe auch Abb.4.1), Exon 3 ist spezifisch für das kleinere 2.3kb Transkript (bei flybase.org als *otp*-RC bezeichnet; siehe auch Abb.4.1).



**Abb.4.1. Nachweis einer gewebespezifischen Expression der beiden *otp*-Transkripte.** (A) Oben ist der genomische Bereich des *otp* Gens dargestellt, darunter die Exon-Intron-Struktur der beiden Transkripte *otp*-RC und *otp*-RE sowie die Lage der verwendeten *in situ* Sonden (*otp2*, *otp3*). (B-J) Lichtmikroskopische Aufnahmen mit DIC-Filter von *in situ* Hybridisierungen mit den Sonden *otp1* (B-D), *otp2* (E-G) und *otp3* (H-J) an Wildtyp-Embryonen verschiedener Stadien. Bei allen Bildern handelt es sich um Seitenansichten, der anteriore Pol liegt links, dorsal oben. Abk.: Rek: Rectum.

Der cDNA-Klon W26/2 Eco1.7 enthält die Exons 3-9 des *otp*-Gens, das Fragment dieses Klons wurde zur Sondenmarkierung (3.2.19) eingesetzt (Sonde *otp1*) und sollte also beide *otp*-Transkripte nachweisen. Durch *in situ* Hybridisierung mit Sonde *otp1* (3.2.22) konnte weitgehend das von Simeone et al. (1994) beschriebene embryonale Expressionsmuster von *otp* nachgewiesen werden (Abb.4.1.B-D). In Stadium 9 kann eine Expression von *otp* im Enddarmprimordium nachgewiesen werden (Abb.4.1.B), ab Stadium 10 kann zusätzlich eine Expression im Nervensystem detektiert werden (Abb.4.1.C). In Stadium 14 wird *otp* im Enddarm und in den Analplatten sowie im ventralen Nervensystem und im Gehirn exprimiert (Abb.4.1.D). Während von Simeone et al. keine Expression von *otp* im Rektum nachgewiesen werden konnte (dort noch als kleiner Teil am posterioren Ende des Enddarms beschrieben), konnte in dieser Arbeit eine Expression von *otp* im Rektum nachgewiesen werden, jedoch schwächer als in den anderen Regionen des Enddarm (Abb.4.1.D). Außerdem wurde die Expression von *otp* entlang des ventralen Nervensystems von Simeone et al. (1994) als Gradient entlang der anterior-posterioren Achse mit starker Expression in den anterioren Segmenten und schwacher Expression in den posterioren Segmenten beschrieben. Hier konnte

nachgewiesen werden, dass *otp* in den drei Thorakal- und ersten zwei Abdominal-Segmenten gleichbleibend stark und in den restlichen Abdominal-Segmenten gleichbleibend schwach exprimiert wird (Abb.4.1.D; der Pfeil markierte die Grenze zwischen starker und schwacher Expression). Es handelt sich also nicht um einen kontinuierlich abfallenden Gradienten entlang der anterior-posterioren Achse, sondern um eine klare Grenze zwischen starker und schwacher Expression nach dem 2. Abdominal-Segment.

Mit den Primern 10036-1 und 10036-2 wurde spezifisch Exon 3 des *otp*-Gens amplifiziert (2.2.17), eine gegen dieses Exon gerichtete Sonde (Sonde *otp2*) sollte spezifisch das kleinere 2.3kb Transkript nachweisen. Mit Sonde *otp2* konnte eine Expression im Enddarmprimordium von Embryonen im Stadium 9 detektiert werden (Abb.4.1.E). In Stadium 10 konnte eine Expression im Enddarmprimordium, nicht aber im Nervensystem nachgewiesen werden (Abb.4.1.F). In Stadium 14 konnte ein *otp*-Expression im Enddarm und den Analplatten, aber nicht im ventralen Nervensystem und im Gehirn nachgewiesen werden (Abb.4.1.G).

Der genomische Klon  $\lambda$  W50 BS1.6 enthält den genomischen Bereich der Exons 1 und 2, eine gegen das Fragment dieses Klons gerichtete Sonde (Sonde *otp3*) sollte spezifisch das größere 2.9kb *otp*-Transkript nachweisen. Mit Sonde *otp3* konnte in Stadium 9 keine *otp*-Expression detektiert werden (Abb.4.1.H). In Stadium 10 konnte eine Expression im Nervensystem, nicht jedoch im Enddarmprimordium nachgewiesen werden (Abb.4.1.I). In Stadium 14 konnte eine *otp*-Expression im ventralen Nervensystem und Gehirn, nicht aber im Enddarm nachgewiesen werden (Abb.4.1.J).

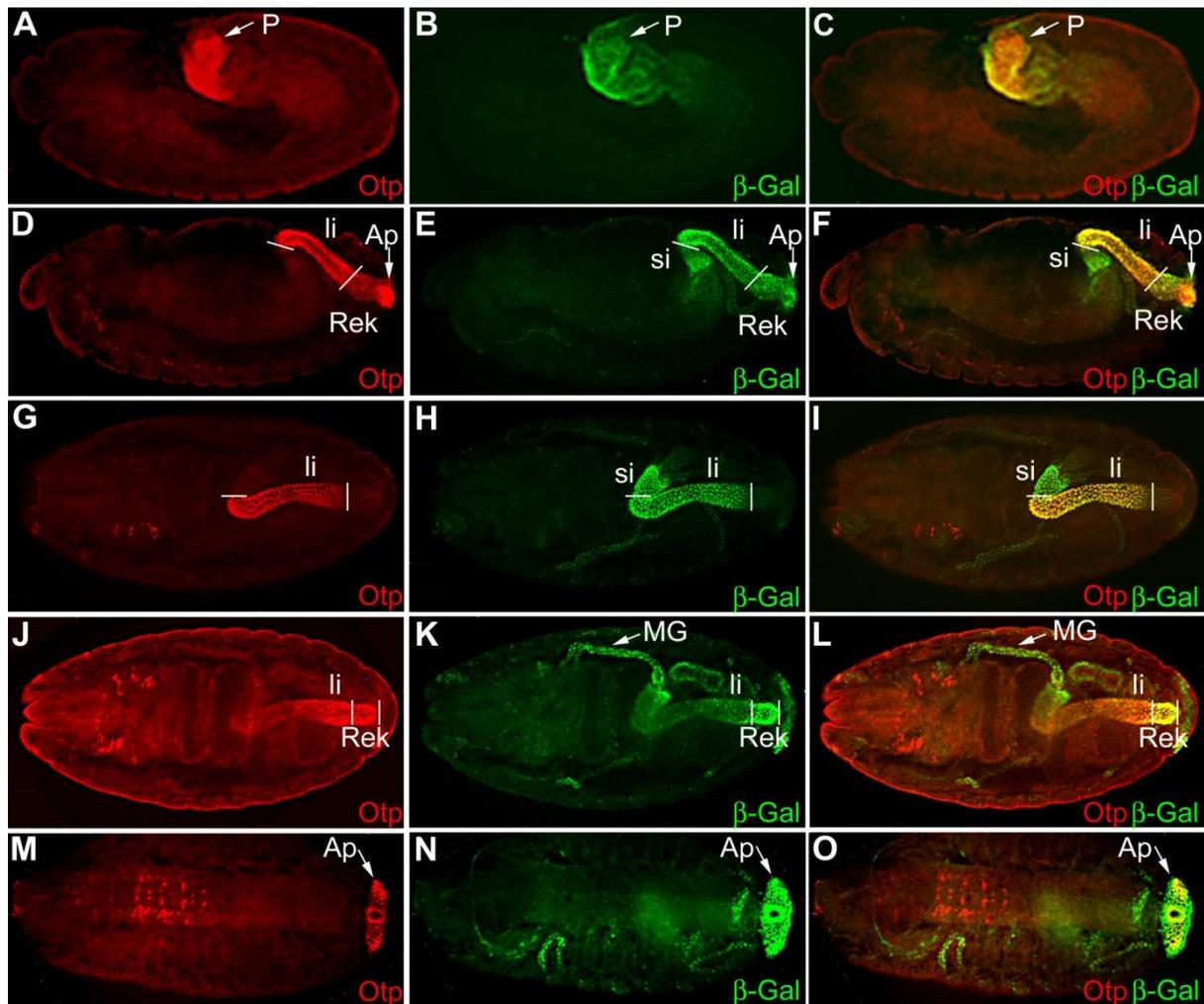
Diese Ergebnisse zeigen, dass das kleinere 2.3kb *otp*-mRNA-Transkript spezifisch im Enddarmprimordium, im Enddarm und in den Analplatten exprimiert wird, während die Expression des größeren 2.9kb *otp*-mRNA-Transkripts auf das embryonale Nervensystem beschränkt ist. Es konnte also eine gewebespezifische Expression der beiden *otp*-Transkripte nachgewiesen werden.

#### 4.1.2 Das embryonale Otp-Proteinexpressionsmuster

Nachdem nun das *otp*-mRNA Muster analysiert war, sollte auch die Otp-Proteinexpression genauer untersucht werden. Dazu steht ein anti-Otp-Antikörper gegen den C-Terminus des Otp-Proteins zur Verfügung (Bach, 2005).

##### 4.1.2.1 Co-Lokalisation von Otp und Brachyenteron im embryonalen Enddarm

Zuerst sollte untersucht werden, in welchen Bereichen des Enddarms das Otp-Protein exprimiert wird und ob eine Co-Lokalisation mit anderen Enddarm-spezifischen Genen wie *brachyenteron* vorliegt. Der embryonale Enddarm von *Drosophila melanogaster* ist entlang der anterior-posterioren Achse in drei morphologisch unterscheidbare Regionen - „small intestine“, „large intestine“ und Rektum - unterteilt (Hoch et al., 1996;). Das „small intestine“ bildet den am weitesten anterior gelegenen Teil des Enddarms und ist mit dem Mitteldarm verbunden. Den längsten Teil des Enddarms stellt das „large intestine“ dar, das eine Unterteilung in drei Bereiche entlang der dorsoventralen Achse aufweist. Sogenannte „border“ oder „boundary cells“ bilden zwei Zellreihen zwischen dem dorsalen und ventralen Bereich sowie zwei Ringe am anterioren und posterioren Ende des „large intestine“ (Takashima und Murakami, 2001). Den posterioren Teil des Enddarms bildet das Rektum, das mit den Analplatten verbunden ist. Das T-Box-Gen *brachyenteron* (*byn*) wird im Enddarmprimordium und später im gesamten Enddarm und in den Analplatten exprimiert (Kispert et al., 1994; Singer et al., 1996; Iwaki et al., 2001) und ist als direkter Regulator von *otp* ausreichend, um eine *otp*-Expression zu induzieren (Kusch et al., 2002). Da keine anti-Byn-Antikörper zur Verfügung standen, wurde die Enhancer-Trap-Linie *byn*<sup>apro</sup>, welche das lacZ-Gen kernlokalisiert im Byn-Muster exprimiert (Murakami et al., 1995), für Co-Lokalisationsstudien verwendet. Es wurden Doppelfärbungen mit anti-Otp- und anti-β-Galaktosidase-Antikörpern an *byn*<sup>apro</sup>-Embryonen verschiedener Stadien durchgeführt (3.2.21).



**Abb.4.2. Co-Lokalisation von Otp und Byn im embryonalen Enddarm.** Konfokale Aufnahmen von Doppelfärbungen an *byn<sup>ap<sup>ro</sup></sup>*-Embryonen verschiedener Stadien mit anti-Otp- und anti- $\beta$ -Galaktosidase- (anti- $\beta$ -Gal) Antikörpern. In der linken Spalte sind die anti-Otp-Antikörperfärbungen, in der mittleren Spalte die anti- $\beta$ -Gal-Antikörperfärbungen und in der rechten Spalte die Übereinanderlagerung der beiden Färbungen des jeweiligen Embryos dargestellt. (A-C) Seitenansicht eines Embryos im Stadium 10. (D-F) Seitenansicht eines Embryos im Stadium 14. (G-I) Dorsale Aufsicht auf einen Embryo im Stadium 14; die Schärfeebene wurde so gewählt, das nur das „small“ und das „large intestine“, nicht jedoch das Rektum und die Analplatten sichtbar sind. (J-L) Dorsale Aufsicht auf einen Embryo im Stadium 14; die Schärfeebene des Embryos aus (G-I) wurde nun so gewählt, dass nur das Rektum sichtbar ist, nicht jedoch das „small“ und das „large intestine“. (M-O) Ventrale Aufsicht auf einen Embryo im Stadium 14; die Schärfeebene des Embryos wurde so gewählt, dass nur die Analplatten sichtbar sind. In allen Bildern ist anterior links. Abk.: Ap: Analplatten; li: „large intestine“; MG: Malpighische Gefäße; P: Enddarmprimordium; Rek: Rektum; si: „small intestine“.

Im Stadium 10 zeigen Otp und  $\beta$ -Gal, welches das Expressionsmuster von Byn wiedergibt, eine Co-Lokalisation in den meisten Bereichen des Enddarmprimordiums, in einem kleinen Bereich kann jedoch nur eine  $\beta$ -Gal-Expression nachgewiesen werden (Abb.4.2.A-C; der Pfeil zeigt auf das Enddarmprimordium). Sowohl in der Seitenansicht als auch in der dorsalen Aufsicht auf einen Embryo in Stadium 14 wird deutlich, dass im „small intestine“ nur Byn exprimiert wird, während entlang des kompletten „large intestine“ eine Co-Lokalisation von Otp und Byn nachgewiesen werden kann (Abb.4.2.D-I). Otp und Byn werden auch im Rektum co-exprimiert, aber genau wie bei der *otp*-mRNA ist auch die Stärke der Otp-

Proteinexpression im Rektum schwächer als im „large intestine“ und den Analplatten (Abb.4.2.D-F, J-L). Im Gegensatz dazu scheint sich die Stärke der Byn-Expression nicht zwischen den verschiedenen Regionen des Enddarms zu unterscheiden (Abb.4.2.E, H, K). Byn und Otp sind auch in den Analplatten co-lokalisiert (Abb.4.2.D-F, M-O), wobei es einen äußeren Ring von Zellen mit ausschließlicher Byn-Expression gibt (Abb.4.2.O). Die Linie *byn<sup>apro</sup>* zeigt außerdem eine  $\beta$ -Gal-Expression in den Malpighischen Gefäßen (Abb.4.2.K, L), in diesen wird jedoch keine *byn*-mRNA exprimiert (Murakami et al., 1995).

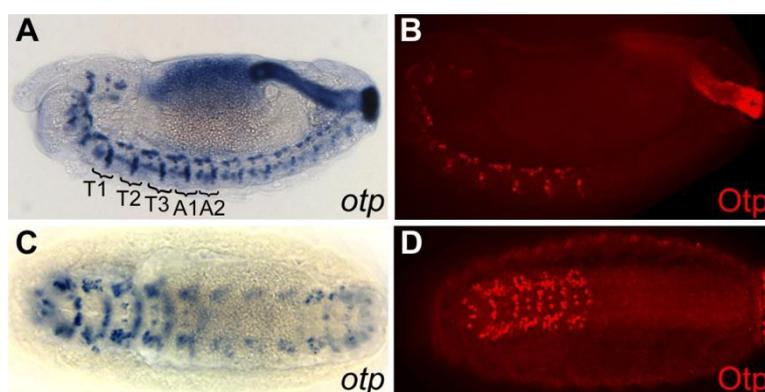
Durch Antikörper-Färbungen mit anti-Otp-Antikörpern konnte nachgewiesen werden, dass die Expression des Otp-Proteins im Enddarmprimordium und im Enddarm mit der Expression der *otp*-mRNA übereinstimmt. Des Weiteren konnte eine Co-Lokalisation von Otp und Byn im „large intestine“, im Rektum und in einem Großteil der Analplatten gezeigt werden.

#### 4.1.2.2 Otp-Expression im ventralen Nervensystem

Nachdem die Expression von Otp im Enddarm genauer bestimmt war, sollte nun die Expression von Otp im embryonalen Nervensystem analysiert werden.

Untersucht man die Otp-Protein-Expression entlang des ventralen Nervensystems, so ist auffallend, dass das Otp-Protein im Gegensatz zur mRNA nur in den ersten fünf Segmenten, also den drei Thorakal-Segmenten (T1-T3) und den ersten zwei Abdominal-Segmenten (A1-A2), exprimiert wird.

In Abbildung 4.3 ist zum Vergleich eine *in situ* Hybridisierung mit einer *otp*-Sonde und eine Antikörperfärbung mit anti-Otp-Antikörpern dargestellt.



**Abb.4.3. Unterschiede zwischen der Expression der *otp*-mRNA und des Otp-Proteins im ventralen Nervensystem von *Drosophila*.** Dargestellt sind lichtmikroskopische Aufnahmen mit DIC-Filter von *in situ* Hybridisierungen mit einer *otp*-Sonde (A,C) und konfokale Aufnahmen von anti-Otp-Antikörperfärbungen (B,D) an Wildtyp-Embryonen im Stadium 14. A und B sind Seitenansichten, C und D ventrale Aufsichten, in allen Bildern ist anterior links.

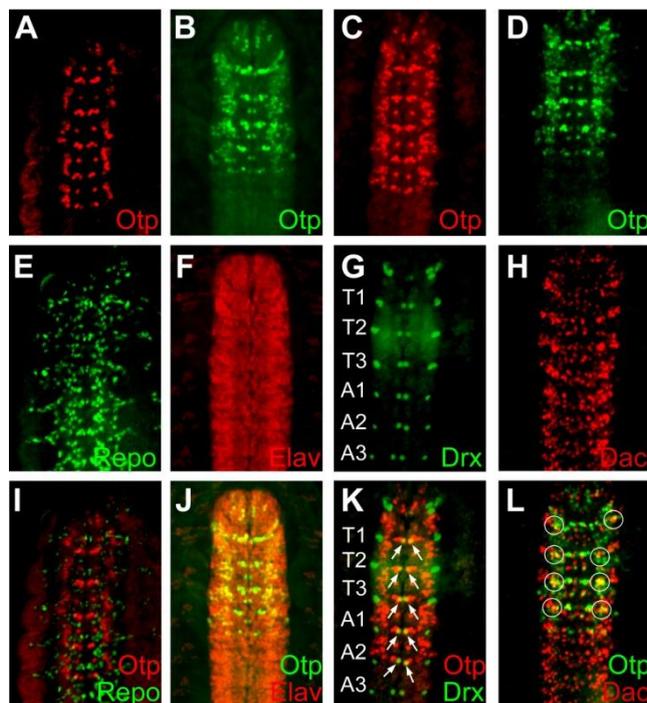
Aus den *in situ* Hybridisierungen in Abbildung 4.3 geht nochmals hervor, dass entlang des ventralen Nervensystems in den drei Thorakal-Segmenten (T1-T3) sowie den ersten beiden Abdominal-Segmenten (A1-A2) eine starke *otp*-mRNA Expression nachgewiesen werden

kann, während die *otp*-mRNA in den Abdominal-Segmenten A3-A8 nur schwach exprimiert wird (Abb.4.3.A, C). Das Otp-Protein kann im ventralen Nervensystem dagegen nur in den drei Thorakal-Segmenten (T1-T3) und den ersten beiden Abdominal-Segmenten (A1-A2) nachgewiesen werden kann (Abb.4.3.B, D). In den Abdominal-Segmenten A3-A8 kann keine Otp-Proteinexpression im ventralen Nervensystem nachgewiesen werden (Abb.4.3.B, D).

Da auch die *otp*-mRNA in den posterioren Segmenten schwächer exprimiert wird als in den anterioren, sollte ausgeschlossen werden, dass es sich nur um ein Problem bei der Nachweisgrenze des Otp-Proteins handelt. Es wäre möglich, dass das Otp-Protein in den posterioren Segmenten so schwach exprimiert wird, dass es unter die Nachweisgrenze des Antikörpers fällt. Um dies zu überprüfen wurde eine Antikörperfärbung mit dem Tyramide-Signal-Amplifikation- (TSA<sup>TM</sup>) System (Perkin Elmer) durchgeführt. Dies erzeugt durch eine Signalamplifikation eine bis zu 1000-fach höhere Sensitivität. Da auch mit dem TSA-System keine Otp-Proteinexpression in den posterioren Segmenten des ventralen Nervensystems nachgewiesen werden konnte (nicht gezeigt), kann ein Problem mit der Nachweisgrenze ausgeschlossen werden.

Es konnte also im ventralen Nervensystem ein Unterschied zwischen der *otp*-mRNA- und der Otp-Proteinexpression nachgewiesen werden. Dies deutet darauf hin, dass die *otp*-Expression im ventralen Nervensystem auf post-transkriptioneller Ebene reguliert wird.

Untersucht man die Expression eines Genes im Nervensystem, so ist es zuerst von Bedeutung, in welchen Zelltypen des Nervensystems das Gen exprimiert wird. Dazu sollte untersucht werden, ob es sich bei den *otp*-exprimierenden Zellen im ventralen Nervensystem um Neurone oder Gliazellen handelt. Das Homeoboxgen *reversed polarity (repo)* wird spezifisch in allen Gliazellen exprimiert (Xiong et al., 1994) und dient somit als Gliazellmarker. Das RNA-Bindeprotein Elav (*embryonic lethal abnormal vision*) wird ausschließlich in allen Neuronen von ihrer Geburt an in allen Stadien exprimiert (Robinow und White, 1988; Robinow und White, 1991) und dient somit als pan-neuraler Marker. Es wurden Doppelfärbungen mit anti-Otp-Antikörpern und anti-Repo- bzw. anti-Elav-Antikörpern durchgeführt (3.2.21).



**Abb.4.4. Otp-Expression im ventralen Nervensystem.** Konfokale Aufnahmen von Doppelfärbungen an Wildtyp-Embryonen im Stadium 14 mit anti-Otp-Antikörpern und anti-Repo-, anti-Elav-, anti-Drx, oder anti-Dac-Antikörpern. Dargestellt ist jeweils eine Aufsicht auf das ventrale Nervensystem, anterior ist oben. (A-D) Anti-Otp-Antikörper-färbung. (E) Anti-Repo-Antikörperfärbung. (F) Anti-Elav-Antikörperfärbung. (G) Anti-Drx-Antikörperfärbung. (H) Anti-Dac-Antikörperfärbung. (I) Übereinanderlagerung aus (A) und (E). (J) Übereinanderlagerung aus (B) und (F). (K) Übereinanderlagerung aus (C) und (G); Pfeile zeigen auf Zellen mit Co-Lokalisation. (L) Übereinanderlagerung aus (D) und (H); Zellen mit Co-Lokalisation sind durch Kreise hervorgehoben. Abk.: A: Abdominal-Segment; T: Thorakal-Segment.

Es konnte keine Co-Lokalisation von Otp mit Repo im ventralen Nervensystem nachgewiesen werden, Otp wird also nicht in Gliazellen exprimiert (Abb.4.4.A, E, I). Dagegen konnte eine Co-Lokalisation von Otp und Elav in allen Otp-exprimierenden Zellen nachgewiesen werden, Otp wird also im ventralen Nervensystem ausschließlich in Neuronen exprimiert (Abb.4.4.B, F, J).

Das Homeoboxgen *drx* wird im ventralen Nervensystem in den Thorakal-Segmenten in vier Neuronen pro Hemi-Segment und in den Abdominal-Segmenten in zwei Neuronen pro Hemi-Segment exprimiert (Abb.4.4.G). Von den beiden Drx-positiven Neuronen in den Abdominal-Segmenten liegt eins nah der Mittellinie und eins lateral, in den Thorakal-Segmenten kommen zwei zusätzliche lateral gelegene Neurone hinzu, die ein Cluster aus drei Neuronen bilden. Bei dem median gelegenen Neuron handelt es sich um die vMP2- („ventral Midline Precursor 2“) Zelle, in der neben *drx* auch das Homeoboxgen *homeobrain* exprimiert wird (Kaspar, 2008). Diese entsteht aus der Vorläuferzelle MP2 („Midline Precursor 2“), die sich nur ein einziges Mal teilt und die beiden postmitotischen Neurone dMP2 („dorsal Midline Precursor 2“) und vMP2 bildet (Thomas et al., 1984; Doe et al., 1988;). Es konnte eine Co-Lokalisation von Drx und Otp in den vMP2-Zellen der drei Thorakal- sowie der ersten beiden Abdominal-Segmente nachgewiesen werden (Abb.4.4.K, Pfeile).

Dachshund (Dac) wird in einer Vielzahl von Neuronen im ventralen Nervensystem exprimiert (Abb.4.4.H). In den Thorakal- sowie den ersten beiden Abdominal-Segmenten kann eine Co-

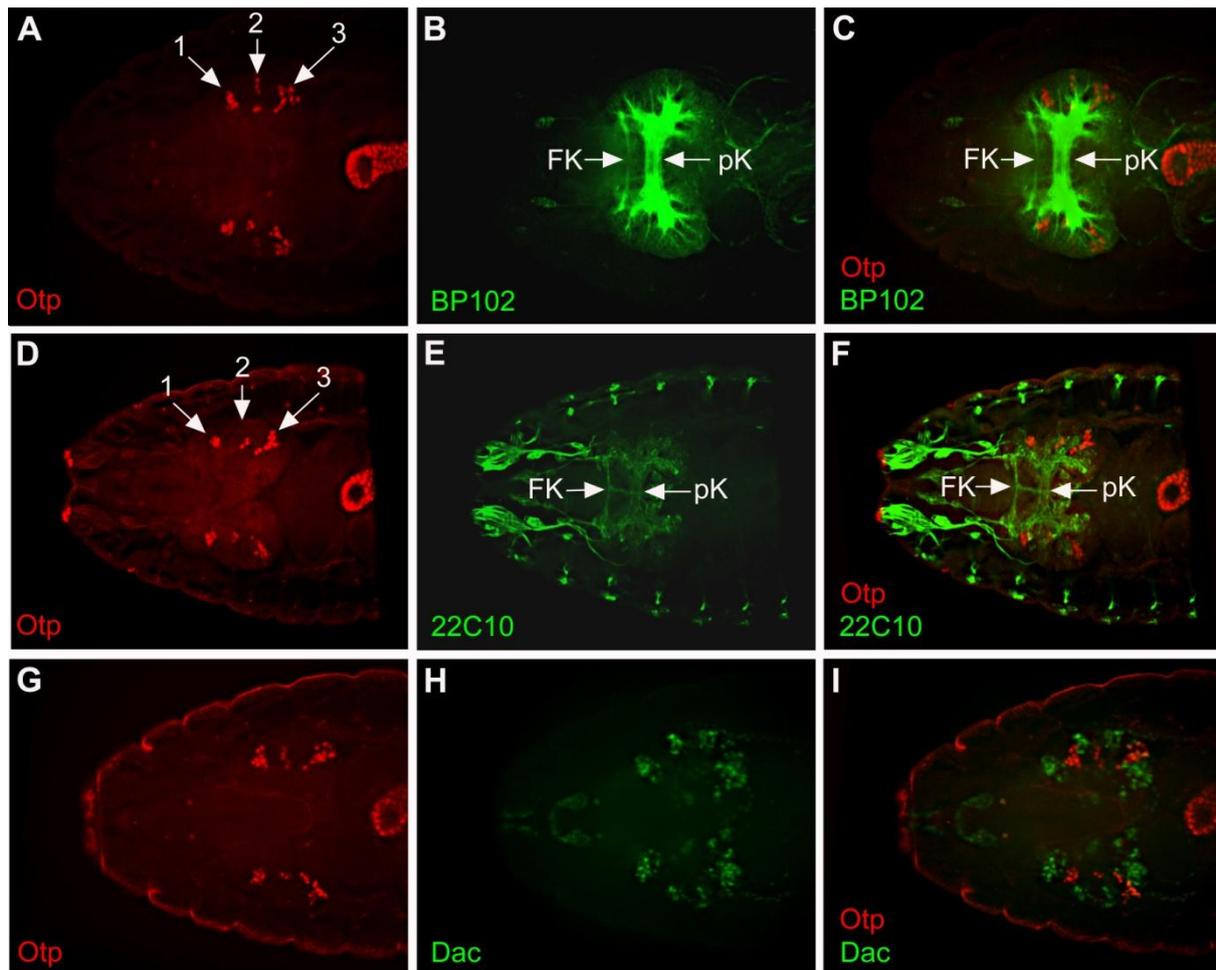
Lokalisation von Otp und Dac in einem Cluster von lateral gelegen Neuronen nachgewiesen werden (Abb.4.4.L, Kreise).

Es konnte also gezeigt werden, dass Otp im ventralen Nervensystem ausschließlich in Neuronen, darunter in den vMP2-Zellen exprimiert wird.

#### **4.1.2.3 Otp-Expression im embryonalen Gehirn**

Neben der Expression im ventralen Nervensystem wird Otp auch im Gehirn exprimiert. Das embryonale Gehirn von *Drosophila* setzt sich aus dem supraoesophagealen Ganglion und dem suboesophagealen Ganglion zusammen. Es ist aus zwei paarigen Hemisphären aufgebaut, die durch Kommissuren verbunden sind. Das supraoesophageale Ganglion ist dabei in das Protocerebrum, das Deutocerebrum und das Tritocerebrum unterteilt, das suboesophageale Ganglion in das mandibuläre Neuromer, das maxilläre Neuromer und das labiale Neuromer (Hartmann und Reichert, 1998; Hirth *et al.*, 2003).

In Abbildung 4.5 sind Doppelfärbungen mit anti-Otp-Antikörpern und den axonalen Markern BP102 und 22C10 sowie Dachshund (Dac) dargestellt.



**Abb.4.5. Otp-Expression im embryonalen Gehirn.** Konfokale Aufnahmen von Doppelfärbungen an Wildtyp-Embryonen im Stadium 14 mit anti-Otp-Antikörpern und anti-BP102-, anti-22C10- oder anti-Dac-Antikörpern. Dargestellt ist jeweils eine dorsale Aufsicht auf das Gehirn, anterior ist links. In der linken Spalte (A, D, G) sind jeweils die anti-Otp-Antikörperfärbungen dargestellt, in der mittleren Spalte die anti-BP102- (B) anti-22C10- (E), bzw. die anti-Dac-Antikörperfärbung (H) und in der rechten Spalte die Übereinanderlagerungen (C, F, I). Die Pfeile in A und D zeigen auf die Otp-positiven Zellcluster 1, 2 und 3. Abk.: FK: Frontalkommissur; pK: präorale Kommissur.

Otp wird im embryonalen Gehirn in drei kleinen Zellclustern pro Hemisphäre exprimiert (Abb.4.5.A, D, G, Pfeile). Cluster 1 besteht aus fünf, Cluster 2 aus drei und Cluster 3 aus zehn Otp-positiven Zellen. Dabei handelt es sich wie bei den Otp-exprimierenden Zellen im ventralen Nervensystem um Neurone (nicht gezeigt).

Der Marker BP102 färbt spezifisch alle Axone des zentralen Nervensystems und somit auch die Kommissuren (Seeger et al., 1993). Die präorale Kommissur verbindet die Hemisphären im Bereich des Protocerebrums, die Frontalkommissur im Bereich des Deutocerebrums. Durch Doppelfärbungen von Otp mit BP102 konnte somit die Lage der Otp-positiven Zellcluster im Vergleich zur präoralen Kommissur (pK) und zur Frontalkommissur (FK) bestimmt werden (Abb.4.5.A-C). So konnte nachgewiesen werden, dass sich die Otp-

positiven Zellcluster 2 und 3 im Protocerebrum und das Zellcluster 1 im Deutocerebrum befinden.

Das Mikrotubuli-assoziierte Protein Futsch, das von dem Antikörper 22C10 erkannt wird, wird in allen postmitotischen Neuronen des peripheren Nervensystems sowie einigen Neuronen des zentralen Nervensystems exprimiert (Hummel et al., 2000). Es wird dabei sowohl in den Zellkörpern als auch in den Axonen und Dendriten der Neurone exprimiert (Hummel et al., 2000). Durch Doppelfärbungen von Otp mit 22C10 konnte wie durch Doppelfärbungen mit BP102 die Lage der Otp-positiven Zellcluster im Vergleich zur präoralen Kommissur (pK) und zur Frontalkommissur (FK) bestimmt werden (Abb.4.5.D-F). Im Gegensatz zum ventralen Nervensystem konnte im Gehirn keine Co-Lokalisation von Otp mit Dachshund (Dac) nachgewiesen werden, die Otp-positiven Zellcluster befinden sich genau zwischen den Dac-positiven Zellclustern (Abb.4.5.G-I).

Außerdem wurden noch Doppelfärbungen mit den Markern Engrailed, Eyeless und Eyes absent durchgeführt. In allen Fällen konnte keine Co-Lokalisation mit Otp nachgewiesen werden (nicht gezeigt), so dass keine zusätzlichen Informationen über die Otp-exprimierenden Neurone im Gehirn gewonnen werden konnten.

Es konnte also gezeigt werden, dass Otp im embryonalen Gehirn in zwei kleinen Zellclustern im Protocerebrum und in einem kleinen Zellcluster im Deutocerebrum exprimiert wird, bei den Zellen handelt es sich um Neurone.

Das embryonale Expressionsmuster von *otp* deutet also darauf hin, dass *otp* eine wichtige Rolle in der Enddarm- und Nervensystementwicklung von *Drosophila* spielt. Um diese Funktion zu untersuchen benötigt man jedoch Mutanten, bei denen die Funktion von *otp* ausgeschaltet ist.

#### **4.2 Analyse des Enddarmphänotyps der Stämme 1024 und 13064**

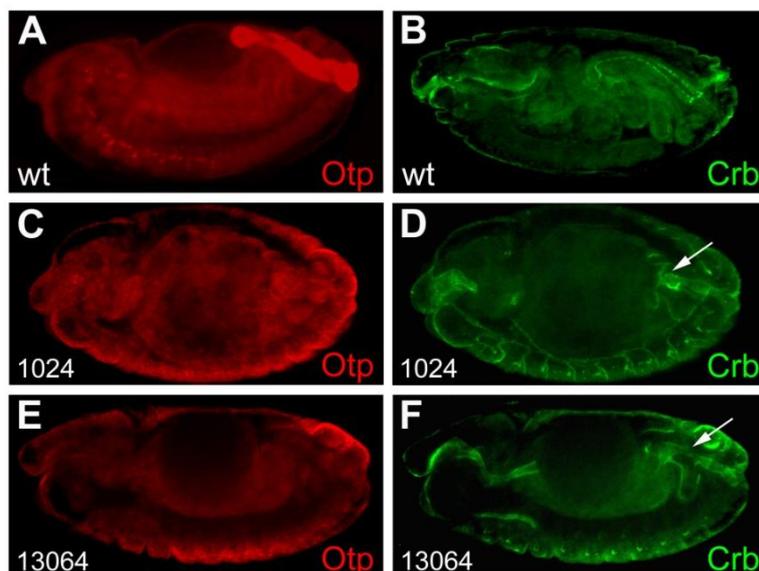
Die beiden EMS-Mutantenstämme 1024 und 13064 stammen aus einem EMS- (Ethyl-Methyl-Sulfonat) Mutagenese-Screen der 57B Region (Psenner, 2001). Über Komplementationsanalysen konnte bestimmt werden, dass die Punktmutationen der beiden Stämme in *otp* oder einem der benachbarten Gene CG9235 bzw. CG9236 liegt, es handelt sich dabei also um potentielle *otp*-Mutanten (Bach, 2005). Auch konnte nachgewiesen werden, dass homozygote Tiere im Embryonalstadium absterben und einen verkürzten Enddarm aufweisen. Dieser Phänotyp deutet darauf hin, dass es sich um *otp*-Mutanten handelt. Bei beiden Stämmen konnte jedoch in den Exons des *otp*-Gens keine Punktmutation identifiziert werden, so dass

der endgültige Nachweis, ob es sich bei den Stämmen um *otp*-Mutanten handelt, noch nicht erbracht war (Bach, 2005).

Diese Mutanten sollte im Folgenden näher charakterisiert werden. So sollte untersucht werden, ob es bei homozygoten Embryonen zu einem Verlust der Otp-Proteinexpression kommt und wie stark der Enddarm verkürzt ist. Durch Rettungsexperimente sollte dann endgültig nachgewiesen werden, dass es sich bei den Stämmen um *otp*-Allele handelt.

#### 4.2.1 Verlust der Otp-Proteinexpression in den Stämmen 1024 und 13064

Zuerst sollte bestimmt werden, ob es bei den Mutanten 1024 und 13064 zu einem Verlust der Otp-Proteinexpression kommt.



**Abb.4.6. Verlust der Otp-Proteinexpression in den Mutanten 1024 und 13064.** Dargestellt sind konfokale Aufnahmen von anti-Otp- (A, C, E) und anti-Crb- (B, D, F) Antikörperfärbungen an Wildtyp-Embryonen (A, B) und homozygoten Embryonen der Stämme 1024 (C, D) und 13064 (E, F) im Stadium 14. Die Pfeile in D und F zeigen auf den verkürzten Enddarm. Es handelt sich um Seitenansichten, anterior ist links, dorsal oben.

Wie in Abbildung 4.6 zu sehen kommt es bei homozygoten Embryonen der beiden Stämme zu einem kompletten Verlust der nachweisbaren embryonalen Otp-Proteinexpression (Abb.4.6.C, E). Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass in den Mutanten ein stark verkürztes Otp-Protein exprimiert wird, welches durch den Antikörper, der gegen den C-Terminus des Proteins gerichtet wird, nicht erkannt wird. Dieses Ergebnis liefert einen weiteren Hinweis, dass es sich bei den beiden Stämmen um *otp*-Mutanten handelt.

Da durch den Verlust der Otp-Proteinexpression der Enddarm in den Mutanten nicht mehr sichtbar ist, sollte dieser zusätzlich mit einem unabhängigen Marker angefärbt werden. *Crumbs* (*crb*) wird in der apikalen Oberfläche ektodermaler Epithelien, also auch der des Enddarms, exprimiert (Tepass et al., 1990) und kann somit als Enddarmmarker eingesetzt werden. Durch die Antikörperfärbungen mit anti-Crb-Antikörpern konnte bei beiden Allelen

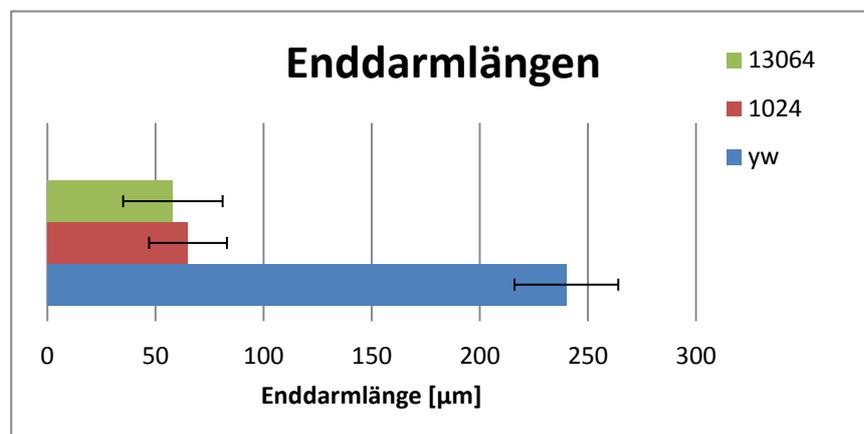
ein im Vergleich zum Wildtyp stark verkürzter Enddarm nachgewiesen werden (Abb.4.6. D, F, Pfeile).

#### 4.2.2 Bestimmung der Enddarmlänge der Stämme 1024 und 13064

Homozygote Embryonen der Fliegenstämme 1024 und 13064 zeigen also einen stark verkürzten Enddarm (Bach, 2005; 4.2.1). Wie stark der Enddarm dieser Mutanten tatsächlich verkürzt ist, sollte nun auch statistisch belegt werden. Dazu wurden die Enddarmlängen der Mutanten mit Hilfe von Antikörperfärbungen mit anti-Crumbs-Antikörpern bestimmt. Pro Fliegenstamm wurden die Enddarmlängen von 100 Embryonen im Stadium 14 mit Hilfe der Software AnalySIS (Olympus) bestimmt. In Tabelle 4.1 und Abbildung 4.7 ist das Ergebnis der Messung der Enddarmlängen der Mutanten im Vergleich zu Wildtyp-Embryonen dargestellt.

**Tabelle 4.1. Enddarmlängen von Wildtyp-Embryonen und *otp*-Mutanten im Stadium 14.** Enddarmlängen wurden in 100 Embryonen pro Genotyp mit Hilfe der AnalySIS Software (Olympus) gemessen, aus den so ermittelten Werten wurde der Mittelwert und die Standardabweichung bestimmt.

Genotyp	Enddarmlänge [ $\mu\text{m}$ ] (Mittelwert + Standardabweichung)
Wildtyp	240 $\pm$ 24
1024	65 $\pm$ 18
13064	58 $\pm$ 23



**Abb.4.7. Graphische Darstellung der mittleren Enddarmlängen von homozygoten 13064 (grüner Balken) und 1024 (roter Balken) Embryonen im Stadium 14 im Vergleich zur Enddarmlänge von *yw* Embryonen (blauer Balken).** Die Standardabweichung ist durch die schwarzen Linien in den jeweiligen Balken dargestellt.

Während Wildtyp-Embryonen eine Enddarmlänge von durchschnittlich 240 $\mu\text{m}$  aufweisen (siehe auch Iwaki et al., 2001), haben homozygote Embryonen des Stamms 1024 nur einen 65 $\mu\text{m}$  langen Enddarm und homozygote Embryonen des Stamms 13064 einen 58 $\mu\text{m}$  langen Enddarm (Tab.4.1 und Abb.4.7).

Es konnte also nachgewiesen werden, dass der Enddarm der Stämme 1024 und 13064 um ~75% verkürzt ist.

#### 4.2.3 Rettung des Enddarmphänotyps der Stämme 1024 und 13064

Es sollte nun untersucht werden, ob sich der oben beschriebene Enddarmphänotyp und die embryonale Letalität der Stämme 1024 und 13064 durch ektopische Expression von *otp* im Enddarm retten lässt. Dazu standen Fliegen zur Verfügung, die ein *otp*-Rescue-Konstrukt stabil in der Keimbahn tragen. Dieses Rescue-Konstrukt besteht aus einer 1.4kb großen *otp*-cDNA, einem 3.6kb großen 5'-Bereich inklusive des Enddarm-spezifischen regulatorischen Elements und der 5'-UTR sowie einem 1kb großen 3' flankierenden Bereich im Vektor pCaSpeR (Abb.4.8.A). Das regulatorische Element für die *otp*-Expression im Enddarm liegt 950bp vor dem Transkriptionsstart des Enddarm-spezifischen *otp*-Transkript und ist 1.8kb groß (Kusch et al., 2002).

Da nur Fliegen zur Verfügung standen, die das Konstrukt auf dem 2.Chromosom und somit auf dem gleichen Chromosom wie die Mutation tragen, wurde dieses durch einen Jump-Start mobilisiert (3.2.33). Unter einem Jump-Start von P-Elementen versteht man die spätere Mobilisierung eines bereits im Genom integrierten P-Elements. So konnte aus dem Ausgangsstamm *otp*-Rescue21/1 der Fliegenstamm *otp*-Rescue21/1-3 erzeugt werden, der das Rescue-Konstrukt auf dem 3.Chromosom trägt.

Durch Kreuzungen sollte das Rescue-Konstrukt nun in die Mutanten 1024 und 13064 eingebracht werden. Dazu wurden in einer ersten Kreuzung heterozygote Mutanten (1024 bzw. 13064/CyO; +/+) mit heterozygoten Rescue-Fliegen gekreuzt (+/+; *otp*-Rescue21/1-3/TM3Sb). In der F1 wurde auf markerlose Fliegen (1024 bzw. 13064/+; *otp*-Rescue21/1-3/+) selektiert und diese einer Selbstung unterzogen.

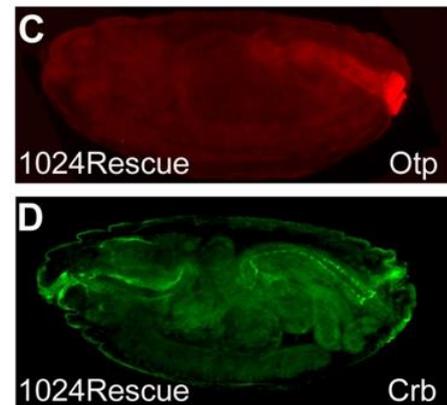
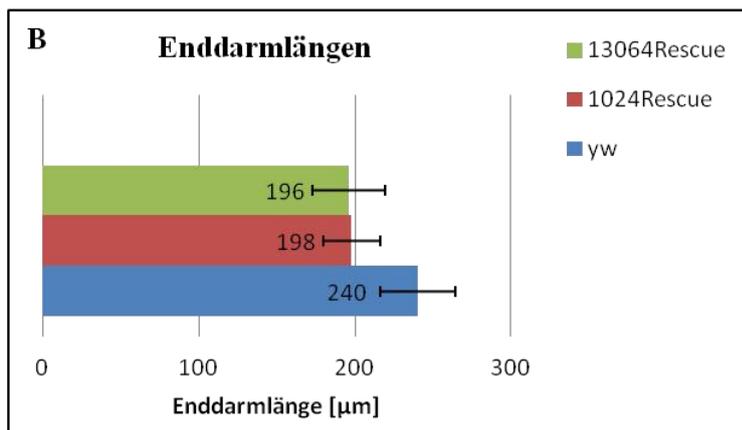
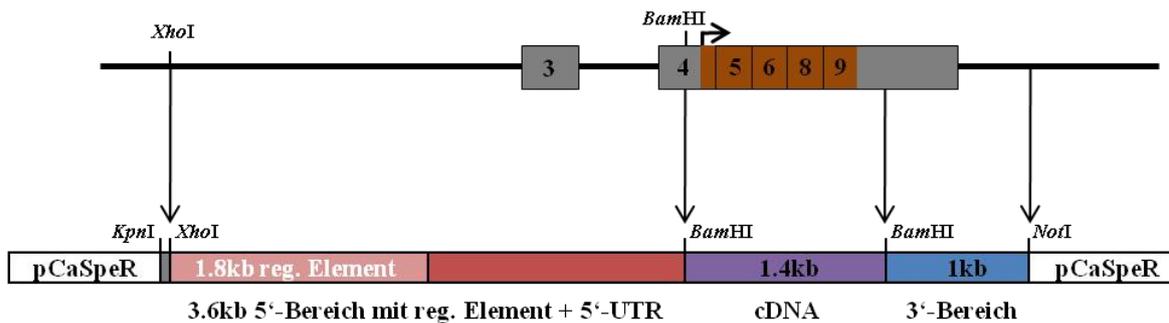
Dabei ergeben sich folgende prozentuale Verteilungen in der F2. 25% der F2 sind homozygot für die Mutation, 50% heterozygot und 25% sind wildtypisch bzgl. der Mutation. Findet keine Rettung statt, sollte die embryonale Letalität also 25% betragen (alle Tiere die homozygot für die Mutation sind). Da 75% der homozygoten Mutanten das Rescue-Konstrukt tragen ergibt sich bei einer vollständigen Rettung eine embryonale Letalität von nur noch 6.25 % (Tiere die homozygot für die Mutation sind und kein Rescue-Konstrukt tragen).

Bei den Rettungsexperimenten konnte beim Stamm 1024 eine embryonale Letalität von 23,64%, beim Stamm 13064 von 20,5% nachgewiesen werden (es wurden jeweils 200 Embryonen analysiert). Die Werte liegen also nur leicht unter den erwarteten Werten ohne

Rettung. Mit dem *otp*-Rescue-Konstrukt konnte die embryonale Letalität der Mutanten also nicht vollständig gerettet werden.

Embryonen der F2 wurden außerdem auf eine *Otp*-Expression im Enddarm und auf ihre Enddarmlänge untersucht. So wurden Antikörperfärbungen mit anti-*Otp*-Antikörpern und dem apikalen Epidermismarker *Crb* durchgeführt (3.2.21).

#### A *otp*-Rescue-Konstrukt



**Abb.4.8. Rettung des Enddarmphänotyps der Stämme 1024 und 13064.** (A) Aufbau des *otp*-Rescue-Konstrukts. Oben ist das Enddarm-spezifische *otp*-Transkript dargestellt, die grauen Boxen stellen nicht-translatierte Bereiche dar, die braunen Boxen translatierte Bereiche. Darunter ist das Rescue-Konstrukt im Vektor pCaSpeR dargestellt. (B) Graphische Darstellung der Enddarmlängen von 1024 und 13064 Embryonen mit Rescue-Konstrukt im Vergleich zur wildtypischen (*yw*) Enddarmlänge. (C) Anti-*Otp*-Antikörperfärbung 1024 Embryos mit Rescue-Konstrukt. (D) Anti-*Crb*-Antikörperfärbung 1024 Embryos mit Rescue-Konstrukt. Bei (C) und (D) handelt es sich um Seitenansichten, anterior ist links, dorsal oben.

Mit anti-*Otp*-Antikörperfärbungen konnte nachgewiesen werden, dass es im Enddarm von Embryonen mit Rescue-Konstrukt wieder zu einer wildtypischen *Otp*-Proteinexpression kommt (Abb.4.8.C). Ein Embryo mit Rescue-Konstrukt zeigt dabei im Gegensatz zu einem wildtypischen Embryo ausschließlich eine *Otp*-Expression im Enddarm und nicht im Nervensystem und ist so eindeutig zu identifizieren. Durch Antikörperfärbungen mit anti-*Crb*-Antikörpern wurde die Enddarmlänge dieser Embryonen bestimmt. Dabei betrug die mittlere Enddarmlänge von 1024 Embryonen mit Rescue-Konstrukt 198μm, die von 13064

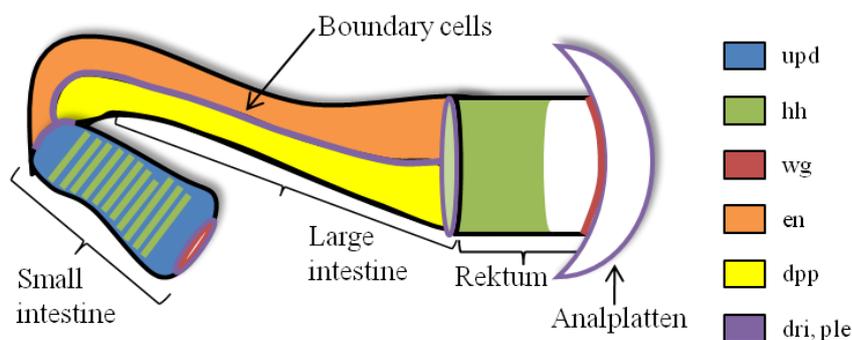
Embryonen mit Rescue-Konstrukt 196µm (Mittelwert aus jeweils 50 Messungen) (Abb.4.8.B, D). Es konnte also nachgewiesen werden, dass die Enddarmlänge der Embryonen der Stämme 1024 und 13064 mit Rescue-Konstrukt wieder ~82% der wildtypischen Länge beträgt.

Durch das *otp*-Rescue-Konstrukt konnte zwar die embryonale Letalität der Stämme 1024 und 13064 nicht gerettet werden, wohl aber der Enddarmphänotyp. Embryonen mit Rescue-Konstrukt zeigen im Enddarm eine wildtypische *Otp*-Expression und eine fast wildtypische Enddarmlänge. Damit konnte also nachgewiesen werden, dass der Enddarmphänotyp der Stämme 1024 und 13064 durch einen Verlust der *Otp*-Expression verursacht wird, es sich also um *otp*-Mutanten handelt.

Die Stämme werden im Folgenden als *otp*<sup>1024</sup> und *otp*<sup>13064</sup> bezeichnet und sollten nun noch genauer analysiert werden.

#### 4.2.4 Bestimmung des Enddarmphänotyps der *otp*-Mutanten durch Färbungen mit Enddarmmarkern

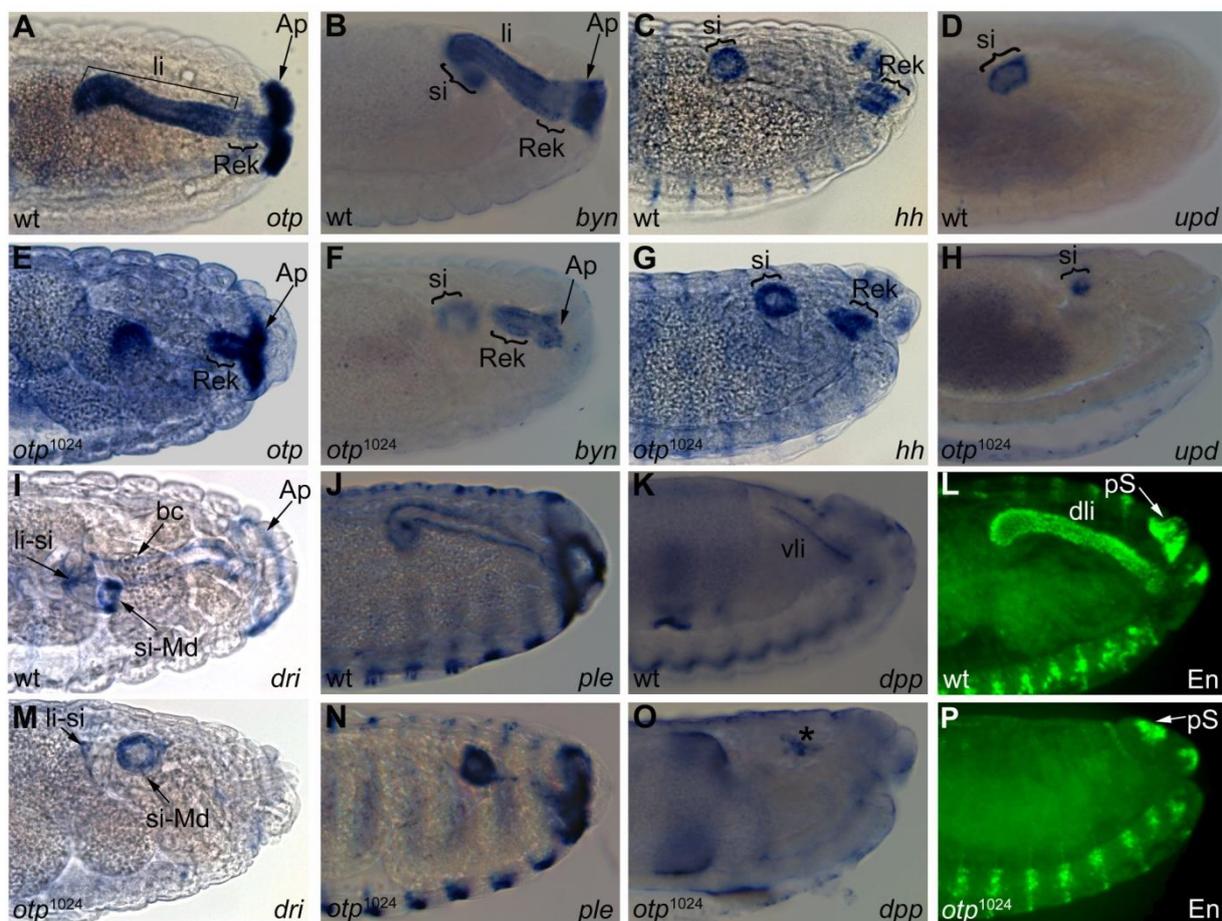
Der embryonale Enddarm von *Drosophila melanogaster* ist wie bereits beschrieben (4.1.2.1) entlang der anterior-posterioren Achse in drei morphologisch unterscheidbare Regionen - „small intestine“, „large intestine“ und Rektum - unterteilt (Hoch et al., 1996;). In Abbildung 4.9 ist der embryonale Enddarm von *Drosophila* schematisch dargestellt.



**Abb.4.9. Schematische Darstellung des embryonalen Enddarms.** Der embryonale Enddarm ist entlang der anterior-posterioren Achse in die Regionen „small intestine“, „large intestine“ und Rektum unterteilt. An das Rektum schließen posterior die Analplatten an. Das „large intestine“ zeigt als einziges eine Unterteilung in einen dorsalen und einen ventralen Bereich mit spezifischem Expressionsmuster. Die beiden Bereiche sind durch die sogenannten „boundary cells“ voneinander getrennt. Dargestellt sind außerdem die Expressionsmuster der Gene *unpaired (upd)*, *hedgehog (hh)*, *wingless (wg)*, *engrailed (en)*, *decapentaplegic (dpp)* und *dead ringer (dri)*.

Für jede der oben genannten Regionen existieren spezifische Marker, mit denen nun untersucht werden sollte, welche Bereiche des Enddarms in den *otp*-Mutanten betroffen sind. Dazu wurden Digoxigenin-markierte DNA-Sonden zum Nachweis von *otp*-, *brachyenteron- (byn)*, *decapentaplegic- (dpp)*, *hedgehog- (hh)*, *pale- (ple)*, *retained/dead ringer- (dri)* und

*unpaired-* (*upd*) mRNA hergestellt. Von den Genen *otp*, *dri*, *hh* und *upd* standen cDNAs zur Verfügung, von *byn* wurden die Exons 4 und 5 sowie das dazwischen liegende Intron (2kb) mit den Primern *byn1* und *byn 2* und von *ple* das 2kb große Exon 5 mit den Primer *ple1* und *ple2* mittels PCR amplifiziert (3.2.17) und zur Sondenmarkierung (3.2.19) eingesetzt. Mit diesen Sonden wurden *in situ* Hybridisierungen an Wildtyp-Embryonen und Embryonen der *otp*-Mutanten durchgeführt (3.2.22). In Abbildung 4.10 sind *in situ* Hybridisierungen und Antikörperfärbungen von Wildtyp-Embryonen und homozygoten *otp*<sup>1024</sup>-Embryonen mit verschiedenen Enddarmmarkern dargestellt.



**Abb.4.10. Der Enddarmphänotyp von *otp*<sup>1024</sup>.** Dargestellt sind lichtmikroskopische Aufnahmen mit DIC-Filter von *in situ* Hybridisierungen mit Digoxigenin-markierten DNA-Sonden und fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Antikörperfärbungen mit verschiedenen Enddarmmarkern an Wildtyp- (A-D; I-L) und *otp*<sup>1024</sup>-Embryonen (E-H; M-P) im Stadium 14. (A) *otp*-Sonde, Wildtyp-Embryo. (B) *byn*-Sonde, Wildtyp-Embryo. (C) *hh*-Sonde, Wildtyp-Embryo. (D) *upd*-Sonde, Wildtyp-Embryo. (E) *otp*-Sonde, *otp*<sup>1024</sup>-Embryo. (F) *byn*-Sonde, *otp*<sup>1024</sup>-Embryo. (G) *hh*-Sonde, *otp*<sup>1024</sup>-Embryo. (H) *upd*-Sonde, *otp*<sup>1024</sup>-Embryo. (I) *dri*-Sonde, Wildtyp-Embryo. (J) *ple*-Sonde, Wildtyp-Embryo. (K) *dpp*-Sonde, Wildtyp-Embryo. (L) Antikörperfärbung mit anti-En-Antikörpern an einem Wildtyp-Embryo. (M) *dri*-Sonde, *otp*<sup>1024</sup>-Embryo. (N) *ple*-Sonde, *otp*<sup>1024</sup>-Embryo. (O) *dpp*-Sonde, *otp*<sup>1024</sup>-Embryo; *dpp* wird hier nur in eine kleine Bereich am anterioren Ende des Enddarms exprimiert (Stern). (P) Antikörperfärbung mit anti-En-Antikörpern an einem *otp*<sup>1024</sup>-Embryo. Bei allen Bilder handelt es sich um Seitenansichten, anterior liegt links, dorsal oben.

Abk.: Ap: Analplatten; bc: „boundary cells“; dli: dorsaler Bereich des „large intestine“; li: „large intestine“; Md: Mitteldarm; pS: posteriore Spirakel; Rek: Rektum; si: „small intestine“; vli: ventraler Bereich des „large intestine“.

Im Gegensatz zum Otp-Protein kann *otp*-mRNA in den verbleibenden Bereichen des Enddarms homozygoter *otp*<sup>1024</sup>-Embryonen nachgewiesen werden (Abb.4.10.E). Die *otp*-mRNA wird hier in den stark reduzierten Analplatten, im Rektum und in einen nicht mit dem Rektum verbundenen Bereich im anterioren Bereich des Enddarms exprimiert. Ob es sich bei diesem Bereich um einen Teil des „large intestine“ handelt, der in den Mutanten nicht mit dem Rektum verbunden ist, oder um einen Teil des „small intestine“, das in der Mutante eine ektopische *otp*-Expression zeigt, konnte hier nicht näher bestimmt werden. Außerdem konnte nachgewiesen werden, dass die Analplatten in der Mutante verkleinert sind (Abb.4.10.E, Pfeil). Diese liegen nicht wie im Wildtyp am posterioren Ende aufgelagert vor, sondern sind in den Embryo hinein verlagert (Abb.4.10.E, Pfeil).

Das T-Box-Gen *brachyenteron* (*byn*) wird im gesamten Enddarm exprimiert (Kispert et al., 1994; Abb.4.10.B) und dort für die Aufrechterhaltung und Spezifizierung des Enddarms benötigt (Singer et al., 1996). In *otp*-Mutanten wird *byn* in den verbleibenden Bereichen des Enddarms und den Analplatten exprimiert (Abb.4.10.F). Wie durch die *in situ* Hybridisierungen mit einer *otp*-Sonde können auch hier der stark verkürzte Enddarm sowie die reduzierten und nicht richtig positionierten Analplatten nachgewiesen werden (Abb.4.10.F, Pfeil).

*Hedgehog* (*hh*) codiert für ein Zellsignalmolekül, das für die Aufrechterhaltung des „small intestine“ und des Rektums notwendig ist (Takashima und Murakami, 2001). In *hh*-Mutanten ist das „small intestine“ reduziert und das Rektum fast vollständig degeneriert (Takashima und Murakami, 2001). *Hh* wird im „small intestine“ und Rektum exprimiert (Abb.4.10.C). In homozygoten *otp*<sup>1024</sup>-Embryonen sind die beiden *hh*-Expressionsdomänen nicht betroffen, diese sind jedoch deutlich zusammengerückt (Abb.4.10.G), was darauf hindeutet, dass der dazwischen liegende Bereich betroffen ist.

Das Gen *unpaired* (*upd*) codiert für ein sekretiertes Protein, das den JAK (Janus Kinase) / STAT Signalweg aktiviert (Harrison et al., 1998). Neben der Expression in 7 und später in 14 Streifen wird *upd* außerdem im „small intestine“ exprimiert (Johansen et al., 2003; Abb.4.10.D). Die Expression von *upd* im „small intestine“ bleibt in den *otp*-Mutanten zwar erhalten, ist im Gegensatz zur wildtypischen *upd*-Expression im „small intestine“ jedoch reduziert (Abb.4.10.H).

Das AID- (A-T-reiche Interaktionsdomäne-) Box-Gen *retained* (*retn*) / *dead ringer* (*dri*) wird in den „boundary cells“ des „large intestine“, an der Grenze zwischen „small intestine“ und Mitteldarm sowie in einer Zellreihe um die Analplatten exprimiert (Gregory et al., 1996; Shandala et al., 1999; Abb.4.10.I). In homozygoten *otp*<sup>1024</sup>-Embryonen kann keine Expression

von *retn/dri* in den „boundary cells“ zwischen der ventralen und dorsalen Region des „large intestine“ und am posterioren Ende des „large intestine“ sowie in der Zellreihe um die Analplatten nachgewiesen werden (Abb.4.10.M). In den „boundary cells“ am anterioren Ende des „large intestine“ sowie an der Grenze zwischen „small intestine“ und Mitteldarm kann dagegen eine Expression von *retn/dri* nachgewiesen werden (Abb.4.10.M, Pfeile).

Das Gen *pale (ple)* codiert für eine Tyrosin-Hydroxylase (Neckameyer und White, 1993), es wird wie *dri* in den „boundary cells“ sowie in einer Zellreihe um die Analplatten exprimiert (Abb.4.10.J). In homozygoten *otp*<sup>1024</sup>-Embryonen wird *ple* nur am Übergang vom Mitteldarm zu „small intestine“ sowie in den Analplatten exprimiert (Abb.4.10.N). Bei Expression in den Analplatten handelt es sich jedoch im Gegensatz zur wildtypischen Expression nicht um eine Expression in einer Zellreihe um die Analplatten sondern um eine Expression in den gesamten reduzierten Analplatten.

*Decapentaplegic (dpp)*, das *Drosophila* Homolog von BMP4 (Bone Morphogenetic Protein 4), ist ein Signalmolekül des TGFβ-Signalweges. Es wird in einem schmalen Bereich des „large intestine“ anterior zum Rektum und schwach in der ventralen Region des „large intestine“ exprimiert und dort für die Endoreplikation benötigt (Smith und Orr-Weaver, 1991; Takashima und Murakami, 2001). Während in Wildtyp-Embryonen die oben beschriebene *dpp*-Expression nachgewiesen werden kann (Abb.4.10.K), kann bei *otp*<sup>1024</sup>-Embryonen nur eine Expression in einem kleinen, nicht definierten Bereich am anterioren Ende des Enddarms nachgewiesen werden (Abb.4.10.O, Stern).

Das Homeoboxgen *engrailed (en)* wird im gesamten Enddarmprimordium und später in der dorsalen Region des „large intestine“ exprimiert (Takashima und Murakami, 2001; Abb.4.10.L), wo es für die Bildung der „boundary cells“ benötigt wird. In homozygoten *otp*<sup>1024</sup>-Embryonen kann keine Expression von Engrailed im „large intestine“ nachgewiesen werden (Abb.4.10.P).

Durch die Analyse homozygoter *otp*<sup>13064</sup>-Embryonen mit den oben beschriebenen Markern konnte ein genauso stark ausgeprägter Phänotyp wie der von *otp*<sup>1024</sup>-Embryonen nachgewiesen werden (nicht gezeigt), d.h. bei *otp*<sup>1024</sup> und *otp*<sup>13064</sup> handelt es sich um gleich starke *otp*-Allele.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass sich das „small intestine“ und das Rektum in *otp*-Mutanten weitestgehend normal entwickeln und eine fast wildtypische Expression von spezifischen Markern zeigen. Im Rektum werden *byn* und *hh* wildtypisch exprimiert, während es im „small intestine“ zwar zu einer wildtypischen Expression von *hh* kommt, die Expression von *upd* jedoch reduziert ist. Das „large intestine“ ist dagegen dramatisch betroffen, keine

spezifischen Marker für diesen Bereich konnten in den *otp*-Mutanten nachgewiesen werden. In den „boundary cells“ konnte keine Expression von *dri* oder *ple* nachgewiesen werden, dies deutet darauf hin, dass auch diese Zellen in *otp* Mutanten fehlen. Im dorsalen Bereich des „large intestine“ kann keine Expression von En nachgewiesen werden, im ventralen Bereich fehlt die Expression von *dpp* bis auf einen kleinen Bereich, der jedoch keiner spezifischen Struktur des Enddarm zugeordnet werden konnte. Es konnte somit gezeigt werden, dass die Verkürzung des Enddarms in homozygoten Embryonen der Stämme *otp*<sup>1024</sup> und *otp*<sup>13064</sup> hauptsächlich auf das Fehlen des längsten Bereichs des Enddarms, des „large intestine“, zurückzuführen ist. Außerdem sind in den *otp*-Mutanten die Analplatten stark reduziert und falsch positioniert.

Nachdem gezeigt werden konnte, welche Bereiche des Enddarms in den *otp*-Mutanten betroffen sind, sollte nun untersucht werden, was die Ursachen für das Fehlen dieser Bereiche sind.

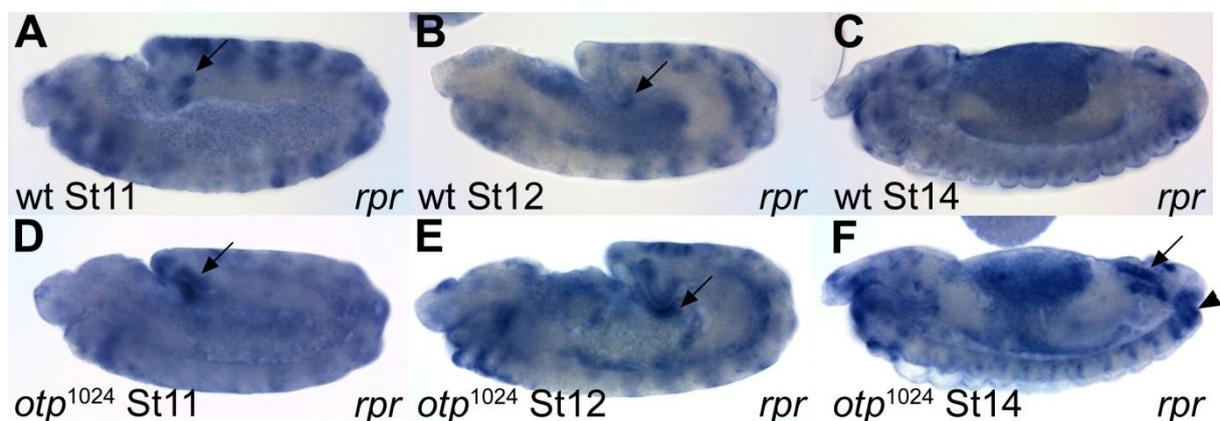
#### **4.2.5 Ursache des Enddarmphänotyp der *otp*-Mutanten**

Um eine Idee für mögliche Ursachen des Enddarmphänotyps von *otp*-Mutanten zu bekommen, muss man zuerst die Entwicklung des embryonalen Enddarms genauer betrachten. Der Enddarm entsteht aus dem Enddarmprimordium, einem Ring aus etwa 200 Blastoderm-Zellen, die während der Gastrulation einen kurzem Epitheliumsack bilden (Harbecke und Janning, 1989; Campos-Ortega und Hartenstein, 1997). Die Zellen des Enddarmprimordiums entstehen dabei nicht durch Proliferation sondern als Ergebnis der synzytialen Kernteilungen und der Zellularisation des Blastoderms. Vom Blastoderm-Stadium bis zu Stadium 10 durchlaufen die Zellen des Enddarmprimordiums zwei Runden von Mitosen, in der sich die meisten Zellen des Enddarmprimordiums teilen (Campos-Ortega und Hartenstein, 1997). Nur wenige Zellen des Enddarms durchlaufen in den Stadien 11-13 noch Mitosen, die Elongation des Enddarms nach Stadium 10 findet also ohne Beteiligung von Zellteilungen statt (Iwaki et al., 2001). In *string*-Mutanten, bei denen keine postblastodermale Teilungen stattfinden, entwickelt sich der Enddarm wildtypisch (Hartenstein und Posakony 1990; Lengyel und Iwaki, 2002), d.h. postblastodermale Teilungen spielen keine Rolle bei der wildtypischen Enddarmentwicklung. Damit kann auch ausgeschlossen werden, dass der verkürzte Enddarm in den *otp*-Mutanten auf fehlende postblastodermale Teilungen zurückzuführen ist.

Einen Hinweis auf eine mögliche Ursache des Enddarmphänotyps der *otp*-Mutanten liefert die bereits bekannte Ursache des Enddarmsphänotyps bei *byn*-Mutanten. Bei diesen ist Apoptose

im Enddarmprimordium verantwortlich für den reduzierten Enddarm und die verkleinerten Analplatten (Singer et al., 1996). Unter Apoptose versteht man den programmierten Zelltod. Apoptose spielt keine Rolle bei der Entwicklung von Größe und Morphologie des wildtypischen Enddarms, Embryonen der Defizienz *Df(3L)H99* bei denen die drei pro-apoptotischen Gene *reaper* (*rpr*), *hid* / *Wrinkled* und *grim* fehlen und demzufolge keine Apoptose stattfindet, zeigen einen normal entwickelten Enddarm (Iwaki et al., 2001). Um zu untersuchen, ob der verkürzte Enddarm in *otp*-Mutanten durch Apoptose verursacht wird, wurde die Expression des pro-apoptotischen Gens *reaper* (*rpr*) in *otp*-Mutanten untersucht. *Rpr*-mRNA wird in Zellen exprimiert, kurz bevor diese in Apoptose gehen (White et al., 1994).

Das Gen *reaper* besteht aus nur einem Exon (851bp), dieses wurde mittels PCR mit den Primern *reaper1* und *reaper2* amplifiziert (3.2.17) und diente als Template zur Herstellung einer Digoxigenin-markierten DNA-Sonde (3.2.19). Mit dieser Sonde wurden *in situ* Hybridisierungen an Wildtyp- und *otp*<sup>1024</sup>-Embryonen durchgeführt (3.2.22).



**Abb.4.11. Apoptose im Enddarm von *otp*-Mutanten.** Lichtmikroskopische Aufnahmen mit DIC-Filter von *in situ* Hybridisierungen mit einer *reaper* (*rpr*)-Sonde an Wildtyp- (A-C) und homozygoten *otp*<sup>1024</sup>-Embryonen (D-F) verschiedener Stadien. Die Pfeile in A und B zeigen auf Bereiche mit wildtypischer *rpr*-Expression im Enddarmprimordium, die Pfeile und die Pfeilspitze in D-F auf Bereiche mit erhöhter *rpr*-Expression in der Mutante. Bei allen Bildern handelt es sich um Seitenansichten, anterior ist links, dorsal oben.

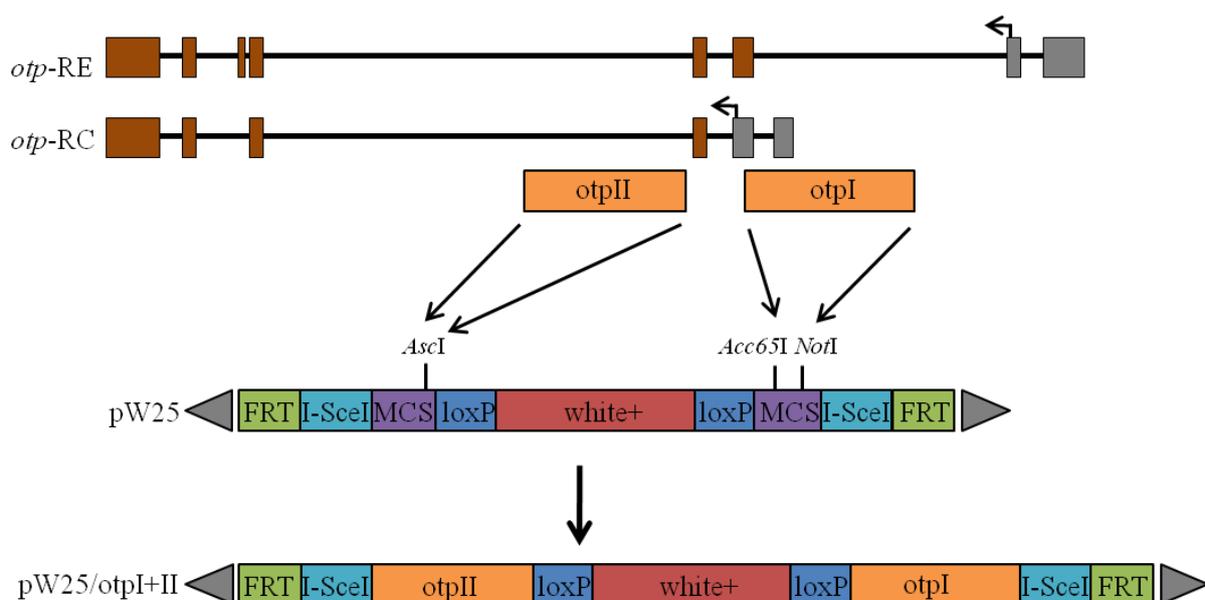
Während der Enddarmentwicklung von Wildtyp-Embryonen kann man im Stadium 11 einige *rpr*-exprimierende Zellen im Enddarmprimordium und im Stadium 11-13 in den sich entwickelnden Malpighischen Gefäßen detektieren (Abb.4.11.A-C, Pfeile).

Ab Stadium 11 kann in homozygoten *otp*<sup>1024</sup>-Embryonen eine ansteigende Zahl von *rpr*-exprimierenden Zellen im Enddarmprimordium nachgewiesen werden (Abb.4.11.D, Pfeil). Diese bleibt während der gesamten Embryonalentwicklung sowohl während des Keimstreifrückzugs in Stadium 12 (Abb.4.11.E, Pfeil), als auch im Stadium 14 im Enddarm und den Analplatten erhöht (Abb.4.11F, Pfeil und Pfeilspitze).

Diese Ergebnisse zeigen, dass eine der Hauptursachen des verkürzten Enddarms und der verkleinerten Analplatten von *otp*-Mutanten Apoptose im Enddarmprimordium und im sich entwickelnden Enddarm und den Analplatten ist.

#### 4.3 Erzeugung einer *otp*-Mutante durch „Ends-Out Gene Targeting“

Zusätzlich zu den beiden EMS-induzierten *otp*-Mutanten sollte auch eine *otp*-Mutante gerichtet durch „Ends-Out Gene Targeting“ (Rong und Golic, 2000; Rong und Golic, 2001; Gong und Golic, 2004) erzeugt werden. Die ersten Schritte dazu wurden bereits in eigenen Vorarbeiten durchgeführt (Bach, 2005) und sollten nun abgeschlossen werden. So waren bereits mittels P-Element-basierter Keimbahntransformation transgene Fliegen erzeugt worden, die ein Konstrukt tragen, welches zur Erzeugung einer *otp*-Mutante mittels homologer Rekombination eingesetzt werden konnte. Diese Fliegen enthalten ein pW25/*otpI+II*-Konstrukt stabil in der Keimbahn. Der Vektor pW25 ist speziell für die Durchführung von „Ends-Out Gene Targeting“ konzipiert, er besitzt zwei Polylinker (MCS), in die zwei Fragmente der Zielregion (sogenannte homologe Arme) inkloniert werden und zwischen denen sich ein von „loxP-Sites“ flankiertes *white*<sup>+</sup>-Markergen befindet (Abb.4.12). Außerdem befinden sich auf beiden Seiten eine I-*SceI*-Erkennungssequenz und eine FRT-(*Flp* *R*ecombinase *T*arget) Stelle. I-*SceI* ist ein Restriktionsenzym mit einer 18bp langen Erkennungssequenz, die im gesamten Genom von *Drosophila melanogaster* nicht vorkommt.



**Abb.4.12. Schema „Ends-Out Gene Targeting“.** Dargestellt sind die Exon-Intron-Struktur der beiden *otp*-Transkripte *otp-RE* und *otp-RC*, die Lage der homologen Arme *otpI* und *otpII*, der Ausgangsvektor pW25 sowie das fertige pW25/*otpI+otpII*-Konstrukt.

Über Aktivierung durch eine Flp-Rekombinase kann das Konstrukt als extrachromosomaler Ring ausgeschnitten werden. Danach kann das Konstrukt über das Restriktionsenzym *I-SceI* linearisiert werden. Eine Rekombination der Zielsequenz mit diesem Konstrukt führt zur einer Insertion des *white*<sup>+</sup>-Gens in den gewünschten Genlocus, Exon 4 und Exon 5 sowie das dazwischen liegende Intron des *otp*-Gens würden dadurch entfernt werden. Damit würden das Startcodon des Enddarm-spezifischen *otp*-Transkripts (*otp*-RC) sowie der größte Teil der Homeobox (codierend für 47 von 61 Aminosäuren) aus dem Gen entfernt werden. Das *white*<sup>+</sup>-Gen kann anschließend wieder mittels einer Cre-Rekombinase entfernt werden.

#### 4.3.1 Mobilisierung des pW25/*otp*I+II Targeting-Konstrukts

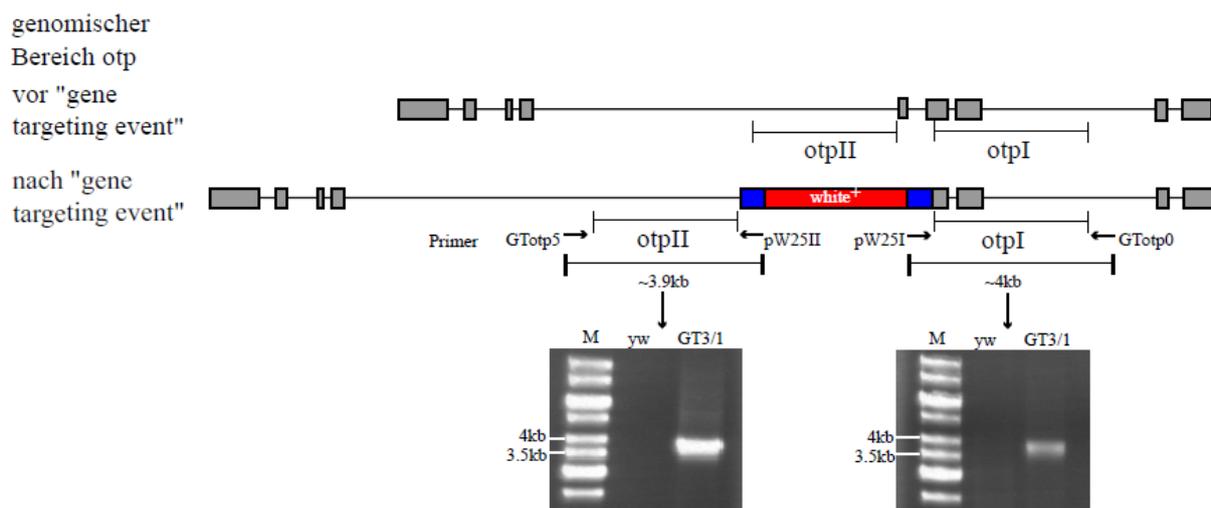
Zuerst erfolgte die Mobilisierung des pW25/*otp*I+II Targeting-Konstruktes (3.2.34). Dazu wurden die beiden unabhängigen Transformanten, die das Donor-Konstrukt auf dem X-Chromosom tragen - pW25/*otp*I+II\_T3 und pW25/*otp*I+II\_T4 - verwendet. Bei Kreuzungen mit dem Donorstamm pW25/*otp*I+II\_T4 konnten unter 106 Einzelkreuzungen in der F<sub>1</sub> bei den Nachkommen von zwei Einzelkreuzungen (Kreuzung 3 und 5) Fliegen mit roten Augen identifiziert werden (Fliegen 3/1, 3/4, 5/8 und 5/20). Durch Balancierung konnte nachgewiesen werden, dass das Donor-Konstrukt bei diesen Fliegen das X-Chromosom verlassen hatte und nun auf dem 2.Chromosom lokalisiert war. Bei Kreuzungen mit dem Donorstamm pW25/*otp*I+II T3 konnten unter den Nachkommen von 27 F<sub>1</sub>-Kreuzungen keine Fliegen mit roten Augen identifiziert werden, hier kam es zu keiner homologen Rekombination. Es wurden in beiden Fällen keine Fliegen identifiziert, bei denen sich das Konstrukt noch auf dem X-Chromosom befand, die Effizienz der Flp-Rekombinase betrug also 100%.

Durch die Balancierung konnte nur bestimmt werden, dass sich das Konstrukt nun auf dem zweiten Chromosom befindet. Ob es tatsächlich zu einer homologen Rekombination im *otp*-Gen und somit zu einer Erzeugung einer *otp*-Mutante kam, sollte molekular nachgewiesen werden.

#### 4.3.2 Verifizierung der *otp*-Mutante mittels PCR

Mittels PCR sollte bestimmt werden, ob es im *otp*-Gen zu einer homologen Rekombination gekommen ist. In Abbildung 4.13 ist das *otp*-Gen vor und nach erfolgter homologer Rekombination mit dem Konstrukt pW25/*otp*I+I dargestellt. Für jeden der homologen Arme wurde eine PCR-Reaktion durchgeführt. Die Primer zum Nachweis einer erfolgten Rekombination wurden dabei so gewählt, dass jeweils einer im Bereich des Vektors pW25

(pW25I bzw. pW25II) lag und der andere im Bereich des *otp*-Gens außerhalb der homologen Arme (GTotp0 bzw. GTotp5). So kommt es nur dann zur Amplifikation von spezifischen PCR-Produkten, wenn eine homologe Rekombination am gewünschten Ort stattgefunden hat. Die genaue Lage der Primer ist in Abbildung 4.13 dargestellt. Es wurde genomische DNA aus Fliegen des Stamm GT3/1 und aus *yw* Fliegen (Negativkontrolle) isoliert (3.2.16) und jeweils eine PCR-Reaktion mit den Primern pW25I + GTotp0 und pW25II + GTotp5 durchgeführt (3.2.17).



**Abb.4.13. Nachweis des Gene Targeting mittels PCR.** Oben ist der genomische Bereich von *otp* vor und nach dem „gene targeting event“ dargestellt. Nach dem „targeting event“ ist der Teil des *otp* Gens zwischen den beiden homologen Armen *otpI* und *otpII* durch das *white*<sup>+</sup>-Gen (rote Box) und angrenzende Sequenzen des Vektors pW25 (blaue Boxen) ersetzt. Zum Nachweis des Austausches wurde für jeden Arm eine PCR-Reaktion mit einem im Vektor pW25 liegenden Primer (pW25I bzw. pW25II) und einem Primer der außerhalb des homologen Arm liegt (GTotp0 bzw. GTotp5) auf genomische DNA aus dem Fliegenstamm GT3/1 und aus *yw* Fliegen (Negativkontrolle) durchgeführt. 5µl der PCR-Produkte wurden auf einem 1% Agarosegel aufgetrennt, mit Ethidiumbromid angefärbt und mit dem INTAS-Geldokumentationssystem detektiert. M: Gene Ruler 1kb Ladder (Fermentas).

Während aus der genomischen DNA von *yw* Fliegen keine PCR-Produkte amplifiziert werden konnten, kam es bei der DNA des Fliegenstamms GT3/1 zur Amplifikation der gewünschten PCR-Produkte. Mit den Primer pW25I und GTotp0 konnte das gewünschte 4kb Produkt amplifiziert werden, mit den Primern pW25II und GTotp5 das gewünschte 3.9kb Produkt (4.13).

Es konnte also molekular nachgewiesen werden, dass es bei dem Fliegenstamm GT3/1 zur homologen Rekombination des Konstrukts pW25/*otpI+II* mit dem gewünschten *otp*-Locus kam. Somit konnten durch „Ends-Out Gene Targeting“ Fliegen erzeugt werden, denen die Exons 4 und 5 sowie das dazwischen liegende Intron des *otp*-Gens und somit das Startcodon des Enddarm-Transkripts sowie der größte Teil der Homeobox fehlen. Der Fliegenstamm wurde von nun an als *otp*<sup>GT3/1</sup> bezeichnet.

### 4.3.3 Komplementationsanalysen des Stamm *otp*<sup>GT3/1</sup>

Da nun molekular nachgewiesen war, dass es sich bei dem Stamm *otp*<sup>GT3/1</sup> um eine *otp*-Mutanten handelt, sollte nun durch Komplementationsanalysen nochmals verifiziert werden, dass es sich bei den Stämmen 1024 und 13064 ebenfalls um *otp*-Allele handelt.

Mit Hilfe von Komplementationsanalysen ist es möglich, unbekannte Mutationen eines Fliegenstamms einem bestimmten chromosomalen Bereich (über Deletionen) oder bestimmten Genen (über Mutationen) zuordnen zu können.

Für Komplementationsanalysen macht man sich Balancerchromosomen zu Nutze, die einen dominanten Marker tragen (beim zweitchromosomalen Balancer CyO). Da Punktmutationen, die zum Funktionsverlust eines essenziellen Gens führen, homozygot letal sind, werden diese über Balancerchromosomen gehalten. Das bedeutet, dass alle Tiere, die für die Kreuzungen eingesetzt wurden, heterozygot für eine Mutation sind und aufgrund des markierten CyO Balancerchromosoms nach oben gebogene Flügel besitzen.

Komplementation findet statt, wenn zwei homozygot letale Mutationen nicht das gleiche Gen betreffen und somit durch die jeweilige Wildtyp-Genkopie ausgeglichen, d.h. komplementiert werden können. Fliegen, die einander komplementierende Mutationen tragen, sind daher lebensfähig und besitzen gerade Flügel. Zwei letale Mutationen, die das gleiche Gen betreffen, komplementieren nicht und Fliegen, die beide Mutationen in trans tragen, sind deshalb nicht lebensfähig. Kreuzt man Fliegen, die einander nicht komplementierende Mutationen tragen, sind nur Nachkommen lebensfähig, die heterozygot für die Mutation sind und aufgrund des markierten CyO Balancerchromosoms nach oben gebogene Flügel besitzen. In Tabelle 4.2 ist das Ergebnis der Komplementationsanalysen des Stamms *otp*<sup>GT3/1</sup> mit den Stämmen *otp*<sup>1024</sup> und *otp*<sup>13064</sup> dargestellt.

**Tab.4.2. Komplementationsanalysen des Stamms *otp*<sup>GT3/1</sup> mit den EMS-Mutantenstämmen *otp*<sup>1024</sup> und *otp*<sup>13064</sup>.** Ausgezählt wurden jeweils die Fliegen mit nach oben gebogenen Flügeln (CyO) und die Fliegen mit geraden Flügeln.

Kreuzung	Anzahl Fliegen F1	Anzahl Fliegen F1 mit gebogenen Flügeln (CyO)	Anzahl Fliegen F1 mit geraden Flügeln	Komplementation
<i>otp</i> <sup>GT3/1</sup> x <i>otp</i> <sup>1024</sup>	45	45	0	Nein
<i>otp</i> <sup>GT3/1</sup> x <i>otp</i> <sup>13064</sup>	55	55	0	Nein

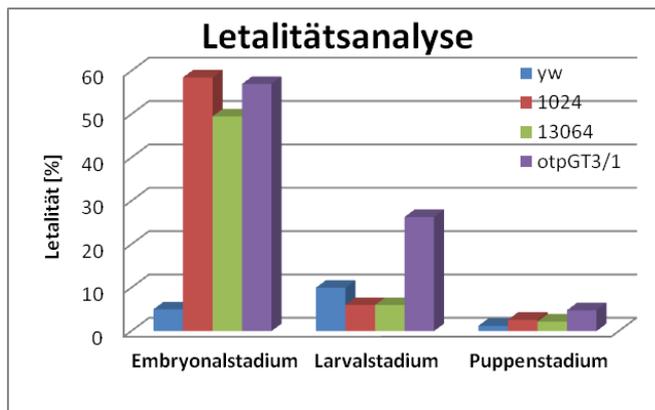
Es konnte in beiden Fällen keine Komplementation nachgewiesen werden, d.h. die Mutationen betreffen das gleiche Gen. Bei allen drei Stämmen handelt es sich also um *otp*-Allele.

#### 4.3.4 Bestimmung der Letalität von *otp*<sup>GT3/1</sup>

Nachdem nun der molekulare Nachweis erbracht war, dass das „Ends-Out Gene Targeting“ erfolgreich durchgeführt wurde, sollte nun der so erzeugte Fliegenstamm näher analysiert werden. Dazu sollten die Fliegen zuerst auf Letalität untersucht werden. Da die Mutanten *otp*<sup>1024</sup> und *otp*<sup>13064</sup> embryonal letal sind (Bach, 2005), sollte untersucht werden, ob dies auch für den Fliegenstamm *otp*<sup>GT3/1</sup> zutrifft. Die Bestimmung des Letalitätszeitpunktes erfolgt dabei durch Auszählen von Embryonen und den sich daraus entwickelnden Larven, Puppen und adulten Fliegen. Das Ergebnis der Letalitätsanalyse ist in Tabelle 4.3 und in Abbildung 4.14 dargestellt. Zum Vergleich sind nochmals die Letalität der Stämme *otp*<sup>1024</sup> und *otp*<sup>13064</sup> bestimmt, der Stamm *yw* der keinerlei Letalitätsfaktoren trägt diente als Negativkontrolle. Bei den Letalitätsraten der Stämme *otp*<sup>1024</sup>, *otp*<sup>13064</sup> und *otp*<sup>GT3/1</sup> muss dabei beachtet werden, dass die Stämme heterozygot über Balancer gehalten werden. Das bedeutet, dass nur 25% der Tiere homozygot für die Mutation sind, weitere 25% sind homozygot für das Balancerchromosom und die restlichen 50% sind heterozygot für die Mutation. Da Balancerchromosomen homozygot letal sind ergibt sich somit schon eine Letalitätsrate von mindestens 25%.

**Tab.4.3. Letalitätsanalyse der Stämme *yw*, *otp*<sup>1024</sup>, *otp*<sup>13064</sup> und *otp*<sup>GT3/1</sup>.** Es wurden jeweils 200 Embryonen der Stämme *otp*<sup>1024</sup>, *otp*<sup>13064</sup> und *otp*<sup>GT3/1</sup> ausgezählt und die Anzahl der sich daraus entwickelnden Larven, Puppen und adulten Fliegen bestimmt. Als Negativkontrolle diente der *yw*-Stamm, der keine letale Mutation besitzt.

Stamm	<i>yw</i>	<i>otp</i> <sup>1024</sup>	<i>otp</i> <sup>13064</sup>	<i>otp</i> <sup>GT3/1</sup>
Anzahl Embryonen	200	200	200	200
Anzahl Larven	190	83	101	86
Anteil Larven	95%	41,5%	50,5%	43%
Embryonale Letalität	5%	58,5%	49,5%	57%
Anzahl Puppen	171	78	95	63
Anteil Puppen	85,5%	39%	47,5%	31,5%
Larvale Letalität	10%	6%	6%	26,7%
Anzahl Fliegen	169	76	93	60
Anteil Fliegen	84,5%	38%	46,5%	30%
Pupale Letalität	1,2%	2,6%	2,2%	4,8%



**Abb.4.14. Graphische Darstellung der Letalität der Stämme *otp*<sup>1024</sup>, *otp*<sup>13064</sup> und *otp*<sup>GT3/1</sup> im Vergleich zum *yw*-Stamm.** Dargestellt ist die Letalität [%] in den verschiedenen Entwicklungsstadien (Embryonal-, Larval- und Puppenstadium) der Stämme *yw* (blauer Balken), *otp*<sup>1024</sup> (roter Balken), *otp*<sup>13064</sup> (grüner Balken) und *otp*<sup>GT3/1</sup> (lilafarbener Balken).

Wie die Stämme *otp*<sup>1024</sup> und *otp*<sup>13064</sup> zeigt auch der Stamm *otp*<sup>GT3/1</sup> eine embryonale Letalität, 57% der Embryonen sterben. Neben der embryonalen Letalität ist eine im Vergleich zum Stamm *yw* und den anderen *otp*-Mutanten stark erhöhte larvale und leicht erhöhte pupale Letalität festzustellen. Da die homozygoten Tiere bereits im Embryonalstadium absterben, deutet dies darauf hin, dass auch heterozygote Tiere dieses Stammes erhöhte Letalitätsraten zeigen.

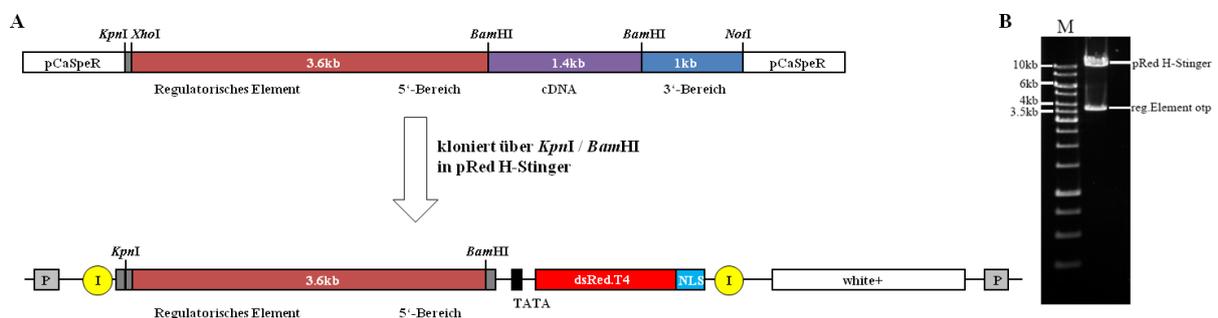
Der embryonale Enddarmphänotyp des Stamms *otp*<sup>GT3/1</sup> entspricht dem Phänotyp der beiden bereits charakterisierten *otp*-Allelen *otp*<sup>1024</sup> und *otp*<sup>13064</sup> (nicht gezeigt).

#### 4.4 *In vivo* Analyse der Enddarmentwicklung bei *Drosophila*

Fluoreszenzproteine ermöglichen eine Analyse von Prozessen im lebenden Organismus. Um die Enddarmentwicklung bei *Drosophila in vivo* zu analysieren, sollten transgene Fliegen erzeugt werden, die ein Fluoreszenzprotein unter Kontrolle des bereits bekannten regulatorische Elements von *otp* für die Expression in Enddarm exprimieren. Dieses 1.8kb große regulatorische Element liegt 950bp vor dem Transkriptionsstart des Enddarmspezifischen *otp*-Transkript und ist ausreichend um eine Reporterexpression im vollständigen Enddarmmuster von *otp* zu erreichen (Kusch et al., 2002). Das rotfluoreszierende Protein dsRed wurde ursprünglich aus der Koralle *Discosoma* isoliert (Matz et al., 1999). Die wildtypische dsRed-Variante hat jedoch mehrere Nachteile, die sie für *in vivo* Analysen ungeeignet machen, darunter eine sehr lange Reifungszeit des Chromatophors (über 24h) und eine schlechte Löslichkeit. Durch ungerichtete und gerichtete Mutagenese konnte die dsRed-Variante dsRed.T4 erzeugt werden (Bevis und Glick, 2002). Die dsRed.T4 Variante hat eine drastisch verkürzte Reifungszeit des Chromatophors (unter 43min), keine Emission im GFP-Bereich und eine verbesserte Löslichkeit. Es konnten auch P-Element Transformationsvektoren für Reporteranalysen und *in vivo* Analysen mit dieser

verbesserten dsRed Form erzeugt werden (Barolo et al., 2004). Die Vektoren besitzen alle Bestandteile der Pelican / Stinger Vektoren, darunter „insulator“ Sequenzen um Positionseffekte zu reduzieren und einen großen Polylinker. Außerdem stehen sie sowohl mit zytoplasmatischer als auch mit nukleärer Lokalisierung des Fluoreszenzproteins zur Verfügung.

Das regulatorische Element von *otp* für die Expression im Enddarm sollte in den Vektor pRed H-Stinger kloniert werden. Dieser besitzt die dsRed.T4 Variante mit einem angehängten Kernlokalisierungssignal (NLS) und ermöglicht somit eine nukleäre Lokalisation des Fluoreszenzproteins. Als Ausgangskonstrukt diente das oben beschriebene *otp*-Rescue-Konstrukt (4.2.3), in dem sich der 5'-Bereich von *otp* inklusive des Enddarm-spezifischen regulatorischen Elements, die *otp*-cDNA sowie der 3' flankierende Bereich von *otp* in dem Vektor pCaSpeR befinden. Daraus wurde ein 3.6kb großes Fragment, welches den 5'-Bereich von *otp* inklusive des 1.8kb großen Enddarm-spezifischen regulatorischen Elements des *otp*-Gens enthält, über *KpnI* und *BamHI* gerichtet in den Vektor pRed H-Stinger kloniert. In Abbildung 4.15 sind schematisch das Ausgangs- und das pRed H-Stinger\_otp-Konstrukt sowie ein *BamHI* / *KpnI* Doppelverdau des pRed H-Stinger\_otp-Konstrukts dargestellt.

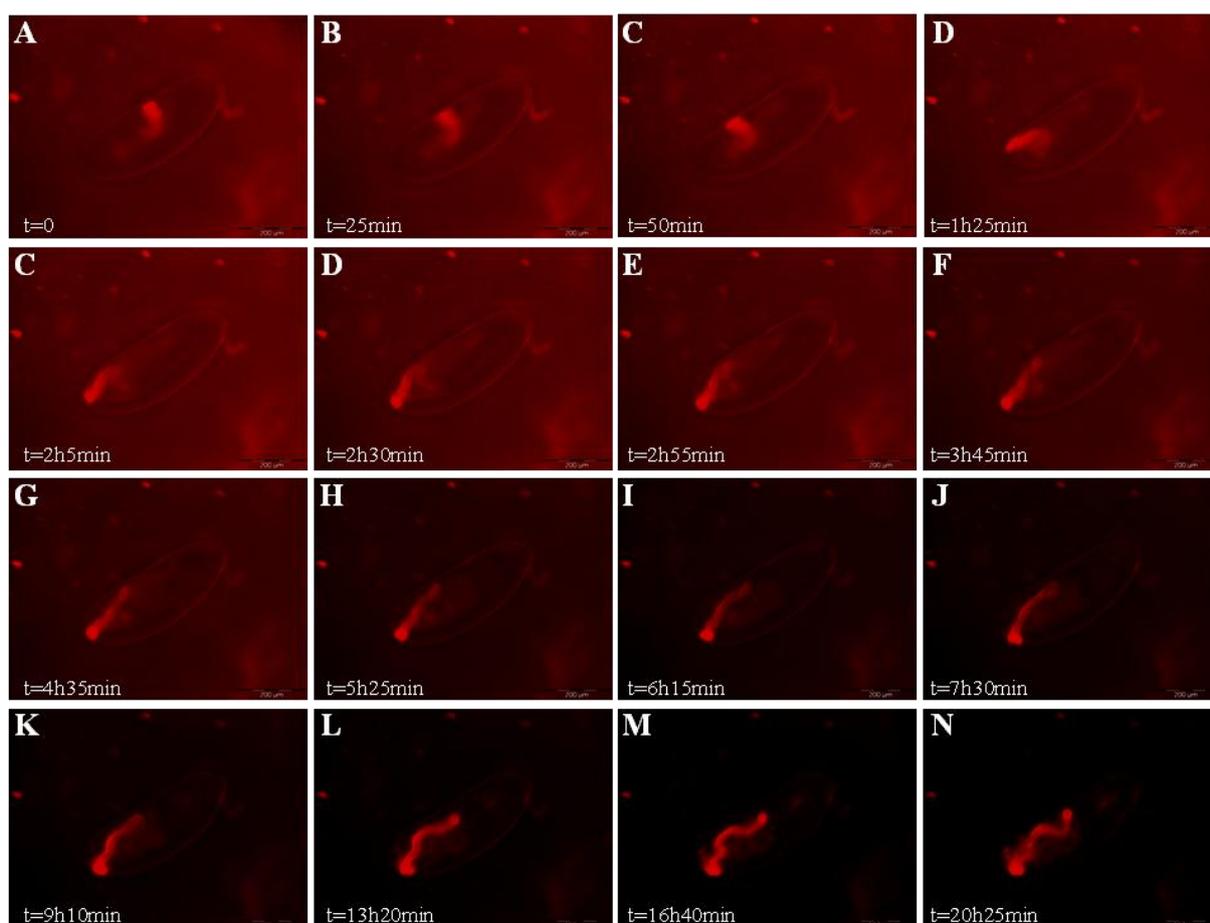


**Abb.4.15. Schematische Darstellung der Klonierungsstrategie sowie gelelektrophoretische Auftrennung des verdauten pRed H-Stinger\_otp-Konstrukts.** (A) Oben ist schematisch das pCaSpeR-Ausgangskonstrukt dargestellt, aus dem ein 3.6kb Fragment ausgeschnitten wurde. Unten ist das pRed H-Stinger\_otp Konstrukt schematisch dargestellt. (B) 1µg der DNA des Konstruktes pRed H-Stinger\_otp wurden mit *KpnI* und *BamHI* verdaut, auf einem 1% Agarosegel aufgetrennt, mit Ethidiumbromid gefärbt und mittels INTAS-Geldokumentationssystem detektiert. M: GeneRuler 1kb Ladder (Fermentas). Abk.: I: „insulator“-Sequenz; NLS: „Nuclear Localization Signal“; P: P-Element-Sequenz.

Bei der gelelektrophoretischen Auftrennung des Doppelverdau ist sowohl die über 10kb große Vektorbande (pRed H-Stinger) als auch die 3.6kb Insert-Bande (reg. Element *otp*) zu sehen.

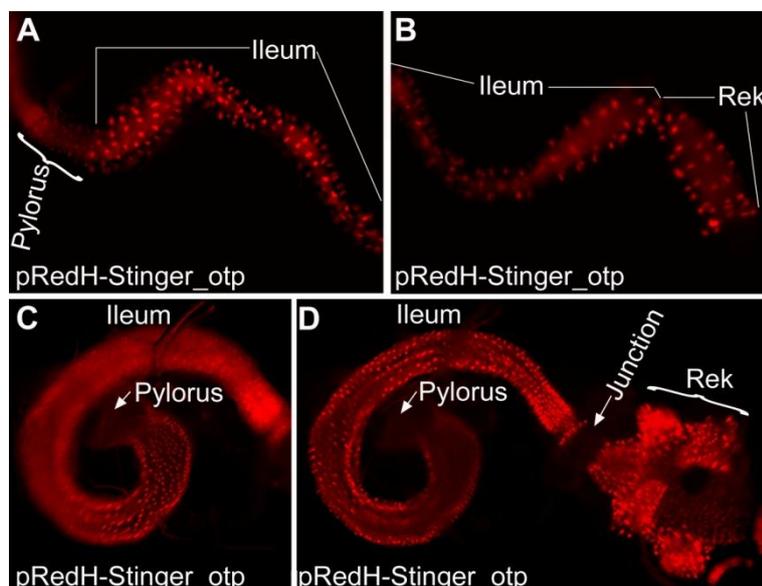
Durch P-Element-basierte Keimbahntransformation wurde von D. Dewald ein transgener Fliegenstamm erzeugt, der das Konstrukt pRed H-Stinger\_otp stabil in der Keimbahn trägt.

Mit diesen Fliegen konnten dann *in vivo* Analysen der Enddarmentwicklung durchgeführt werden. Dazu wurden Embryonen dechorioniert, auf einem Objektträger mit doppelseitigen Klebeband aufgereiht und mit Voltalet<sup>®</sup> 10S-Öl überschichtet. Diese konnten dann unter dem Fluoreszenzmikroskop beobachtet werden. Die erste Expression von dsRed kann in Stadium 10 der Embryonalentwicklung im Enddarmprimordium nachgewiesen werden und damit nur kurz nach der ersten Expression von *otp* in Stadium 8. Die erste Aufnahme wurde zum Zeitpunkt  $t=0$ , dem Zeitpunkt der ersten dsRed-Expression gemacht. Danach wurde in Abständen von 5min eine Aufnahme gemacht, insgesamt 150 Aufnahmen über einen Zeitraum von 12.5 Stunden. In Abbildung 4.16 sind Aufnahmen eines Embryos zu ausgewählten Zeitpunkten der Embryonalentwicklung dargestellt. Diese Bilder können auch zu einem Film animiert werden, welcher die Enddarmentwicklung während der gesamten Embryonalentwicklung zeigt.



**Abb.4.16. *In vivo* Analyse der embryonalen Enddarmentwicklung von *Drosophila*.** Dargestellt sind fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von pRed H-Stinger\_otp Embryonen zu verschiedenen Zeitpunkten der Embryonalentwicklung. Diese exprimieren das Fluoreszenzprotein dsRed.T4 unter Kontrolle des regulatorischen Elementes für die *otp*-Expression im Enddarm. Der Zeitpunkt  $t=0$  beschreibt den Zeitpunkt der ersten dsRed-Expression, die weiteren Zeitangaben beziehen sich auf diesen Zeitpunkt.

Nun sollte untersucht werden, ob das regulatorische Element auch im larvalen oder adulten Enddarm aktiv ist. Dazu wurde der Enddarm aus Larven und Fliegen des Stamms pRed H-Stinger\_otp präpariert und auf eine dsRed-Expression untersucht. Der larvale und adulte Enddarm von *Drosophila* ist, wie der embryonale Enddarm, entlang der anterior-posterioren Achse dreigeteilt. Der am weitesten anterior gelegene Teil, der mit dem Mitteldarm verbunden ist, wird als Pylorus bezeichnet, der zentrale und längste Teil als Ileum und der posteriore Teil wie im Embryo als Rektum. Bei adulten Enddarm befindet sich zwischen dem Ileum und dem Rektum zusätzlich die sogenannte Rektumverbindung (Junction).



**Abb.4.17. Aktivität des pRed H-Stinger\_otp-Konstruktes im larvalen und adulten Enddarm.** Dargestellt sind fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen eines larvalen (A-B) und eines adulten Enddarms (C-D) des Stamms pRed H-Stinger\_otp. Abk.: Rek: Rektum.

Es konnte eine starke dsRed-Expression im Ileum und Rektum des larvalen Enddarms nachgewiesen werden (Abb.4.17.A-B). Auch im adulten Enddarm des Stamms pRed H-Stinger\_otp konnte im Ileum und Rektum dsRed nachgewiesen werden (Abb.4.17.C-D).

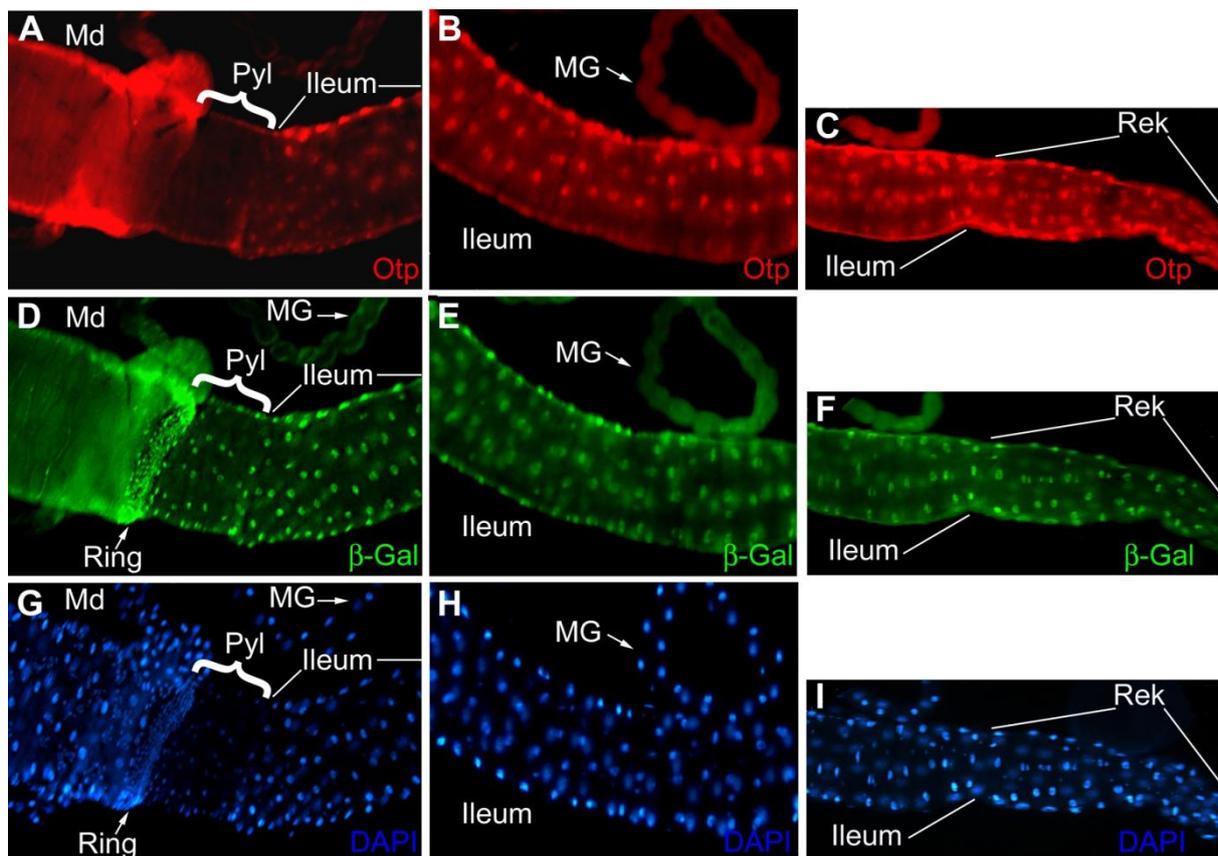
Es konnte also nachgewiesen werden, dass die Aktivität des regulatorischen Elementes für die *otp*-Expression im Enddarm nicht auf die Embryonalentwicklung beschränkt ist, sondern während der gesamten Entwicklung aktiv ist.

#### 4.5 Expression von Otp im larvalen Enddarm

Da das regulatorische Element für die *otp*-Expression im Enddarm wie oben gezeigt auch in der Larve aktiv ist, ist zu vermuten, dass auch das Otp-Protein im larvalen Enddarm nachgewiesen werden kann. Im anterioren Bereich des larvalen Pylorus liegt eine besonders dichte Zellzone, der sogenannte larvale Ring (Robertson, 1996). Aus diesem larvalen Ring entstehen während der Metamorphose der Pylorus, das Ileum und die Rektumverbindung des adulten Enddarms, das adulte Rektum entsteht aus der Genitalscheibe (Robertson 1936; Fox

und Spradling, 2009). Das larvale Ileum degeneriert dagegen während der Metamorphose vollständig (Robertson, 1996). Außer in den 2-3 am weitesten anterior gelegen Zellreihen des larvalen Rings, die *byn* nur schwach oder gar nicht exprimieren, wird *byn* im kompletten larvalen Enddarm exprimiert (Lengyel und Iwaki 2002; Takashima et al., 2008; Fox und Spradling, 2009).

Im Folgenden sollte nun untersucht werden, in welchen Bereichen des larvalen Enddarms *Otp* exprimiert wird. Außerdem sollte überprüft werden, ob auch hier wie im embryonalen Enddarm eine Co-Lokalisation mit *Byn* nachgewiesen werden kann. Dazu wurde der Enddarm aus Larven des dritten Larvalstadium der Enhancer-Trap-Linie *byn<sup>apro</sup>*, welche das *lacZ*-Gen im *Byn*-Muster exprimiert (Murakami et al., 1995), freipräpariert und Doppelfärbungen mit anti-*Otp*- und anti- $\beta$ -Galaktosidase-Antikörpern durchgeführt (3.2.25). Diese wurden zusätzlich mit DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol) gefärbt (3.2.26). DAPI ist eine DNA-interkalierende Substanz, die zur Färbung von Zellkernen verwendet wird und durch Anregung im UV-Bereich Cyanblau fluoresziert.



**Abb.4.18. *Otp*-Expression im larvalen Enddarm.** Dargestellt sind fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Antikörperfärbungen mit anti-*Otp*- und anti- $\beta$ -Gal-Antikörpern sowie Kernfärbungen mit DAPI am Enddarm von *byn<sup>apro</sup>*-Larven des dritten Larvalstadiums. (A-C) Anti-*Otp*-Antikörperfärbung des larvalen Enddarms. (D-F) Anti- $\beta$ -Gal-Antikörperfärbung des larvalen Enddarms. (G-I) DAPI-Färbung des larvalen Enddarms. Abk.: Md: Mitteldarm; MG: Malpighische Gefäße; Pyl: Pylorus; Rek: Rektum.

In Abbildung 4.18 sind die Antikörperfärbung des larvalen Enddarms mit anti-Otp- und anti- $\beta$ -Gal-Antikörpern sowie die Kernfärbungen mit DAPI dargestellt. Im Pylorus kann keine Otp-Expression nachgewiesen werden (Abb.4.18.A), dagegen wird Otp in allen Kernen des Ileums und des Rektums exprimiert (Abb.4.18.A-C). Das Rektum kann dabei durch lichtmikroskopische Aufnahmen im Hellfeld morphologisch vom Ileum unterschieden werden.  $\beta$ -Gal, das bei der Linie *byn<sup>apro</sup>* das Muster der *byn* Expression wiedergibt, wird zusätzlich zur Expression in den Kernen des Ileums (Abb.4.18.D-F) und des Rektums (Abb.4.18.G) auch in den Kernen des Pylorus exprimiert (Abb.4.18.D).

Durch die Kernfärbungen mit DAPI können alle Zellkerne des dargestellten Bereichs sichtbar gemacht werden. So wurden alle Zellkerne des Mitteldarms (Abb.4.18.G), des Pylorus (Abb.4.18.G), des Ileums (Abb.4.18.G-I), des Rektums (Abb.4.18.I) und der Malpighischen Gefäße (Abb.4.18.G, H) angefärbt. Dadurch können besonders gut Bereiche mit hoher Zelldichte von solchen mit niedriger Zelldichte unterschieden werden. Während der larvale Ring des Pylorus eine extrem hohe Zelldichte mit kleinen Zellkernen aufweist, ist die Zelldichte im restlichen Pylorus gering (Abb.4.18.G). Die Zellkerne des Ileums und des Rektums sind im Vergleich zum Pylorus größer, sie weisen eine mittlere Dichte auf, die in allen Bereichen konstant bleibt (Abb.4.18.G-I). Vergleicht man das Muster der DAPI-Färbung nun mit dem Muster der anti-Otp- oder der anti- $\beta$ -Gal-Antikörperfärbung, so wird deutlich, dass Otp in allen Kernen des Ileums und des Rektums bzw.  $\beta$ -Gal in allen Kernen Pylorus, des Ileums und des Rektums exprimiert werden.

Es konnte also nachgewiesen werden, dass Otp in allen Zellkernen des larvalen Ileums und des Rektums exprimiert wird und dort eine Co-Lokalisation mit Byn zeigt. Im am weitesten anterior gelegenen Teil des larvalen Enddarms, dem Pylorus, konnte dagegen keine Otp-Expression nachgewiesen werden.

#### 4.6 Screen zur Identifizierung von Enddarmmutanten

Zur Identifizierung von Regulatoren von *otp* und zur Identifizierung von Genen, die an der Enddarmentwicklung beteiligt sind, wurden mit Hilfe eines Screens 238 überlappende Defizienzen des gesamten *Drosophila* Genoms auf eine veränderte *otp*-Expression und auf einen Enddarmphänotyp untersucht. Ein Verlust der *otp*-Expression in einer Defizienz würde dabei auf einen Regulator von *otp* hinweisen. Phänotypen wie z.B. ein verkürzter Enddarm oder veränderte Analplatten, bei denen jedoch noch *otp* im Enddarm exprimiert wird, würden darauf hinweisen, dass in der Defizienz andere an der Darmentwicklung beteiligte Gene liegen. Bei den Defizienzenstämmen handelt es um Fliegen des sogenannten „Bloomington

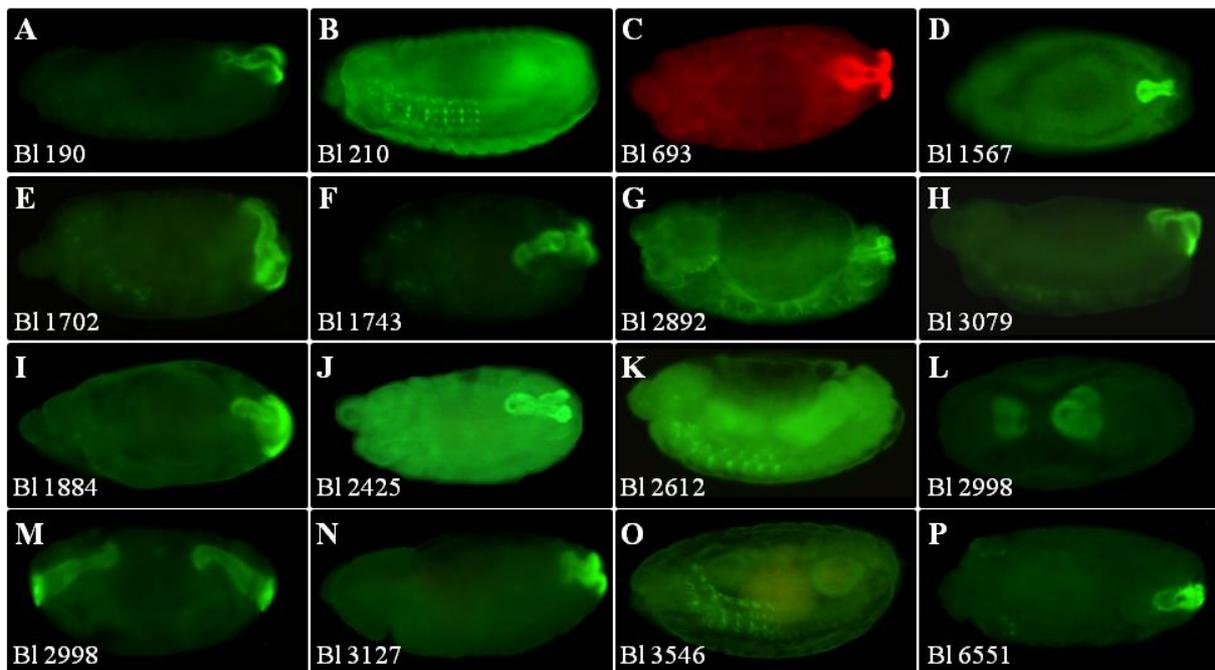
Deficiency Kits“ (Bloomington Stock Center), 36 Defizienzen liegen dabei auf dem X-Chromosom, 99 auf dem 2.Chromosom, 100 auf dem 3.Chromosom und drei auf dem 4.Chromosom. Es werden dadurch etwa 95% des Genoms abgedeckt.

Zur Durchführung des Screens wurden Embryonen dieser 238 Fliegenstämme fixiert (Auflistung aller Stämme siehe Anhang) und mit anti-Crumbs- und anti-Otp-Antikörpern gefärbt (3.2.21). *Crumbs* wurde dabei wie bereits erwähnt als unabhängiger Enddarmmarker eingesetzt. In Tabelle 4.4 sind alle Defizienzen mit Enddarmphänotyp aufgelistet.

**Tab.4.4. Enddarmphänotypen.** Aufgelistet sind alle X-chromosomalen, zweitchromosomalen und dritschromosomalen Fliegenstämme des „Bloomington Deficiency Kits“, die einen Enddarmphänotyp zeigen, sowie die deletierte Region, der genaue Enddarmphänotyp und ein möglicher Verlust der Otp-Expression.

Fliegenstamm	Deletierte Region	Enddarm-Phänotyp	Verlust der Otp-Expression	Betroffenes Gen
<b>X-Chromosom</b>				
<b>Bl 970</b>	17A1;18A2	Enddarm verkürzt	Nein	<i>upd</i>
<b>Bl 971</b>	18A5;18D	Enddarm verkürzt	Nein	
<b>2.Chromosom</b>				
<b>Bl 190</b>	47D3;48B2	Enddarm verkürzt + breiter	Nein	
<b>Bl 201</b>	44D1-4;44F12	Enddarm verkürzt + breiter	Ab Stadium 11 im Enddarm	<i>lin</i>
<b>Bl 693</b>	24C2-8;25C8-9	Enddarm verkürzt + breiter	Nein	<i>bowl</i>
<b>Bl 1567</b>	23C1-2;23E1-2	Enddarm stark verkürzt, keine Analplatten	Nein	
<b>Bl 1702</b>	46C;47A	Enddarm deformiert	Nein	
<b>Bl 1743</b>	46A;46C	Rektum breiter	Nein	
<b>Bl 2892</b>	29C1-2;30C8-9	Enddarm stark verkürzt	Nein	<i>raw</i>
<b>Bl 3079</b>	32F1-3;33F1-2	Enddarm stark verkürzt + deformiert	Nein	
<b>Bl 4956</b>	27E2;28D1	Keine Aussage möglich → in frühen Stadien letal	Keine Aussage möglich	<i>wg</i>
<b>3.Chromosom</b>				
<b>Bl 1884</b>	84A1-2;84B1-2	Enddarm stark verkürzt, Analplatten deformiert	Nein	
<b>Bl 2425</b>	93B;95	Enddarm verkürzt	Nein	<i>bap</i>
<b>Bl 2611</b>	68A2-3;69A1-3	Enddarm stark verkürzt, Analplatten reduziert	Im Enddarm-primordium + Enddarm	<i>byn</i>
<b>Bl 2612</b>	68C8-11;69B4-5	Enddarm stark verkürzt, Analplatten reduziert	Im Enddarm-primordium + Enddarm	<i>byn</i>
<b>Bl 2998</b>	73A3;74F	Verdoppelung Enddarmprimordium + Enddarm	Nein	
<b>Bl 3127</b>	77B-C; 77F-78A	Enddarm stark verkürzt, breiter	Nein	
<b>Bl 3546</b>	99D3;3Rt	Enddarm fehlt fast komplett	Im Enddarm-primordium + Enddarm	<i>ill</i>
<b>Bl 6551</b>	71C2-3; 72B1-C1	Enddarm verkürzt, Analplatten reduziert	Nein	

Von den untersuchten 238 Defizienzen konnte bei 19 ein Enddarmphänotyp nachgewiesen werden. Davon liegen neun Defizienzen auf dem 2.Chromosom, acht auf dem 3.Chromosom (darunter zwei überlappende Defizienzen) und nur zwei auf dem X-Chromosom. In Abbildung 4.19 sind Antikörperfärbungen mit anti-Otp-Antikörpern an homozygoten Embryonen der betreffenden Defizienzen dargestellt.



**Abb.4.19. Enddarmphänotypen.** Dargestellt sind fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von anti-Otp-Antikörperfärbungen an homozygoten Embryonen verschiedener Defizienzstämmen des „Bloomington Deficiency Kits“. Bei A-B, E, G-K, M-P handelt sich um Seitenansichten, anterior ist links, dorsal oben; bei C-D, F, L um dorsale Aufsichten, anterior ist links.

Bei 15 der 19 Defizienzen mit Enddarmphänotyp konnte ein verkürzter bis stark verkürzter Enddarm festgestellt werden (siehe auch Abb.4.19.A-D; G-K; N-P), fünf davon zeigen zusätzlich verkleinerte oder veränderte Analplatten (Abb.4.19. D, I, P). Bei keiner der Defizienzen konnte dagegen ein Phänotyp der Analplatten ohne zusätzliche Veränderung des Enddarms festgestellt werden. Diese deutet darauf hin, dass es keine Gene gibt, die ausschließlich für die Entwicklung der Analplatten essenziell sind. Auch konnte bei keiner Defizienz ein kompletter Verlust der embryonalen Otp-Expression nachgewiesen werden. Vier Defizienzen (darunter zwei überlappende) zeigten neben einem stark verkürzten Enddarm jedoch einen Verlust der Otp-Expression im Enddarm (Abb.4.19. B, K, O).

Um nachzuweisen, welches Gen oder welche Gene den Enddarmphänotyp der jeweiligen Defizienz verursachen, wurde zuerst recherchiert, ob in den Defizienzen bekannte Gene liegen, die an der Enddarmentwicklung beteiligt sind. Alle bisher identifizierten, an der

Endarmentwicklung beteiligten Gene wurden von Lengyel und Iwaki in einem Review (2002) zusammengefasst. So konnte in neun der Defizienzen ein an der Enddarmentwicklung beteiligtes Gen identifiziert werden (siehe auch Tab.4.4). Zur Verifizierung, ob der Phänotyp der Defizienzen durch den Verlust dieser Gene hervorgerufen wird, wurden die jeweiligen Einzelmutanten mit anti-Otp-Antikörpern gefärbt.

In der Defizienz Bl 693 liegt das Gen *bowl* (*brother of odd with entrails limited*). *Bowl* codiert für einen Zink-Finger-Transkriptionsfaktor und ist an der Bildung des „small intestine“ beteiligt. *Bowl*<sup>1</sup>-Mutanten zeigen, genau wie Embryonen der Defizienz Bl 693 (Abb.4.19.C) einen verkürzten und breiteren Enddarm, das „small intestine“ ist stark reduziert oder fehlt komplett (Iwaki et al., 2001).

In der Defizienz Bl 2892 liegt das Gen *raw*. *Raw*<sup>1</sup>-Mutanten zeigen wie Embryonen der Defizienz Bl 2982 (Abb.4.19.G) neben nicht elongierten Malpighischen Gefäßen einen stark verkürzten Enddarm mit stark reduziertem bzw. fehlendem „large intestine“ (Liu et al., 1999). In der Defizienz Bl 2425 liegt das Homeoboxgen *bagpipe* (*bap*), das im viszeralem Mesoderm des Enddarms exprimiert wird (San Martin und Bate, 2001). *Bap*-Mutanten zeigen wie Embryonen der Defizienz Bl 2425 (Abb.4.19. J) einen verkürzten Enddarm (Lengyel und Iwaki, 2002).

In der Defizienz Bl 970 liegt das Gen *unpaired* (*upd*). *Upd* codiert für einen Liganden des JAK/STAT Signalweges und wird spezifisch im „small intestine“ exprimiert (Johansen et al., 2003). In *upd*<sup>os1A</sup>-Mutanten ist der Enddarm wie in Embryonen der Defizienz Bl 970 insgesamt verkürzt, ohne dass ein spezifischer Teil des Enddarms fehlt (Johansen et al., 2003).

Auch die vier Defizienzen, die einen Verlust der Otp-Expression im Enddarm zeigen, konnten einem Einzelgen zugeordnet werden. Die beiden überlappenden Defizienzen Bl 2611 und Bl 2612 beinhalten das Gen T-Box-Gen *brachyenteron* (*byn*), von dem bereits bekannt war, dass es an der Regulation der *otp*-Expression im Enddarm beteiligt ist (Singer et al., 1996; Kusch et al, 2002). In *byn*<sup>5</sup>-Mutanten kann neben einem stark verkürzten Enddarm keine Expression von *otp* im Enddarmprimordium und im Enddarm nachgewiesen werden, die Expression von *otp* im Nervensystem ist dagegen unverändert (Singer et al., 1996).

Eine weitere Defizienz (Bl 3546) mit Verlust der Otp-Expression im Enddarm enthält das Gen *tailless* (*tll*). *Tll* codiert für einen nukleären Rezeptor mit Repressorfunktion (Moran und Jimenez, 2006). *Tll*<sup>149</sup>-Mutanten zeigen neben einem fast komplett fehlenden Enddarm (Diaz et al., 1996) einen Verlust der *byn*-Expression (Kispert et al., 1994). Da *byn* wie bereits

erwähnt für die Aktivierung von *otp* im Enddarm nötig ist, erklärt sich auch der Verlust der *otp*-Expression im Enddarm von *tll*<sup>149</sup>-Mutanten und Embryonen der Defizienz BI 3546 (Abb.4.19.O).

In der Defizienz BI 210 konnte mit *lines* (*lin*) ein neuer Regulator von *otp* identifiziert werden. In *lin*<sup>2</sup>-Mutanten beginnt die *otp*-Expression normal (nicht gezeigt), nach Stadium 10 kann jedoch keine Expression von *otp* mehr im Enddarm nachgewiesen werden (Abb.4.19.B). Die *otp*-Expression im Nervensystem ist wie auch in *byn*- und *tll*-Mutanten wildtypisch. *Lin* codiert für ein Protein ohne bisher bekannte Domänen, das global im Embryo exprimiert wird und das als transkriptioneller Regulator zu wirken scheint (Hatini et al., 2000). In *lin*<sup>2</sup>-Mutanten ist der Enddarm verkürzt und breiter, das „small intestine“ ist ausgedehnt und das „large intestine“ fehlt (Iwaki et al., 2001).

Nachdem nun bei neun der Defizienzen der Phänotyp einem Einzelgen zugeordnet werden konnte, sollte dies auch bei den verbleibenden 10 Defizienzen versucht werden. Die in den Defizienzstämmen deletierten Regionen sind in der Regel sehr groß und umfassen mehrere hundert kb, d.h. in jedem Defizienzstamm sind mindestens 50 Gene deletiert. Zur näheren Eingrenzung der Bereiche, in denen sich Kandidatengene befinden, wurden nun Antikörperfärbungen an Embryonen von weiteren Defizienzstämmen des Bloomington Stock Centers durchgeführt (Liste siehe Anhang), bei denen kleinere genomische Regionen deletiert sind. Nach Möglichkeit wurden für diese Einschränkungen „Exelixis“-Defizienzstämme mit exakt definierten Bruchpunkten ausgewählt (Parks et al., 2004). Die neuen Defizienzstämme wurden so gewählt, dass sie den deletierten Bereich des ursprünglichen Defizienzstamms nach Möglichkeit überlappend abdecken. Dies ist in Abbildung 4.20 am Beispiel der Ausgangsdefizienz BI 2998 dargestellt, bei der ein Bereich von 1200kb mit 157 Genen deletiert ist.



**Abb.4.20. Einschränkung der Defizienz BI 2998.** Dargestellt ist der genomische Bereich der Ausgangsdefizienz BI 2998 sowie die Lage der zur Einschränkung verwendeten Defizienzen.

Bei drei Defizienzen konnten keine weiteren Einschränkungen durchgeführt werden, da keine geeigneten Defizienzen in im jeweiligen Bereich zur Verfügung standen. In Tabelle 4.5 sind die Ausgangsdefizienzen und die zur Einschränkung verwendeten Defizienzen aufgelistet.

**Tab.4.5. Einschränkungen.** Aufgelistet sind jeweils die Ausgangsdefizienz, die zur Einschränkung verwendeten Defizienzen, der Phänotyp (im Vergleich zum Ausgangsphänotyp) sowie die Anzahl der Gene in den eingeschränkten Bereichen mit Phänotyp.

Ausgangsdefizienz	Zur Einschränkung verwendete Defizienz	Deletierte Region	Phänotyp	Anzahl Gene im eingeschränkten Bereich
<b>Bl 190</b>	Bl 7541	47C5;47D6	Kein Phänotyp	
	Bl 7542	47D7;47F8	= Ausgangsphänotyp	77
<b>Bl 1567</b>	Bl 7784	23C4;23D1	Enddarm leicht verkürzt; AP reduziert << Ausgangsphänotyp	30
	Bl 7785	23C5;23E3	Kein Phänotyp	
<b>Bl 1702</b>	Bl 1719	46C;46E1,2	Enddarm verkürzt + deformiert, AP deformiert	38
<b>Bl 1743</b>	Bl 9296	46A1;46B4	Kein Phänotyp	
	Bl 9411	46B4;46C1	Kein Phänotyp	
<b>Bl 3079</b>	Bl 7513	33A2;33B3	Kein Phänotyp	
	Bl 7514	33B3;33C2	Kein Phänotyp	
	Bl 7515	33C2; 33D4	Kein Phänotyp	
	Bl 7516	33E4;33F2	Kein Phänotyp	
<b>Bl 2998</b>	Bl 8078	72D4;73C4	Kein Keimstreifrückzug	155
	Bl 8079	73A1;73D5	Kein Keimstreifrückzug	65
	Bl 7937	73D1;73D5	Kein Phänotyp	
	Bl 7938	73D5;73E4	Kein Phänotyp	
	Bl 7610	74A1;74A1	Kein Phänotyp	
	Bl 7611	74B2;74D2	Kein Phänotyp	
	Bl 8100	74D1;75B11	Kein Phänotyp	
<b>Bl 6551</b>	Bl 6550	71C1-2;71D2-E1	Kein Phänotyp	
	Bl 6555	71C3-E5;71C3-E5	Kein Phänotyp	
	Bl 3640	71F1-4;72D1-10	Kein Phänotyp	
	Bl 6603	71F1;72A2	Kein Phänotyp	
<b>Bl 3546</b>	Bl 7919	100B2;100B5-8	Enddarm verkürzt	27

Wie aus Tabelle 4.5 ersichtlich konnte nicht in allen Fällen bei den Einschränkungen ein ähnlich starker Phänotyp nachgewiesen werden wie im Ausgangsstamm. Dies war nur bei den Defizienzen Bl 190 und Bl 1702 möglich, allerdings liegen in den Einschränkungen immer noch 38 bzw. 77 Gene und es konnte keine Zuordnung zu einem Einzelgen erfolgen. Bei der Defizienz Bl 1567 konnte in den Einschränkungen dagegen nur ein schwächerer Phänotyp nachgewiesen werden, dies deutete darauf hin, dass einige der Phänotypen der Ausgangsdefizienzen durch den Verlust mehrere Gene verursacht wurden. So konnte bei der Defizienz Bl 1743 bei keiner der Einschränkungen ein Phänotyp nachgewiesen werden, obwohl der gesamte Bereich der Ausgangsdefizienz abgedeckt ist. Auch bei den Einschränkungen von Bl 3079 konnte kein Phänotyp identifiziert werden. Bei der Defizienz Bl 2892, die eine Verdopplung des Enddarmprimordiums und eine Verdopplung des Enddarms zeigt (Abb.4.19.L-M), konnte bei keiner der Einschränkungen dieser Phänotyp nachgewiesen werden, bei zwei der Einschränkungen (überlappend) konnte jedoch ein Defekt beim Keimstreifrückzug gezeigt werden. Allerdings konnte die Ausgangsdefizienz auch nicht komplett durch die Einschränkungen abgedeckt werden (siehe Abb.4.20). In der

Ausgangsdefizienz Bl 3546 konnte durch die Einschränkung Bl 7919 neben dem bereits identifizierten Gen *tll* noch ein weitere Bereich mit einem Enddarmphänotyp identifiziert werden, der in der Ausgangsdefizienz durch dem starken *tll*-Phänotyp überdeckt wurde. In Diesem Bereich liegt das Gen Sox100B, das im Enddarm und den Analplatten exprimiert wird (BDGP).

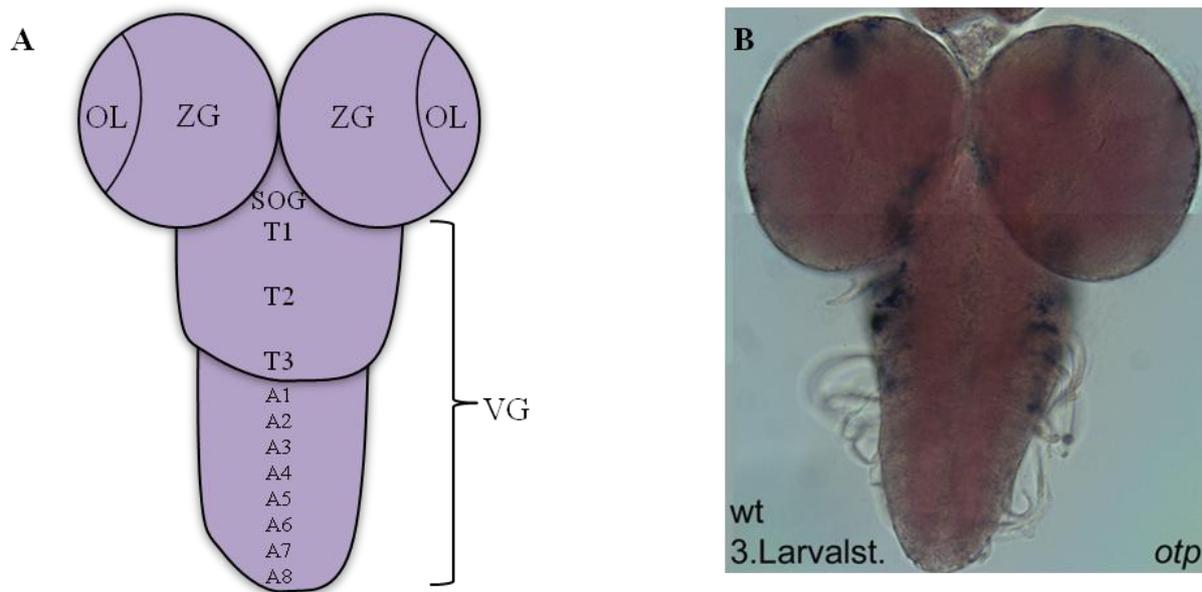
#### **4.7 Das Expressionsmuster von *otp* im larvalen Gehirn**

Nach dem bereits gezeigt werden konnte, dass *otp* im larvalen Enddarm exprimiert wird (4.5), sollte nun untersucht werden, ob auch eine *otp*-Expression im larvalen Gehirn nachgewiesen werden kann.

##### **4.7.1 *otp*-mRNA-Expression im larvalen Gehirn**

In Abbildung 4.21 ist schematisch das larvale Gehirn dargestellt. Es besteht aus zwei Gehirnhemisphären und dem Ventralganglion (auch Hirnstamm genannt). In den Hemisphären unterscheidet man zwischen den lateral gelegenen optischen Loben und dem zentralen Gehirn. Das Ventralganglion zeigt wie das ventrale Nervensystem des Embryos eine Untergliederung in drei Thorakal- und die acht Abdominal-Segmente. Am Übergang von Ventralganglion zu den Hemisphären befindet sich das suboesophageale Ganglion.

Um die *otp*-mRNA-Expression im larvalen Gehirn zu untersuchen, wurden *in situ* Hybridisierungen mit einer *otp*-Sonde (Sonde *otp1* aus 4.1.2) an wildtypischen larvalen Gehirnen des dritten Larvalstadium durchgeführt (3.2.23). In Abbildung 4.21 ist das Ergebnis dieser *in situ* Hybridisierung dargestellt.



**Abb.4.21. Schematischer Aufbau des larvalen Gehirns von *Drosophila* und Expression der *otp*-mRNA im larvalen Gehirn.** (A) Schematische Darstellung eines larvalen Gehirns im dritten Larvalstadium. Das Gehirn besteht aus zwei Hemisphären und einem Ventralganglion (VG). Die Hemisphären zeigen eine Untergliederung in die lateral gelegen optischen Loben (OL) und das zentrale Gehirn (ZG). Das Ventralganglion ist in 3 Thorakal- (T1-T3) und 8 Abdominal-Segmente (A1-A8) untergliedert, am Übergang vom Ventralganglion zu den Hemisphären befindet sich das subesophageale Ganglion (SOG). (B) *In situ* Hybridisierung eines Wildtyp-Gehirns im dritten Larvalstadium mit einer *otp*-Sonde. Dargestellt ist eine lichtmikroskopische Aufnahme des Gehirns.

Es konnte sowohl in den Gehirnhemisphären als auch im Ventralganglion eine Expression der *otp*-mRNA nachgewiesen werden (Abb.4.21.B). In den Hemisphären wird *otp* in mehreren Zellclustern im zentralen Gehirn exprimiert, in den optischen Loben kann keine *otp*-Expression nachgewiesen werden. Im Ventralganglion wird *otp* in mehreren dorso-lateral gelegenen Zellclustern des Thorax exprimiert, in den Abdominal-Segmenten findet keine Expression statt.

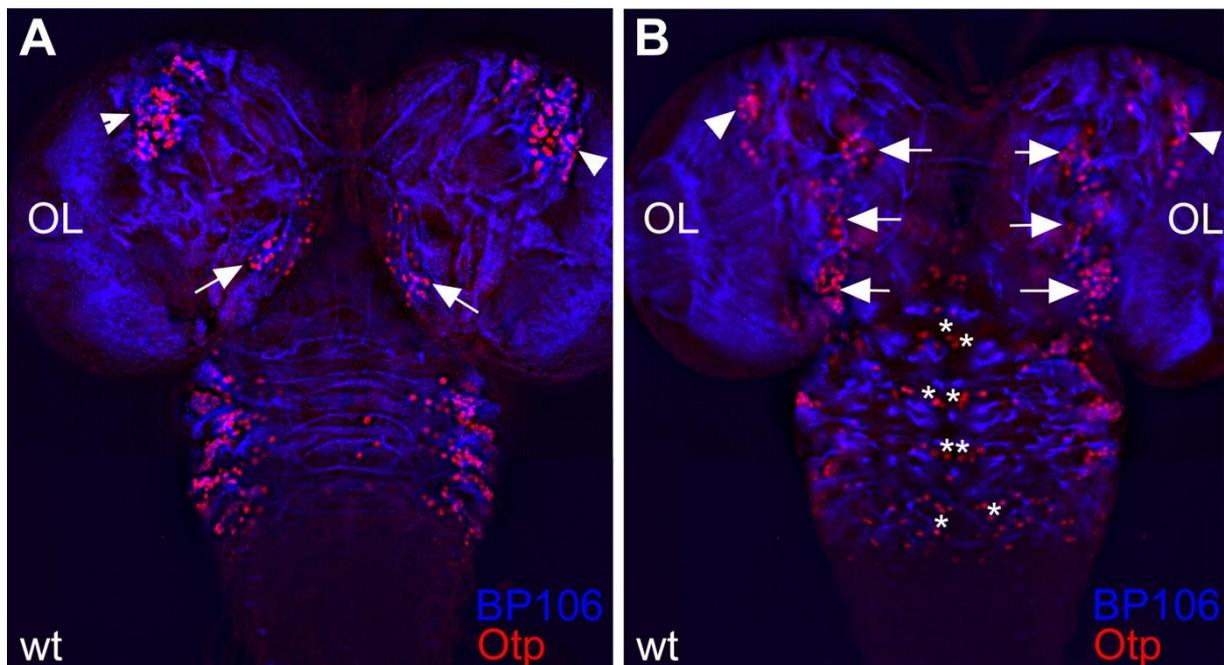
In den Imaginalscheiben konnte keine Expression von *otp* nachgewiesen werden (nicht gezeigt).

#### 4.7.2 Otp-Proteinexpression im larvalen Gehirn

Nachdem bereits bestimmt werden konnten, dass die *otp*-mRNA in den Hemisphären und im Ventralganglion des larvalen Gehirns exprimiert wird, sollte nun auch das Otp-Proteinexpressionsmuster im larvalen Gehirn genauer untersucht werden. Dazu wurden Antikörperfärbungen mit verschiedenen Nervensystemmarkern durchgeführt.

Beim larvalen Gehirn unterscheidet man zwischen primären und sekundären Neuronen. Unter primären Neuronen versteht man alle embryonal gebildeten Neurone, als sekundäre Neurone werden alle larval gebildeten Neurone bezeichnet.

Das Glykoprotein Neurotactin wird im Embryo in primären Neuronen und im Neuropil exprimiert (Hortsch et al., 1990), in der Larve wird es in den primären Neuronen herunterreguliert und ausschließlich in sekundären Neuronen exprimiert. Es ist deshalb der bester Marker für sekundäre Axonbahnen in der Larve und frühen Puppe (de la Escalera et al., 1990; Peraanu und Hartenstein, 2006). Durch Doppelfärbungen (3.2.24) mit anti-Otp-Antikörpern und dem monoklonalen anti-Neurotactin-Antikörper BP106 sollte untersucht werden, ob Otp in primären oder sekundären Neuronen exprimiert wird.



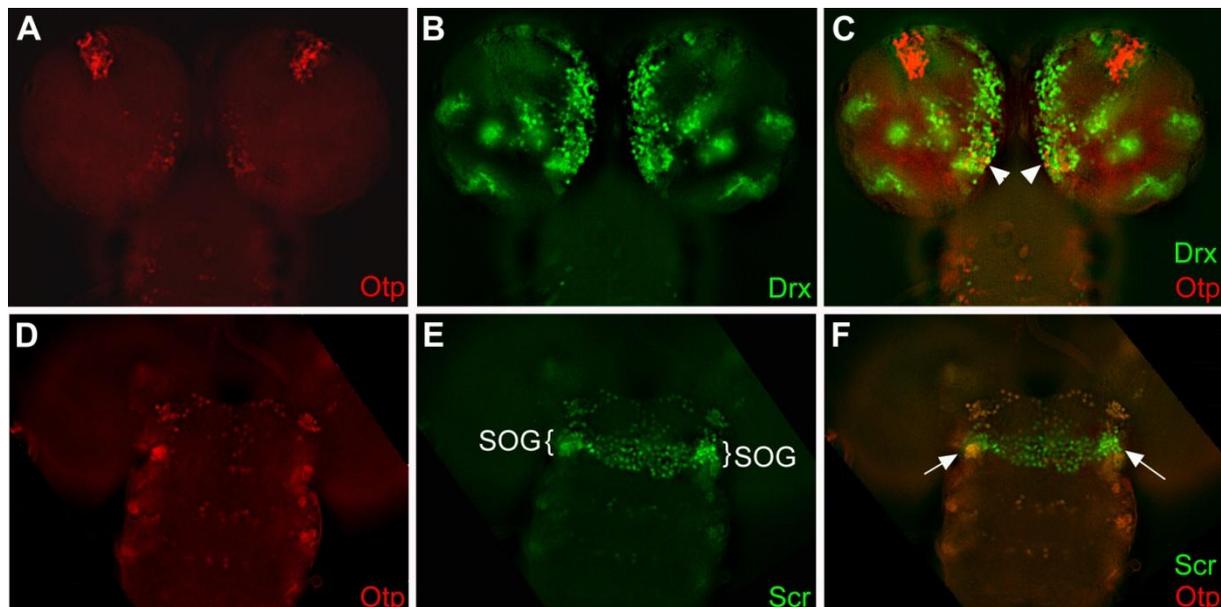
**Abb.4.22. Otp-Expression im larvalen Gehirn.** Dargestellt sind fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Doppel-Antikörperfärbungen mit anti-Otp- und anti-BP106-Antikörpern an einem larvalen Gehirn des dritten Larvalstadiums. (A) Dorsale Aufsicht auf ein Gehirn. (B) Weiter ventral gelegene Schärfeebene des Gehirns aus (A). Die Pfeile und Pfeilspitzen zeigen auf Otp-positive Zellcluster, die Sterne kennzeichnen einzelne Otp-positive Zellen. Abk.: OL: optische Loben.

In den Hemisphären wird Otp ausschließlich im zentralen Gehirn exprimiert (Abb.4.22.A, B). Bei allen Otp-exprimierenden Zellen der Hemisphären handelt es sich um BP106 positive Zellen, also sekundäre Neurone (Abb.4.22.A, B). Bei einer dorsalen Aufsicht auf das Gehirn kann eine Otp-Expression in einem großen antero-lateral gelegenen Zellcluster (Abb.4.22.A, Pfeilspitze) sowie in einem dorso-medialen Zellcluster (Abb.4.22.A, Pfeil) nachgewiesen werden. Bei einer Ansicht auf den ventralen Bereich des Gehirns kann eine Expression in einem kleinen lateralen Zellcluster (Abb.4.22.B, Pfeilspitze) sowie in drei zentral übereinander angeordneten Zellclustern nachgewiesen werden (Abb.4.22.B, Pfeile).

Im Ventralganglion wird Otp nur in den drei Thorakal-Segmenten exprimiert, in den Abdominal-Segmenten findet keine Expression statt (Abb.4.22.A, B). Die Thorakal-Segmente

können dabei morphologisch von den Abdominal-Segmenten unterschieden werden. Otp wird sowohl in lateral gelegen Zellclustern (Abb.4.22.A) als auch in einzelnen eher medial gelegen Zellen exprimiert (Abb.4.22.B). Während es sich bei den lateralen Zellclustern um sekundäre Neurone handelt (Abb.4.22.A), sind die medial gelegen Neurone BP106 negativ (Abb.4.22.B, Sterne); hierbei handelt es sich also um primäre Neurone.

Nachdem nun bestimmt werden konnte, dass es sich bei den Otp-positiven Zellclustern im zentralen Gehirn ausschließlich um sekundäre Neurone handelt sollten diese nun näher bestimmt werden. So sollte untersucht werden, ob eine Co-Lokalisation mit *Drx* oder *Scr* vorliegt. In Abbildung 4.23 sind Doppelfärbungen mit anti-Otp- und anti-*Drx*- bzw. anti-*Scr*-Antikörpern dargestellt.



**Abb.4.23. Co-Lokalisationsstudien zur genaueren Lokalisierung der Otp-Expression im larvalen Gehirn.** Dargestellt sind fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Doppel-Antikörperfärbungen mit anti-Otp- und anti-*Drx*- bzw. anti-*Scr*-Antikörpern an wildtypischen larvalen Gehirnen des dritten Larvalstadiums. In der linken Spalte sind die anti-Otp- (A, D) in der mittleren Spalte die anti-*Drx*- (B) bzw. anti-*Scr*-Antikörperfärbungen (E) dargestellt, in der rechten Spalte die Übereinanderlagerung der beiden Färbungen (C, F). Die Pfeilspitze in C zeigt auf Zellen in denen eine Co-Lokalisation von Otp und *Drx* vorliegt; der Pfeil in F zeigt auf Zellen des SOG in denen eine Co-Lokalisation von Otp und *Scr* vorliegt. Abk.: SOG: suboesophageales Ganglion.

Auch das Homeobox-Gen *drx* wird im larvalen Gehirn exprimiert. Neben einer Expression in den optischen Loben wird es außerdem in mehreren dorso-medialen Zellclustern im zentralen Gehirn exprimiert (Abb.4.23.B). Dort kann in einem Zellcluster eine Co-Lokalisation von Otp und *Drx* nachgewiesen werden (Abb.4.23.C, Pfeilspitze).

Das homeotische Gen *Sex combs reduced* (*Scr*) wird in Neuronen des suboesophagealen Ganglions exprimiert. Durch Doppelfärbungen mit anti-Scr- und anti-Otp-Antikörpern konnte hier in einigen Neuronen eine Co-Lokalisation nachgewiesen werden (Abb.4.23.F, Pfeile).

#### 4.8 Reporteranalysen zur Identifizierung regulatorischer Elemente von *otp*

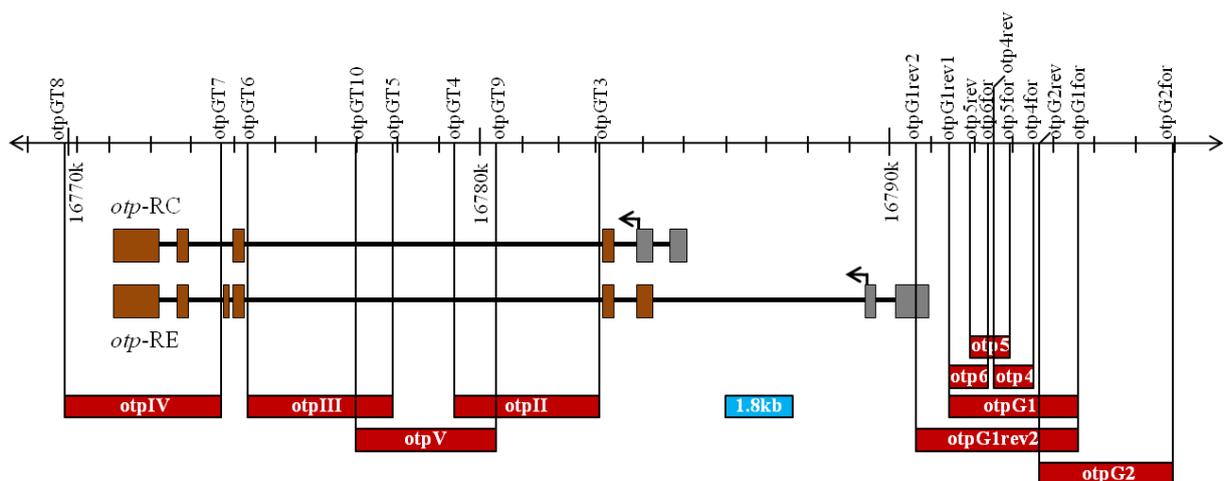
Nachdem nun das embryonale und larvale Expressionsmuster von *otp* umfassend analysiert war, sollten regulatorische Elemente identifiziert werden, die diese Expression induzieren. Die Anzahl der regulatorischen Elemente eines Gens bei *Drosophila* variiert stark, liegt im Allgemeinen aber zwischen zwei und zehn (Levine und Tjian, 2003). Regulatorische Elemente können sowohl im 5'- als auch im 3'-Bereich eines Gens, aber auch in Introns und weiter vom Gen entfernt liegen.

Ein regulatorisches Element von *otp* konnte bereits identifiziert werden. Dieses 1.8kb große regulatorische Element ist für die Expression von *otp* im Enddarm verantwortlich und liegt 950bp vor dem Transkriptionsstart des Enddarm-spezifischen *otp*-Transkript (Kusch et al., 2002). Da bisher keine regulatorischen Elemente für die Expression von *otp* im embryonalen oder larvalen Nervensystem bekannt waren, sollten diese im Rahmen dieser Arbeit identifiziert werden.

Zur Identifizierung von regulatorischen Elementen verwendet man Reportergene. Eines der am häufigsten verwendeten Reportergene ist das lacZ Gen von *E. coli*, das für das Enzym  $\beta$ -Galaktosidase codiert, ein weiteres das grün-fluoreszierende Protein GFP der Qualle *Aequorea victoria*. Man fusioniert ein potentielles regulatorisches Element mit einem solchen Reporter, erzeugt transgene Fliegen, die dieses Konstrukt enthalten und untersucht diese auf eine Reporterexpression. Dabei untersucht man nicht nur, ob es zu einer Reporterexpression kommt, sondern auch ob das zeitliche und räumliche Expressionsmuster des Reporters mit dem Expressionsmuster des betreffenden Gens übereinstimmt. Es ist wichtig, mehrere unabhängige transgene Linien zu untersuchen, da sich Positionseffekte auf die Reporterexpression auswirken können. Unter Positionseffekten versteht man, dass bei *Drosophila* die Expression eines Reporters durch die Chromatinstruktur der Insertionsstelle des Reporterkonstrukts beeinflusst werden kann (Spradling und Rubin, 1983). Es stehen verschiedene Arten von Vektoren für Reporteranalysen zur Verfügung. Zwei verschiedene Serien von Vektoren wurden für die in dieser Arbeit durchgeführten Reporteranalysen verwendet. Vektoren der Pelican-Serie (P-element lacZ/GFP insulated CaSpeR Enhancer vectors) enthalten das Reporter (lacZ oder GFP), einen Hsp70 Minimal-Promotor und eine TATA Box flankiert von gypsy

Insulator Sequenzen, die zu einer Reduktion der oben beschriebenen Positionseffekte führen (Barolo et al., 2000). Der Nachweis der Reporterexpression erfolgt über einen Nachweis der GFP-Expression (direkt) oder der  $\beta$ -Galaktosidase-Expression (über Aktivitäts- oder Antikörperfärbung). Vektoren der pBPG(U)w-Serie enthalten neben der Sequenz für den Hefe-Transkriptionsfaktor GAL4 eine Kasette, die eine Klonierung von Fragmenten mit Hilfe der Gateway-Technologie ermöglicht, sowie „attB sites“ für eine PhiC31-basierte Keimbahntransformation (Pfeiffer et al., 2008). Durch die gerichtete Keimbahntransformation über PhiC31 ist die Erzeugung mehrerer unabhängiger transgener Linien nicht mehr notwendig, da Fliegenstämme mit geeigneten „attP sites“ im Genom zur Verfügung stehen, bei denen die Positionseffekte reduziert sind. Eine Besonderheit des Vektor pBPGUw im Gegensatz zum Vektor pBPGw ist ein synthetischer Core-Promotor (DSCP), der die Motive verschiedener Promotoren (TATA, Inc, MTE, DPE) enthält (Pfeiffer et al., 2008). Der Nachweis einer Reporterexpression erfolgt hierbei über einen direkten Nachweis von GAL4-mRNA über *in situ* Hybridisierung oder über eine GAL4 getriebene Expression von UAS-GFP oder UAS-lacZ.

In Abbildung 4.24 ist die Bezeichnungen und die Lage aller untersuchten Reportergenkonstrukte sowie der verwendeten Primer dargestellt. In Tabelle 4.5 sind zusätzlich dazu die genaue Größe der Fragmente, der Vektor in den das jeweilige Fragment kloniert wurde, die Durchführung der Injektion (diese wurde teilweise von Firmen durchgeführt), der zur Injektion verwendete Fliegenstamm sowie die Anzahl der unabhängigen Transformanten aufgeführt.

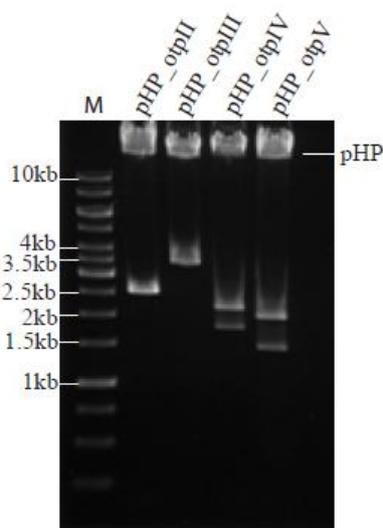


**Abb.4.24. Otp-Reportergenkonstrukte.** Oben ist die Lage der Primer der verschiedenen Konstrukte dargestellt, darunter die Exon- und Intron-Struktur der beiden *otp*-Transkripte (*otp-RC*, *otp-RE*). Ganz unten sind die untersuchten Reportergenkonstrukte als rote Rechtecke eingezeichnet, das blaue Rechteck beschreibt die Lage des 1.8kb regulatorischen Elements für die *otp*-Expression im Enddarm.

**Tabelle 4.5. Übersicht über die verschiedenen *otp*-Reporter-genkonstrukte.** Die Bezeichnung der einzelnen Konstrukte, ihre Größe, der verwendete Vektor, die Durchführung der Injektion, der zur Injektion verwendete Fliegenstamm sowie die Anzahl der unabhängigen Transformanten ( $T_{\text{unabhängig}}$ ) sind aufgeführt.

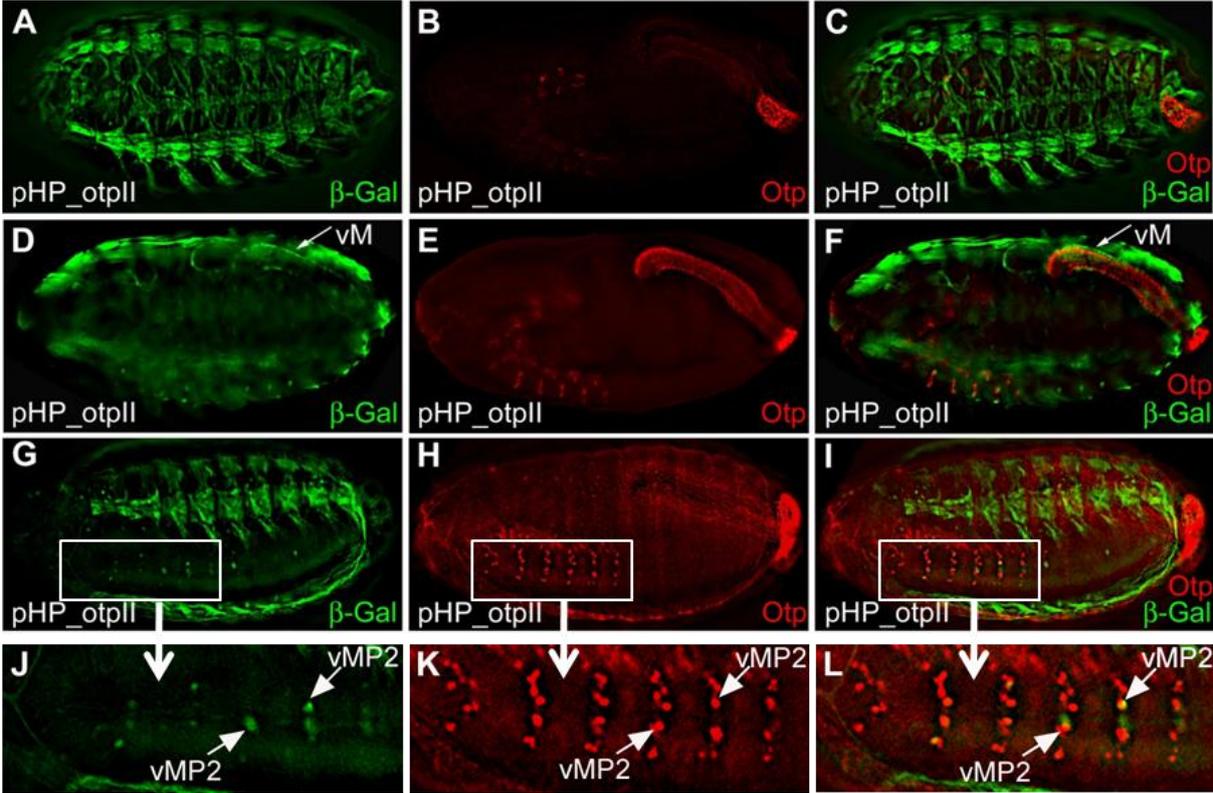
Bezeichnung	Größe	Vektor	Injektion durch	Fliegenstamm	Anzahl $T_{\text{unabhängig}}$
<b>otpII</b>	3460bp	pH-Pelican	Vanedis	yw	3
<b>otpIII</b>	3593bp	pH-Pelican	Vanedis	yw	5
<b>otpIV</b>	3999bp	pH-Pelican	Vanedis	yw	5
<b>otpV</b>	3370bp	pH-Pelican	Vanedis	yw	4
<b>otpG1</b>	3414bp	pBPGUw	Vanedis	Bl 8622	7
<b>otpG1rev2</b>	3914bp	pBPGw	Vanedis	Bl 8622	1
<b>otpG2</b>	3383bp	pBPGUw	BestGene	Bl 23648	2
<b>drxG1</b>	3219bp	pH-Pelican	N.Bach	yw	3
<b>drxG2</b>	3267bp	pH-Pelican	N.Bach	yw	1
<b>otpG4</b>	997bp	pBPGUw	N.Bach	Bl 24871	3
<b>otpG5</b>	1000bp	pBPGUw	N.Bach	Bl 24871	1
<b>otpG6</b>	1008bp	pBPGUw	N.Bach	Bl 24871	1

Zuerst sollte der Intron-Bereich von *otp* auf das Vorhandensein von regulatorischen Elementen untersucht werden. Dazu wurden vier zwischen 3.3kb und 4.0kb große, teils überlappende Fragmente des Intron-Bereichs von *otp* (genau Lage siehe Abb.4.24, genaue Größe siehe Tab.4.5) - otpII, otpIII, otpIV und otpV - über PCR aus dem Klon BacR10P11 amplifiziert (3.2.17). Bei den Fragmenten otpII und otpIV wurden dabei *AscI*-Schnittstellen für die spätere Klonierung angefügt. Die PCR-Produkte wurden in den Vektor pCR<sup>®</sup>-XL-TOPO<sup>®</sup> zwischenkloniert (3.2.9). Die Klonierung der Fragmente otpII und otpIV erfolgte ungerichtet über *AscI* in den Vektor pH-Pelican (pHP) (3.2.6, 3.2.7), anschließend wurde über eine PCR-Reaktion mit einem internen und einem Vektor-spezifischen Primer (M13rev) die richtige Orientierung bestimmt (nicht gezeigt). Die Klonierung von otpIII und otpV erfolgte gerichtet über *Bam*HI und *Xho*I bzw. *Acc*65I und *Not*I in den Vektor pHP (3.2.6, 3.2.7). In Abbildung 4.25 sind Restriktionsverdaus der pHP-Konstrukte dargestellt.



**Abb.4.25. Gelelektrophoretische Auftrennung von *EcoRI*-Restriktionsverdaus der pHP\_otp Konstrukte.** 1µg der DNA der Konstrukte pHP\_otpII, otpIII, otpIV und otpV wurden mit *EcoRI* verdaut, auf einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt, mit Ethidiumbromid gefärbt und mittels INTAS-Geldokumentationssystem detektiert. M: GeneRuler 1kb Ladder (Fermentas).

Die so klonierten Konstrukte wurden von einem Injektionsservice (Vanedis) in yw Embryonen injiziert, die erhaltenen Transformanten wurden balanciert und die Transformanten anschließend auf eine  $\beta$ -Galaktosidase-Expression untersucht. Bei allen vier Konstrukten standen mindestens drei unabhängige transgene Linien zur Verfügung (genaue Anzahl siehe Tabelle 4.5). Von jedem Konstrukt wurden drei unabhängige Linien auf Reporterexpression untersucht, da es aufgrund des Integrationsortes der Konstrukte zu Positionseffekten kommen kann. Bei den Konstrukten pHP\_otpIII, pHP\_otpIV und pHP\_otpV konnte keine Reporterexpression im Embryo nachgewiesen werden (nicht gezeigt). Beim Konstrukt pHP\_otpII konnte eine Reporterexpression im Embryo nachgewiesen werden. In Abbildung 4.26 sind Doppelfärbungen von pHP\_otpII Embryonen mit anti- $\beta$ -Galaktosidase und anti-Otp-Antikörpern dargestellt.

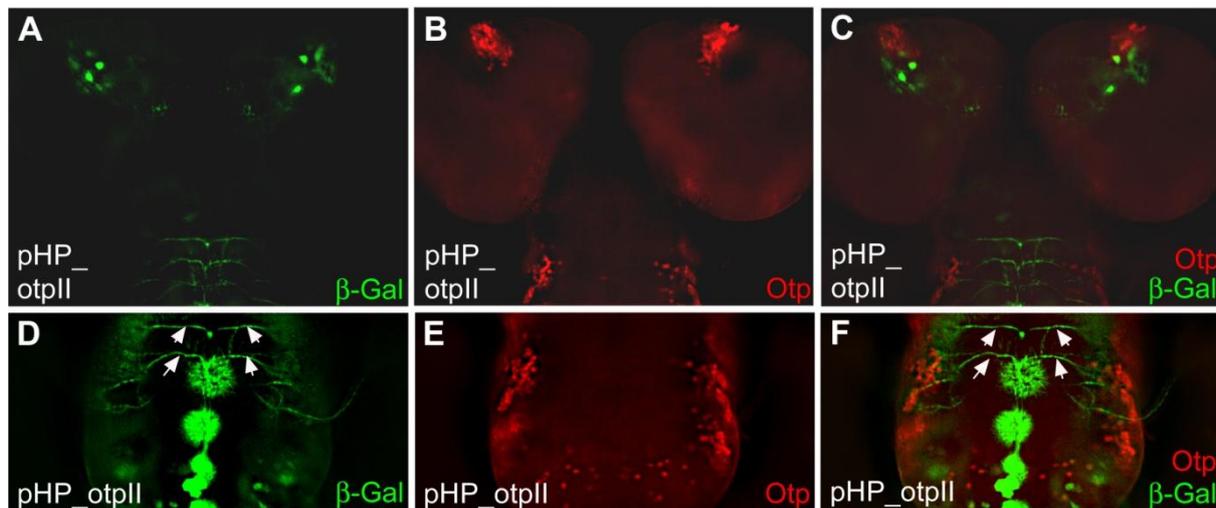


**Abb.4.26. Reporterexpression des Konstrukts pHP\_otpII im Embryo.** Dargestellt sind konfokale Aufnahmen von anti- $\beta$ -Galaktosidase ( $\beta$ -Gal)- und anti-Otp-Antikörperfärbungen an Embryonen des Stamm pHP\_otpII. In der linken Spalte ist jeweils die anti- $\beta$ -Gal-Antikörperfärbung (A, D, G, J), in der mittleren Spalte die anti-Otp-Antikörperfärbung (B, E, H, K) und in der rechten Spalte die Übereinanderlagerung der beiden Färbungen (C, F, I, L) dargestellt. Bei J-L handelt es sich um eine vergrößerte Darstellung der in G-I umrandeten Bereiche der Embryonen. In allen Bilder ist anterior immer links, es handelt sich um Seitenansichten (A-F) bzw. ventrale Aufsichten (G-L). Abk.: vM: viszerales Mesoderm; vMP2: ventrale „Midline Precursor 2“ Zelle.

Bei der Analyse einer möglichen Co-Lokalisation ist dabei zu beachten, dass die  $\beta$ -Gal-Expression der Reporterengenkonstrukte in der gesamten Zelle stattfindet, während der Transkriptionsfaktor Otp ausschließlich in den Zellkernen exprimiert wird. Im Embryo konnte eine starke Reporterengenexpression in den Myosinfilamenten nachgewiesen werden (Abb.4.26.A, C), die nicht mit Otp co-lokalisiert ist. Diese schließt auch das viszerale Mesoderm ein, das die Otp-exprimierenden Zellen des Enddarms umgibt (Abb.4.26. D, F, Pfeil). Daneben konnte auch eine *otp*-spezifische Reporterengenexpression von je zwei Zellen pro Segment im ventralen Nervensystem nachgewiesen werden, dabei handelt es sich um die Otp-exprimierenden vMP2-Zellen (Abb.4.26.G-L, Pfeile).

In dem Konstrukt befinden sich also mindestens zwei regulatorische Elemente, eines von *otp* und eines von einem in der Nachbarschaft liegenden Gen, das in den Myosinfilamenten exprimiert wird.

Auch im larvalen Gehirn konnte bei drei der vier Konstrukte keine Reporterengenexpression nachgewiesen werden. Das Konstrukt pHP\_otpII zeigt neben der Reporterengenexpression im Embryo auch eine im larvalen Gehirn. Diese kann mit Antikörpern gegen  $\beta$ -Galaktosidase nachgewiesen werden und ist in Abbildung 4.27 dargestellt.



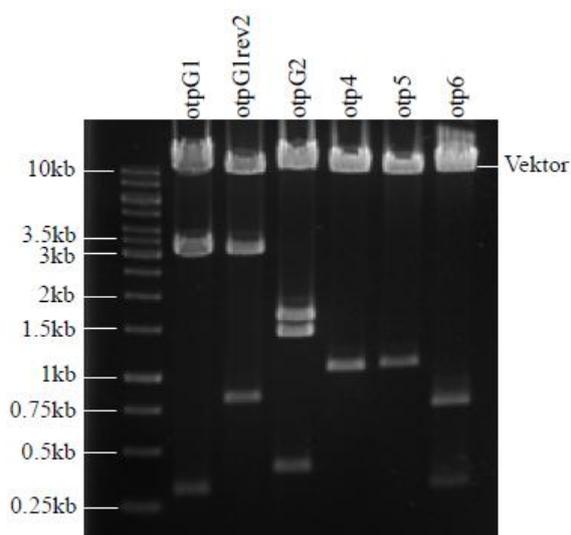
**Abb.4.27. Reporterengenexpression des Konstruktes pHP\_otpII im larvalen Gehirn.** Dargestellt sind fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von anti- $\beta$ -Galaktosidase ( $\beta$ -Gal)- und anti-Otp-Antikörperfärbungen an larvalen Gehirnen des Stammes pHP\_otpII. In der linken Spalte ist jeweils die anti- $\beta$ -Gal-Antikörperfärbung (A, D), in der mittleren Spalte die anti-Otp-Antikörperfärbung (B, E) und in der rechten Spalte die Überlagerung der beiden Färbungen (C, F) dargestellt. Die Pfeile in D und F zeigen auf  $\beta$ -Gal-exprimierende Axone.

Dabei konnte eine  $\beta$ -Gal-Expression in einem Zellcluster in den Hemisphären nachgewiesen werden, dieses Cluster liegt direkt neben einem Cluster Otp-positiver Zellen (Abb.4.27.A, C). Da  $\beta$ -Gal in den Zellkörpern und Otp im Zellkern exprimiert wird, ist jedoch nicht auszuschließen, dass es sich um eine *otp*-spezifische Reporterengenexpression handelt. In den

Thorakal-Segmenten des Ventralganglions wird  $\beta$ -Gal besonders stark in Axonen exprimiert, die von lateral gelegenen Otp-positiven Zellclustern ausgehen (Abb.4.27.D-F Pfeile), in den Zellkörpern findet dagegen eine schwächere Expression statt. Es konnte also ein regulatorisches Element für die Otp-Expression im Ventralganglion identifiziert werden.

Somit konnte gezeigt werden, dass im Intronbereich von *otp* in einen 3.5kb großen Bereich mindestens zwei regulatorische Elemente liegen - eines für eine embryonale und larvale *otp*-Expression und ein weiteres für ein in der Nachbarschaft liegendes Gen mit einer Expression in den Myosinfilamenten.

Nachdem nun der komplette Intron-Bereich von *otp* auf regulatorische Elemente untersucht worden war, sollte im 5'-Bereich nach weiteren regulatorischen Elementen gesucht werden. Dazu wurden drei teils überlappende 3.5-4kb große Fragmente des 5'-Bereiches (Lage siehe Abb.4.24) - *otpG1*, *otpG1rev2* und *otpG2* - über PCR aus dem Klon BacR10P11 amplifiziert (3.2.17) und in den Vektor pCR<sup>®</sup>8/GW/TOPO<sup>®</sup> zwischenkloniert (3.2.10). Die Fragmente wurden nun mit Hilfe der Gateway-Technologie in die Vektoren pBPGUw (*otpG1*, *otpG2*) bzw. pBPGw (*otpG1rev2*) kloniert (3.2.11). Das Konstrukt *otpG1rev2* enthält die endogene Promotorregion von *otp* und wurde daher in den Vektor pBPGw ohne DSCP kloniert. In Abb.4.28 ist ein *Eco*RI-Verdau der Konstrukte dargestellt.



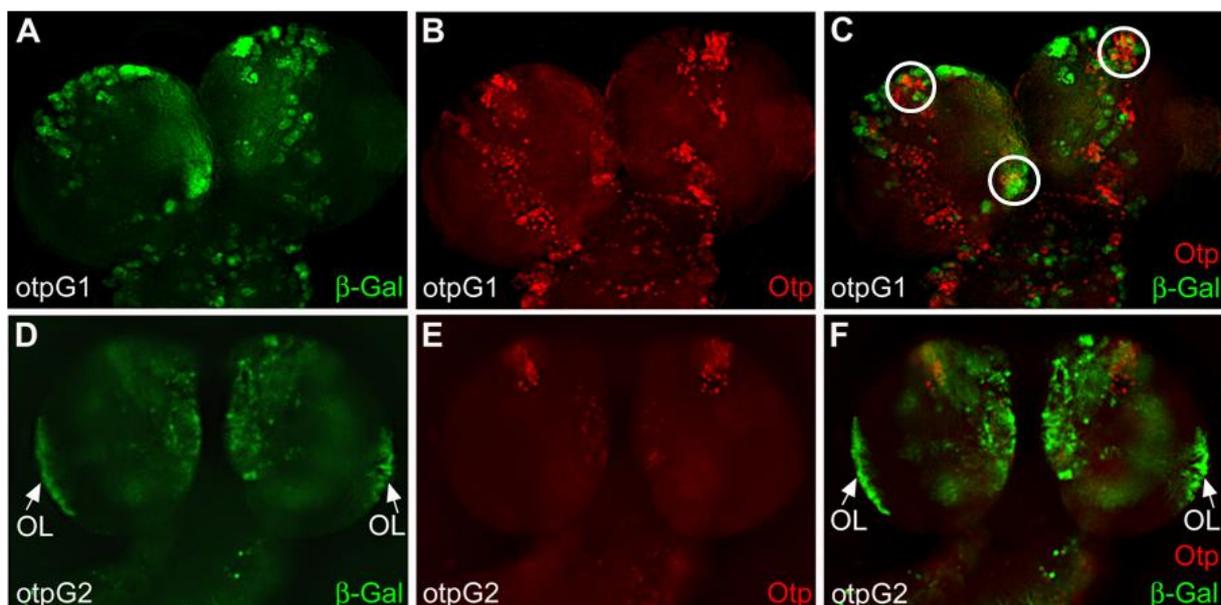
**Abb.4.28. Gelelektrophoretische Auftrennung von *Eco*RI-Restriktionsverdau der pBPG(U)w\_otp Konstrukte.** 1 $\mu$ g der DNA der Konstrukte pBPGUw\_otpG1, otpG2, otp4, otp5, otp6 sowie von pBPGw\_otpG1rev2 wurden mit *Eco*RI verdaut, auf einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt, mit Ethidiumbromid gefärbt und mittels INTAS-Geldokumentationssystem detektiert. M: GeneRuler 1kb Ladder (Fermentas).

In allen Spuren ist die Bande des Vektors pBPGUW (11698bp) bzw. pBPGw (11548bp) zu sehen. Aufgrund von internen *Eco*R1-Schnittstellen ergeben sich für die verschiedenen Konstrukte folgende Fragmente: bei *otpG1* ein 3117bp und ein 297bp Fragment, bei

otpG1rev2 ein 3317bp und ein 797bp Fragment und bei otpG2 ein 1598bp, ein 1391bp und ein 394bp Fragment.

Die Konstrukte pBPGUw\_otpG1 und pBPGw\_otpG1rev2 wurden von einem Injektionsservice (Vanedis) in Fliegen des Stamms Bl 8622 injiziert und über eine PhiC31-basierte Keimbahntransformation transgene Fliegen erzeugt (Groth et al., 2004). Bei diesen Fliegen befinden sich die „attP sites“ auf dem linken Arm des 3.Chromosoms in der Region 68A4 und die PhiC31-Integrase unter Kontrolle des *nanos*-Promotors auf dem X-Chromosom. Das Konstrukt pBPGUw\_otpG2 wurde von einem andern Injektionsservice (BestGene) in Fliegen des Stamm Bl 23548 injiziert, der „attP sites“ auf dem rechten Arm des 3.Chromosoms in der Region 86F besitzt und die PhiC31-Integrase unter Kontrolle des *vas*-Promotors auf dem X-Chromosom. Die so erzeugten Transformanten wurden balanciert und es konnte wie erwartet eine Lokalisation auf dem 3.Chromosom nachgewiesen werden. Zur Analyse wurden die Fliegen mit dem Stamm UAS-nlacZ gekreuzt und auf  $\beta$ -Galaktosidase-Expression untersucht. Der Stamm UAS-nlacZ ermöglicht eine Gal4 gesteuerte Expression des Reportergens lacZ in den Zellkernen.

Dabei konnte bei allen drei Konstrukten keine embryonale Reporterexpression nachgewiesen werden (nicht gezeigt). In Abbildung 4.29 ist die larvale Reporterexpression der Konstrukte pBPGUw\_otpG1 und pBPGUw\_otpG2 dargestellt.



**Abb.4.29. Reporterexpression der Konstrukte pBPGUw\_otpG1 und pBPGUw\_otpG2 im larvalen Gehirn.** Dargestellt sind fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von anti- $\beta$ -Galaktosidase ( $\beta$ -Gal)- und anti-Otp-Antikörperfärbungen an larvalen Gehirnen der mit dem Stamm UAS-nlacZ gekreuzten Stämme pBPGUw\_otpG1 (A-C), pBPGUw\_otpG2 (D-F) und pBPGw\_otpG1rev2 (G-H). In der linken Spalte ist jeweils die anti- $\beta$ -Gal-Antikörperfärbung (A, D), in der mittleren Spalte die anti-Otp-Antikörperfärbung (B, E) und der rechten Spalte die Übereinanderlagerung der beiden Färbungen (C, F) dargestellt. Bereiche mit Co-Lokalisation von Otp und  $\beta$ -Gal sind durch Kreise markiert. Abk.: OL: optische Loben.

Das Konstrukt pBPGUw\_otpG1 zeigt eine Reporterexpression in weiten Bereichen des zentralen Gehirns (Abb.4.29.A). Dabei kann in einem antero-lateralen und in einem dorso-medialen Zellcluster eine Co-Lokalisation von Otp und  $\beta$ -Gal nachgewiesen werden (Abb.4.29.C, Kreise).

Bei Konstrukt pBPGw\_otpG1rev2 konnte keine *otp*-spezifische Reporterexpression im larvalen Gehirn nachgewiesen werden (nicht gezeigt).

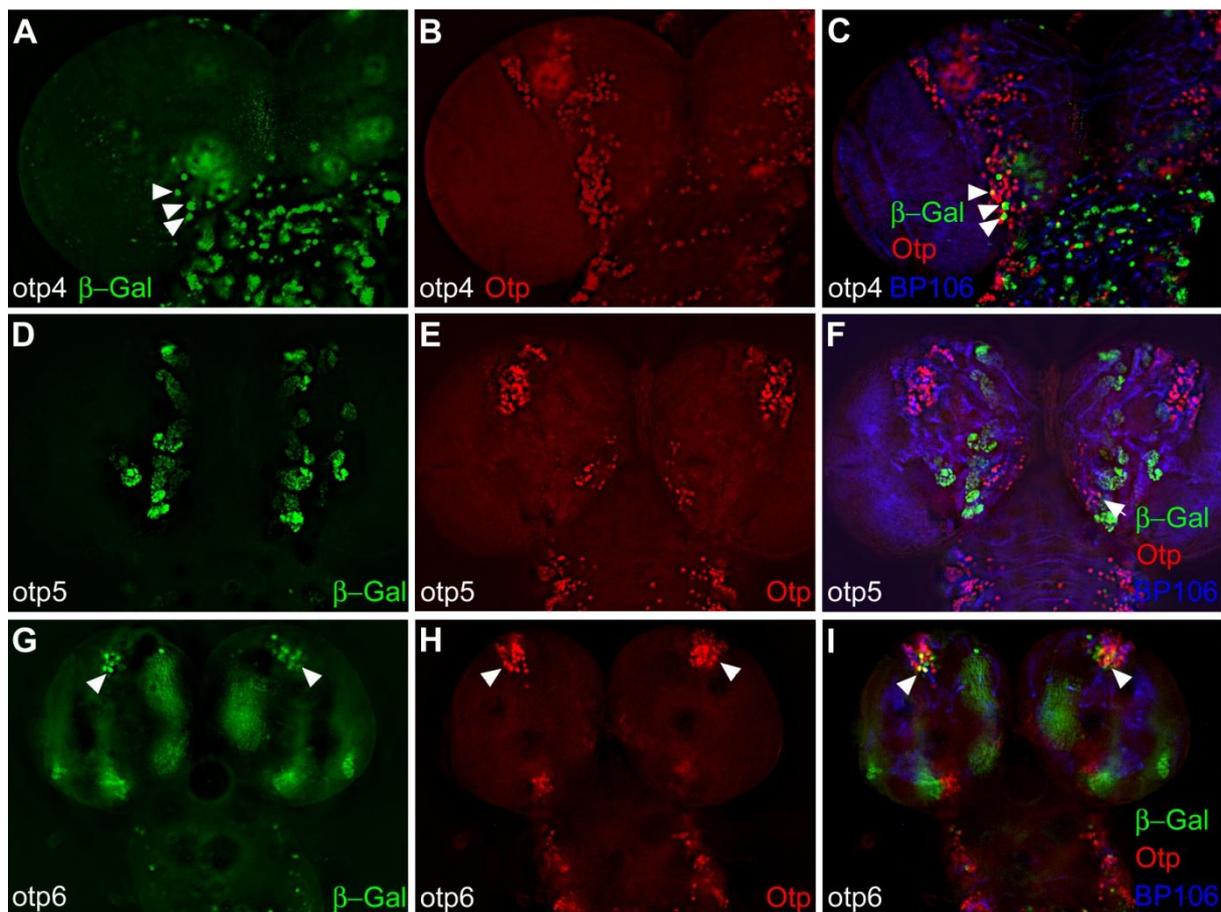
Das Konstrukt pBPGUw\_otpG2 zeigt eine Reporterexpression in den optischen Loben und in dorso-medialen Zellclustern des zentralen Gehirns (Abb.4.29.D-F). In beiden Bereichen konnte keine Co-Lokalisation mit Otp nachgewiesen werden, es handelt es sich dabei um keine *otp*-spezifische Reporterexpression.

Nachdem nachgewiesen werden konnte, dass das Konstrukt pBPGUw\_otpG1 eine *otp*-spezifische Reporterexpression in mehreren Bereichen des larvalen Gehirns zeigt, sollte dieses regulatorische Element nun genauer lokalisiert und gegebenenfalls in unterschiedliche regulatorische Elemente aufgeteilt werden. Dazu wurde das Konstrukt *otpG1* in drei überlappende, zwischen 997-1008bp große Fragmente unterteilt. Diese wurden wiederum über PCR aus dem Klon BacR10P11 amplifiziert (3.2.17) und in den Vektor pCR<sup>®</sup>8/GW/TOPO<sup>®</sup> zwischenkloniert (3.2.10). Anschließend wurden die Fragmente mit Hilfe der Gateway-Technologie in den Vektor pBPGUw kloniert (3.2.11). In Abbildung 4.28 ist ein *EcoRI*-Verdau dieser Konstrukte dargestellt. Während bei den Konstrukten *otp4* und *otp5* neben der Vektorbande nur eine Insertbande bei 997bp bzw. 1kb zu sehen ist, ergeben sich aufgrund einer internen *EcoRI*-Schnittstelle im Fragment *otp6* ein 711bp und ein 297bp Fragment. Die fertigen Konstrukte wurden in Fliegen des Stamms Bl 24871 injiziert (3.3.31, 3.2.32). Dieser Fliegenstamm enthält „attP sites“ auf dem linken Arm des 3.Chromosoms in der Region 65B2 und die PhiC31-Integrase unter Kontrolle des *vas*-Promotors auf dem X-Chromosom (Bischof und Basler, 2007) und ermöglicht so eine Erzeugung transgener Fliegen mittels PhiC31-basierter Keimbahntransformation. In Tabelle 4.6 sind die Ergebnisse der Injektionen dargestellt.

**Tab.4.6. Injektion der pBPGUw\_otp-Konstrukt in Bl 24781 Embryonen und der pHP\_drx-Konstrukte in yw Embryonen.** Es sind die Anzahl der injizierten Embryonen, die Anzahl der geschlüpften Larven und Fliegen sowie die Anzahl der Transformanten und die sich daraus ergebende Transformationseffizienz der verschiedenen Konstrukte aufgeführt.

Konstrukt	pBPGUw_otp4	pBPGUw_otp5	pBPGUw_otp6	pHP_drxG1	pHP_drxG2
<b>Anzahl Embryonen</b>	444	413	703	680	303
<b>Anzahl Larven</b>	116	93	110	278	63
<b>% Larven</b>	25,5%	22,5%	15,6%	40,9%	20,8%
<b>Anzahl Fliegen</b>	95	82	98	205	51
<b>% Fliegen</b>	21,4%	19,8%	13,9%	30,1%	16,8%
<b>♂ Fliegen</b>	41	29	47	-	-
<b>% ♂ Fliegen</b>	9,2%	7%	6,7%	-	-
<b>Transformanten (unabhängig)</b>	3	1	1	3	1
<b>Transformations-effizienz bzgl. Embryonen [%]</b>	0,67%	0,24%	0,14%	0,44%	0,33%
<b>Transformations-effizienz bzgl. Fliegen [%]</b>	7,32%	3,45%	2,13%	1,46%	1,96%

Es konnten beim Konstrukt pBPGUw\_otp4 drei unabhängige Transformanten erzeugt werden, bei den Konstrukten pBPGUw\_otp5 und pBPGUw\_otp6 jeweils eine, die daraufhin balanciert wurden. Es konnte wie erwartet bei allen Transformanten eine Lokalisation auf dem 3.Chromosom nachgewiesen werden. Nach Kreuzung der Fliegen mit dem Fliegenstamm UAS-nlacZ konnte bei allen drei Konstrukten eine  $\beta$ -Galaktosidase-Expression in verschiedenen Bereichen des larvalen Gehirns nachgewiesen werden. In Abbildung 4.30 sind Dreifachantikörperfärbungen mit anti-Neurotactin-, anti-Otp- und anti- $\beta$ -Gal-Antikörpern dargestellt.



**Abb.4.30. Reporterexpression der Konstrukte pBPGUw\_otp4, otp5 und otp6 im larvalen Gehirn.** Dargestellt sind fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von anti- $\beta$ -Galaktosidase ( $\beta$ -Gal)-, anti-Otp-, und anti-BP106-Antikörperfärbungen an larvalen Gehirnen der mit dem Stamm UAS-nlacZ gekreuzten Stämme pBPGUw\_otp4 (A-C), otp5 (D-F) und otp6 (G-H). In der linken Spalte ist jeweils die anti- $\beta$ -Gal Antikörperfärbung, in der mittleren Spalte die anti-Otp-Antikörperfärbung und der rechten Spalte die Überlagerung der beiden Färbungen mit der anti-BP106-Antikörperfärbung dargestellt. Die Pfeile zeigen auf Zellcluster mit Co-Lokalisation.

Das Konstrukt pBPUw\_otp4 zeigt eine Reporterexpression im Ventralganglion und im suboesophagealen Ganglion (Abb.4.30.A). Während es sich bei der Reporterexpression im Ventralganglion um Otp-negative Zellen handelt, konnte in den Zellen des suboesophagealen Ganglion eine Co-Lokalisation mit Otp nachgewiesen werden (Abb.4.30.C, Pfeilspitzen).

Das Reportergenkonstrukt pBPGUw\_otp5 zeigt eine Reporterexpression in mehreren Zellclustern im zentralen Gehirn (Abb.4.30.D). Dabei handelt es sich um die sogenannten DM- (dorsomedial) Lineages. Die sechs DM Lineages bestehen aus durchschnittlich 450 Zellen und sind im Bereich der Mittellinie der Hemisphären lokalisiert, als DM1 bezeichnet man dabei die am meisten rostral gelegene Lineage, als DM6 die am meisten caudal gelegene Lineage (Izergina et al., 2009). Die außergewöhnlich hohe Anzahl von Zellen in diesen Lineages kommt durch eine Besonderheit bei der Teilung der Neuroblasten zu Stande. Während sich die meisten Neuroblasten stammzellartig in einen Neuroblasten und eine

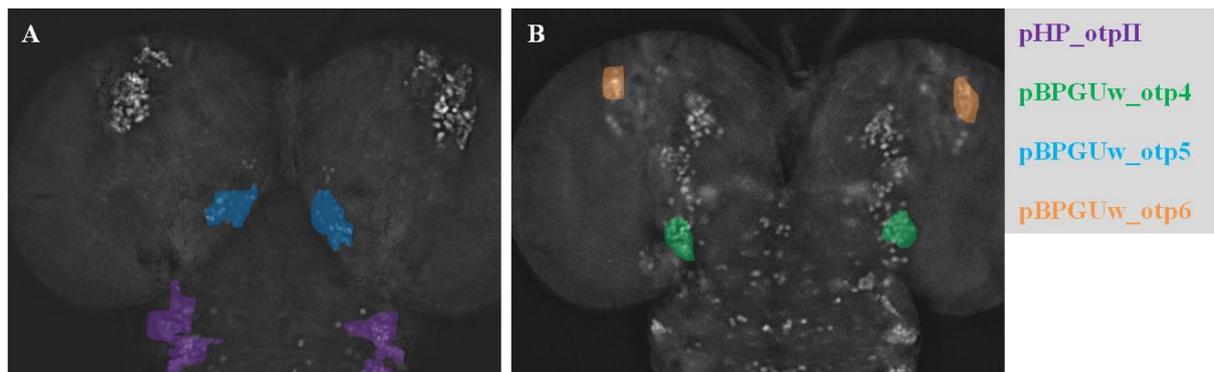
Gangliennutterzelle teilen, entstehen bei der Teilung dieser Neuroblasten zuerst intermediäre Vorläuferzellen, die eine große Anzahl von Gangliennutterzellen bilden (Bello et al., 2008; Boone et al., 2008; Bowman et al., 2008). Aufgrund der Lage der Zellen konnte bestimmt werden, dass *Otp* nur in Zellen der DM6 Lineage exprimiert wird und dort konnte eine Co-Lokalisation mit dem Reporter gen nachgewiesen werden (Abb.4.30.F, Pfeil).

Das Reporter genkonstrukt pBPGUw\_otp6 zeigt eine Reporter genexpression in einem Zellcluster des zentralen Gehirns (Abb.4.30.G, Pfeilspitze). Dabei handelt es sich um ein *Otp*-positives Zellcluster (Abb.4.30.I, Pfeilspitze).

Im Bereich des ursprünglichen Konstrukts pBPGUw\_otpG1 konnten also mindestens drei unabhängige regulatorische Elemente für eine *otp*-Expression im larvalen Gehirn identifiziert werden.

Da regulatorische Elemente eines Genes auch weiter von dem Gen entfernt liegen können, wurde auch der 5' -Bereich von *drx* untersucht. Da die Leserichtung von *drx* entgegen der von *otp* ist, befindet sich der 5'-Bereich von *drx* in unmittelbarer Umgebung zum 5'-Bereich von *otp*. Über PCR wurden die Fragmente drxG1 und drxG2 aus dem Klon BacR10P11 amplifiziert (3.2.17) und in den Vektor pCR<sup>®</sup>8/GW/TOPO<sup>®</sup> zwischenkloniert (3.2.10). Anschließend wurden die Fragmente mit Hilfe der Gateway-Technologie in den Vektor pHPelican kloniert (3.2.11). Die fertigen Konstrukte wurden in *yw* Fliegen injiziert (3.2.30, 3.2.32). In Tabelle 4.6 sind die Ergebnisse der Injektionen dargestellt. Vom Konstrukt pHP\_drxG1 konnten drei unabhängige Transformanten erzeugt werden, vom Konstrukt pHP\_drxG2 nur eine. Die Transformanten wurden balanciert und auf eine Reporter genexpression untersucht. Beide Konstrukte zeigten weder im Embryo noch im larvalen Gehirn eine Reporter genexpression (nicht gezeigt).

Insgesamt konnten also neben zwei nicht *otp*-spezifischen regulatorischen Elementen mindestens vier regulatorische Elemente des Homeobox Gens *otp* identifiziert werden. Davon liegt eins im Intronbereich von *otp* (Intron 4) und drei liegen im 5'-Bereich des Gens. Es konnte nur ein regulatorisches Element (Fragment otpII) für eine *otp*-Expression im embryonalen Nervensystem, genauer in den vMP2-Neuronen des ventralen Nervensystems identifiziert werden. Daneben konnten mindestens vier regulatorische Elemente für die *otp*-Expression im larvalen Gehirn identifiziert werden. In Abbildung 4.31 sind schematisch die *otp*-positiven Bereiche der Reporter genexpression der verschiedenen Konstrukte im larvalen Gehirn dargestellt.



**Abb.4.31. Schematische Darstellung der *otp*-spezifischen Reporterexpression verschiedener Konstrukte im larvalen Gehirn.** (A) Dorsale Sicht auf ein mit anti-Otp-Antikörpern gefärbtes larvales Gehirn. (B) Ventrale Sicht auf ein mit anti-Otp-Antikörpern gefärbtes larvales Gehirn. Dabei ist jeweils die *otp*-spezifische Reporterexpression der Konstrukte pHP\_otpII (lila), pBPGUw\_otp4 (grün), pBPGUw\_otp5 (blau) und pBPGUw\_otp6 (gelb) farblich hervorgehoben.

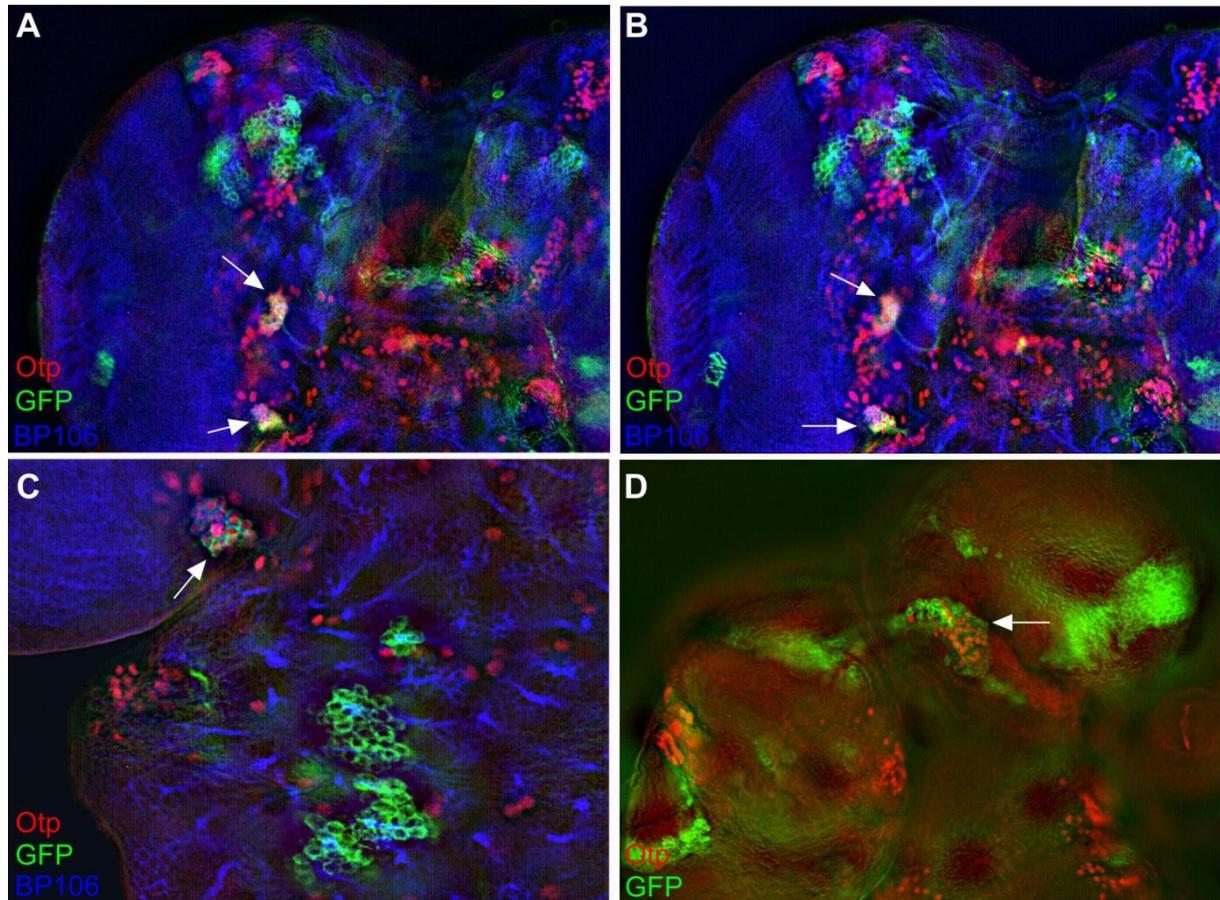
So liegt im Bereich des Fragments *otpII* in Intron 4 von *otp* ein regulatorisches Element für die *otp*-Expression in mehreren lateral gelegenen Zellclustern in den Thorakal-Segmenten des Ventralganglions (lila in Abb.4.31). Im 5'-Bereich von *otp* konnte ein regulatorisches Element für die *otp* Expression im suboesophagealen Ganglion (Fragment *otp4*) (grün in Abb.4.31), eins für eine Expression in Zellen der DM6 Lineage (Fragment *otp5*) (blau in Abb.4.31) und ein weiteres für eine Expression in einem Zellcluster in den Hemisphären (Fragment 6) (gelb in Abb.4.31) identifiziert werden.

#### 4.9 MARCM-Analysen

Otp wird im larvalen Gehirn in mehreren Clustern aus sekundären Neuronen im zentralen Gehirn und in primären und sekundären Neuronen im Ventralganglion exprimiert (4.7.2). Nun sollte bestimmt werden, ob die Neurone in den einzelnen Zellclustern aus einer einzigen oder mehreren Vorläuferzellen entstehen. Dazu macht man sich sogenannte MARCM-Analysen zu Nutze. Unter MARCM (mosaic analysis with a repressible cell marker) versteht man eine genetische Technik bei *Drosophila*, die benutzt wird, um Zellen zu markieren, die aus einer einzigen Vorläuferzelle hervorgehen (Lee und Luo, 1999; Lee und Luo, 2001; Wu und Luo, 2006). Das System erlaubt dabei eine positive Markierung einer kleinen Zellpopulation wildtypischer oder mutanter Zellen. Es kombiniert das UAS-Gal4 System mit dem Gal80-Repressor und dem Flp/FRT-System.

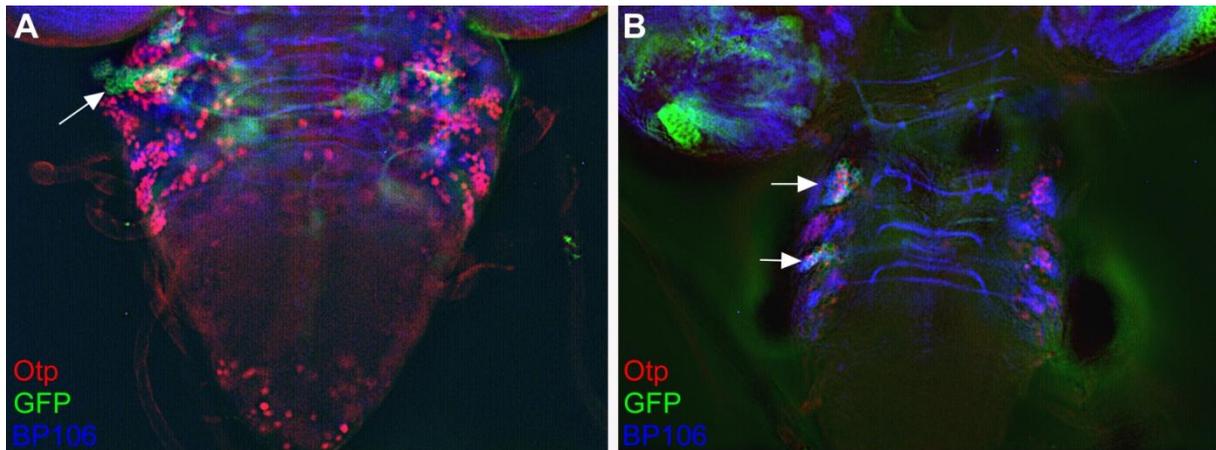
Mit Hilfe des MARCM-Treiberstamms TUG G13 (B. Bello, unveröffentlicht) und dem Stamm FRT G13 (Bl 1956) wurden wildtypische Klone erzeugt (Durchführung siehe 3.2.35). Die Erzeugung der Klone erfolgt dabei zufällig, die Anzahl der Klone kann jedoch durch die Dauer des Hitzeschocks und die Größe der Klone durch den Zeitpunkt des Hitzeschocks beeinflusst werden (Wu und Luo, 2006; Lee und Luo, 2001). Es wurden Doppelfärbungen mit

anti-Otp- und anti-Neurotactin-Antikörpern an diesen Gehirnen durchgeführt. Das GFP bleibt während der Fixierung und Antikörperfärbung stabil, es muss nicht durch eine Antikörperfärbung detektiert werden. Die so behandelten Gehirne wurden nun auf Otp-positive MARCM-Klone im larvalen Gehirn untersucht.



**Abb.4.32. MARCM-Analysen des zentralen Gehirns.** Dargestellt sind fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Doppelfärbungen mit anti-Otp- und anti-BP106-Antikörpern (A-C) sowie eine anti-Otp-Antikörperfärbung (D) an GFP-markierten Wildtyp-MARCM-Klonen larvaler Gehirne des dritten Larvalstadiums. In (B) ist das Gehirn aus (A) in einer anderen Schärfenebene dargestellt. Die Pfeile zeigen auf Otp-positive MARCM-Klone im zentralen Gehirn.

In Abbildung 4.32 sind Antikörperfärbungen von Otp-positiven Klonen im zentralen Gehirn dargestellt. So konnten zwei Otp-positive MARCM-Klone im medialen Bereich identifiziert werden (Abb.4.32.A, B, Pfeile), von denen jeweils alle Neurone des Zellklons Otp-positiv sind. Außerdem konnte ein Otp-positiver Zellklon im medialen Bereich am Übergang vom zentralen Gehirn zum Ventralganglion identifiziert werden (Abb.4.32.C, Pfeil). Auch hier sind alle Neurone des Klons Otp-positiv. Bei dem in Abbildung 4.32.D identifizierten Otp-positiven Zellklon sind dagegen nur ein Teil der Neurone des Klons Otp-positiv.



**Abb.4.33. MARCM-Analysen des Ventralganglions.** Dargestellt sind fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Doppelfärbungen mit anti-Otp- und anti-BP106-Antikörpern an GFP-markierten Wildtyp-MARCM-Klonen larvalen Gehirne des dritten Larvalstadiums. Die Pfeile zeigen auf Otp-positive MARCM-Klone im Ventralganglion.

Auch im Ventralganglion konnten mehrere Otp-positive MARCM-Klone identifiziert werden (Abb.4.33). Im Gegensatz zum zentralen Gehirn konnten hier nur Klone identifiziert werden, von denen nur ein Teil der Neurone Otp-positiv ist. Im Ventralganglion konnten also keine komplett Otp-positiven Lineages nachgewiesen werden.

#### 4.10 Identifizierung und Analyse weiterer Mutanten der 57B Region

Neben der umfassenden Analyse des Homeoboxgens *otp* wurden noch weitere Mutanten der 57B Region analysiert. Die Stämme 3311 und 7272 stammen aus dem gleichen EMS-Mutagenese-Screen der 57B Region wie die *otp*-Allele *otp*<sup>1024</sup> und *otp*<sup>13064</sup> (Karin Psenner, Diplomarbeit 2001), und es sollten nun bestimmt werden, welche Gene in den Stämmen mutiert sind. Die EMS-behandelten Fliegen wurden mit Hilfe des Deletionsstamms Df(2R)E2 (Uemera et al., 1996), bei dem der Bereich 57B1-57B13,14 deletiert ist, auf letale Mutanten im 57B Bereich vorselektiert. Dabei konnten 33 Mutanten in 16 Komplementationsgruppen identifiziert werden.

Bisher konnte bereits eine grobe Zuordnung der Punktmutationen der Stämme 3311 und 7272 durch Komplementationsanalysen erfolgen. So konnte gezeigt werden, dass die Mutationen der Stämme 3311 und 7272 nicht das gleiche Gen betreffen und in einem der folgenden Gene liegen: CG9344, CG15650, CCG9313, CG15651, CG3216, *dgt3* oder *Pros29* (Raffael, 2005). Über weitere Komplementationsanalysen sollte nun eine genaue Zuordnung der Mutantenstämme 3311 und 7272 zu Genen der 57B Region erfolgen.

#### 4.10.1 Komplementationsanalysen der Stämme 3311 und 7272

Mit Hilfe von Komplementationsanalysen ist es wie bereits beschrieben möglich, unbekannte Mutationen eines Fliegenstamms einem bestimmten chromosomalen Bereich (über Deletionen) oder bestimmten Genen (über Mutationen) zuzuordnen zu können.

Da keine Deletionen zur Verfügung stehen, die eine genauere Zuordnung des Stamms 3311 zu einem Gen ermöglichen, sollte dies durch Komplementationsanalysen mit Fliegenstämmen erfolgen, die letale P-Element-Insertionen in einem der in Frage kommenden Gene tragen. Dazu wurden zuerst alle erhältlichen Stämme des Kyoto Stock Centers mit P-Element-Insertionen in einem der in Frage kommenden Gene (CG9344, CG15650, CCG9313, CG15651, CG3216, *dgt3* oder *Pros29*) auf Letalität untersucht. Dabei war nur der Fliegenstamm P{GSV6}GS10771, der eine P-Element-Insertion im Bereich des *Pros29* Gens trägt, letal. Nun wurde untersucht, ob dieser mit dem Stamm 3311 komplementiert.

**Tab.4.7. Komplementationsanalysen zur Identifizierung der Mutation des Stamms 3311.** Aufgeführt sind jeweils die Anzahl der Fliegen mit nach oben gebogenen Flügeln sowie geraden Flügeln in der F<sub>1</sub>-Generation.

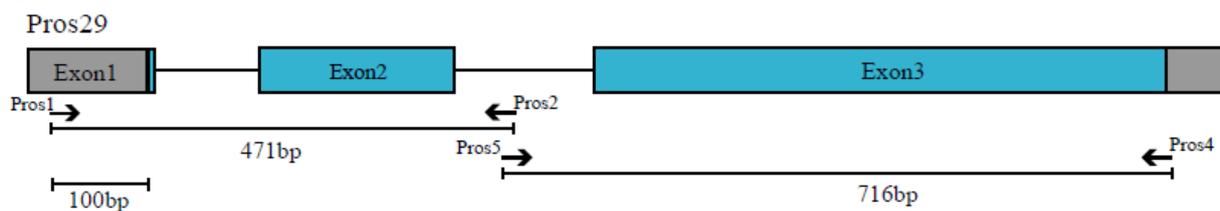
Kreuzung	Anzahl Fliegen mit nach oben gebogenen Flügeln (CyO)	Anzahl Fliegen mit geraden Flügeln	Komplementation
3311 x P{GSV6}GS10771	125	0	Nein

Wie aus Tabelle 4.7 ersichtlich komplementiert der Stamm 3311 nicht mit dem Stamm P{GSV6}GS10771. Bei dem Stamm 3311 handelt es sich also um eine *Pros29*-Mutante, dieser wird im Folgenden als *Pros29*<sup>3311</sup> bezeichnet. Das Gen *Pros29* oder auch *Prosa3* codiert für die Proteasom 29kDa Untereinheit (Haass et al., 1990) und ist an der mitotischen Spindelelongation und Spindelorganisation sowie der Zellproliferation beteiligt (Goshima et al., 2007). Bisher sind fünf Allele bekannt, bei dem RNAi-Allel *Pros29*<sup>dsRNAcGa</sup> konnte eine schwache Veränderung der Ventralfurche nachgewiesen werden (Gong et al., 2004).

In Vorarbeiten konnte bereits gezeigt werden, dass der Fliegenstamm 7272 nicht mit dem Fliegenstamm P{PZ}l(2)07806 komplementiert, der eine letale P-Element-Insertion trägt (Raffael, 2005). Zu diesem Zeitpunkt war im Bereich dieser P-Element-Insertion jedoch kein Gen annotiert, so dass keine Zuordnung zu einem Gen erfolgen konnte. Erst im Flybase Release 5.1 (Flybase Genome Annotators, 2006) wurde in der betreffenden Region das Gen CG34115 annotiert. So konnte rückwirkend *in silico* bestimmt werden, dass der Fliegenstamm 7272 eine Mutation im Gen CG34115 trägt, er wird im Folgenden deshalb als CG34115<sup>7272</sup> bezeichnet. Die Funktion des Gens CG34115 ist bisher unbekannt, es sind keine Allele beschrieben.

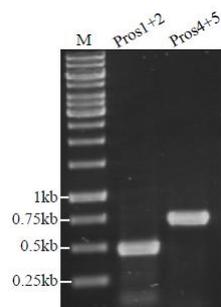
#### 4.10.2 Identifizierung der Punktmutation der Mutante *Pros29*<sup>3311</sup>

Mit Hilfe der Komplementationsanalysen konnte bestimmt werden, dass die Punktmutation des Stamms 3311 im Gen *Pros29* liegt, diese sollte nun molekular nachgewiesen werden. Dazu wurde genomische DNA des Fliegenstamms *Pros29*<sup>3311</sup> isoliert (3.2.16) und die Exons über PCR amplifiziert (3.2.17). In Abbildung 4.34 ist die Exon-Intron-Struktur des Gens *Pros29* sowie die Lage der verwendeten Primer dargestellt. Das Gen besteht aus 3 Exons, die für ein 264 Aminosäuren großes Protein codieren.



**Abb.4.34. Exon-Intron-Struktur des Gens *Pros29*.** Der nicht-translatierte Bereich der Exons ist durch graue, der translatierte durch azurblaue Boxen dargestellt. Darunter sind die Lage der Primer Pros1, 2, 4 und 5 sowie die Größe der amplifizierten Fragmente aufgeführt.

Die Exons 1 und 2 sowie das dazwischen liegende Intron 1 und ein Teil von Intron 2 wurden mit den Primern Pros1 und Pros2 in einem 471bp Produkt amplifiziert, Exon 3 sowie ein Teil von Intron 2 mit den Primer Pros5 und Pros4 in einem 716bp Produkt. Eine gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte ist in Abbildung 4.35 dargestellt.



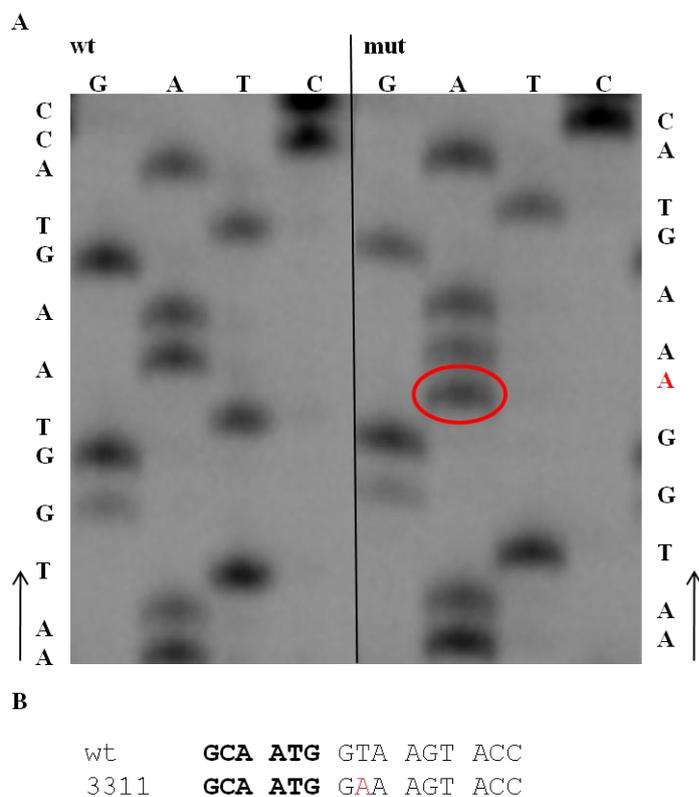
**Abb.4.35. Gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte Pros1+2 und Pros4+5.** 5µl Aliquots der PCR-Produkte wurden in einem 1% Agarosegel aufgetrennt, mit Ethidiumbromid angefärbt und mittels INTAS- Geldokumentationssystem dokumentiert. Spur 1: Gene Ruler 1kb Ladder (Fermentas); Spur 2: PCR-Produkt mit Primern Pros1 + Pros2; Spur 3: PCR-Produkt mit Primern Pros4 + Pros5.

Wie in Abbildung 4.35 ersichtlich, wurde mit den Primern Pros1 und Pros2 neben dem spezifischen 471bp Produkt noch schwach ein unter 200bp großes Nebenprodukt amplifiziert. Mit den Primern Pros4 und Pros5 konnte spezifisch das gewünschte 716bp Produkt ohne Nebenprodukte amplifiziert werden.

Die PCR-Produkte wurden aufgereinigt (3.2.4), in den Vektor pCR<sup>®</sup>II-TOPO<sup>®</sup> kloniert (3.2.8) und jeweils 20 positive Klone mit den markierten Primern TAR (IRDye 800) und TAU (IRDye 700) sequenziert (3.2.18). Da es sich bei den Fliegen des Stamms *Pros29*<sup>3311</sup>

ausschließlich um heterozygote Tiere handelt, wurden während der PCR-Reaktion sowohl mutierte als auch wildtypische Amplifikate des *Pros29*-Gens hergestellt. Eine Sequenzveränderung aufgrund der Punktmutation sollte also in 50% der Klone auftreten. Tritt eine Mutation in nur einem Klon auf, so ist die Wahrscheinlichkeit sehr gering, dass es sich dabei um die gesuchte Mutation handelt; es handelt sich eher um einen Fehler der *Taq*-Polymerase während der Amplifikation. Des Weiteren können auch Polymorphismen in der Sequenz auftreten.

In 55% der Klone (11 von 20) konnte eine Punktmutation der zweiten Base des ersten Introns von T nach A nachgewiesen werden. In Abbildung 4.36 ist ein Ausschnitt aus einem Sequenziergel mit wildtypischer und mutierter Sequenz dargestellt.

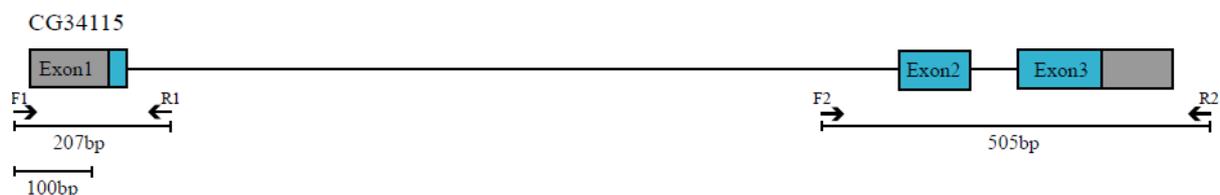


**Abb.4.36. Identifizierung der Punktmutation des Stamms *Pros29*<sup>3311</sup>.** (A) Ein Ausschnitt aus einem Sequenziergel zur Identifizierung der Punktmutation des Stamms *Pros29*<sup>3311</sup>. Zu sehen sind die wildtypische Sequenz (Spuren 1-4) und die mutierte Sequenz (Spuren 5-8). Die Stelle des Basenaustauschs ist durch rote Umkreisung der Banden hervorgehoben, die Pfeile zeigen die Leserichtung der Sequenz. (B) Wildtypische und mutierte Sequenz im Bereich der Mutation. Die Sequenz von Exon 1 ist fettgedruckt, die von Intron 1 normalgedruckt. Die ausgetauschte Base ist rot markiert.

Im Bereich der Mutation befindet sich die hoch konservierte Consensus-Sequenz der Spleiß-Donorstelle, die ersten beiden Basen eines Introns der ungespleißten mRNA sind invariant (GT). Die Mutation in diesem essenziellen Bereich der Spleiß-Donorstelle führt also dazu, dass das Intron 1 nicht gespleißt werden kann.

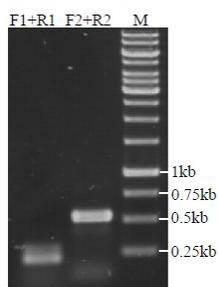
### 4.10.3 Identifizierung der Punktmutation der Mutante CG34115<sup>7272</sup>

Mit Hilfe der Komplementationsanalysen konnte bestimmt werden, dass die Punktmutation des Stamms 7272 im Gen CG34115 liegt, dies sollte nun ebenfalls molekular nachgewiesen werden. Dazu wurde genomische DNA des Fliegenstamms CG34115<sup>7272</sup> isoliert (3.2.16) und die Exons über PCR amplifiziert (3.2.17). In Abbildung 4.37 ist die Exon-Intron-Struktur des Gens CG34115 sowie die Lage der verwendeten Primer dargestellt. Das Gen CG34115 besteht aus 3 Exons, die für ein aus 77 Aminosäuren bestehendes Protein codieren.



**Abb.4.38. Exon-Intron-Struktur des Gens CG34115.** Der nicht-translatierte Bereich der Exons ist durch graue, der translatierte durch azurblaue Boxen dargestellt. Darunter sind die Lage der Primer CG34115-F1, R1, F2 und R2 sowie die Größe der amplifizierten Fragmente aufgeführt.

Exon 1 wurde mit den Primern CG34115-F1 und CG34115-R1 in einem 207bp Produkt amplifiziert, die Exons 2 und 3 sowie das dazwischen liegende Intron mit den Primer CG34115-F2 und CG34115-R2 in einem 505bp Produkt. Eine gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte ist in Abbildung 4.39 dargestellt.



**Abb.4.39. Gelelektrophoretische Auftrennung der PCR Produkte CG34115-F1+R1 und CG34115-F2+R2.** 5µl Aliquots der PCR-Produkte wurden in einem 1% Agarosegel aufgetrennt, mit Ethidiumbromid angefärbt und mittels INTAS-Geldokumentationssystem dokumentiert. Spur 1: PCR-Produkt mit Primern CG34115-F1 + CG34115-R1; Spur 2: PCR-Produkt mit Primern CG34115-F2 + CG34115-R2; Spur 3: Gene Ruler 1kb Ladder (Fermentas).

Wie in Abbildung 4.39 ersichtlich, wurde mit den Primern CG34115-F2 und CG34115-R2 neben dem spezifischen 505bp Produkt noch schwach ein unter 200bp großes Nebenprodukt amplifiziert. Mit den Primern CG34115-F1 und CG34115-R1 konnte das gewünschte 217bp Produkt amplifiziert werden, bei genauerer Analyse handelt es sich bei dem PCR-Produkt jedoch um eine Doppelbande mit einer etwas stärkeren kleineren und einer etwas schwächeren größeren Bande. Worauf dies zurückzuführen ist, wird weiter unten näher erläutert. Da jedoch zuerst nicht ersichtlich war, bei welcher der Banden es sich um die

gewünschte Bande handelt, wurde das PCR-Produkt direkt (ohne Aufreinigung über ein Gel) für die TOPO-Klonierung eingesetzt.

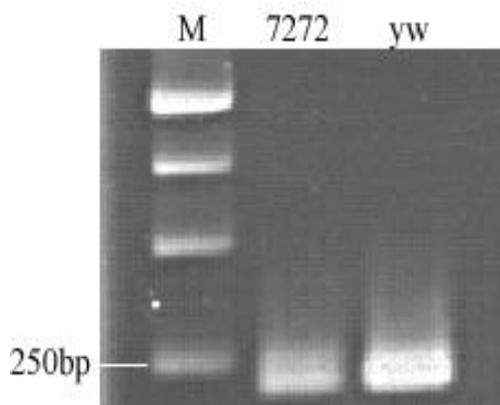
Die PCR-Produkte wurden in den Vektor pCR®II-TOPO® kloniert (3.2.8) und jeweils 20 positive Klone mit den markierten Primern TAR (IRDye 800) und TAU (IRDye 700) sequenziert (3.2.18). Da es sich bei den Fliegen des Stamms CG34115<sup>7272</sup> ausschließlich um heterozygote Tiere handelt wurden während der PCR-Reaktion sowohl mutierte als auch wildtypische Amplifikate des Gens CG34115 hergestellt, eine Sequenzveränderung aufgrund der Punktmutation sollte also wie bereits beschrieben in 50% der Klone auftreten.

In 80% der Klone (16 von 20) konnte in Exon 1 ein Basenaustausch der zweiten Base des Startcodons (ATG) von T nach C nachgewiesen werden. In den anderen 20% der Klone konnte ebenfalls eine von der wildtypischen Sequenz abweichende Sequenz nachgewiesen werden. In der untranslatierten Region von Exon 1 konnte eine Insertion von neun Basen (TATATACC; A) sowie ein Basenaustausch (A nach C) nachgewiesen werden. Dabei handelt es sich um einen Polymorphismus in der Sequenz des Balancerchromosoms, dieser Sequenzaustausch konnte auch bei einem anderen mit diesem Balancerchromosom balancierten Fliegenstamm nachgewiesen werden (nicht gezeigt). In Abbildung 4.40 ist ein Ausschnitt aus einem Sequenziergel mit der Sequenz des Balancerchromosoms und der mutierten Sequenz dargestellt.



Es sollte nun untersucht werden, wie es zu dem ungewöhnlichen Verhältnis von mutierten zu wildtypischen Klonen von 80% zu 20% kommt. Durch den Polymorphismus beim Balancerchromosom ist das Amplifikat von Exon 1 neun Basen länger und sollte auch im Agarosegel zu unterscheiden sein.

Hiermit war also eine Erklärung für die oben beschriebene Doppelbande bei der PCR-Amplifikation genomischer DNA des Stamms CG34115<sup>7272</sup> mit den Primern CG34115-F1 und CG34115-R1 gefunden (Abb.4.39). Es sollte nun überprüft werden, ob es bei einer Amplifikation genomischer DNA von *yw* Fliegen auch zur Amplifikation einer Doppelbande kommt.



**Abb.4.41. Gelelektrophoretische Auftrennung der PCR Amplifikate CG34115-F1+R1 genomischer DNA aus CG34115<sup>7272</sup> Fliegen und *yw* Fliegen.** 5µl Aliquots der PCR-Produkte wurden in einem 1% Agarosegel aufgetrennt, mit Ethidiumbromid angefärbt und mittels INTAS-Gel-dokumentationssystem dokumentiert. Spur 1: Gene Ruler 1kb Ladder (Fermentas); Spur 2: PCR-Amplifikat mit den Primern CG34115-F1+CG34115-R1 genomischer DNA aus CG34115<sup>7272</sup> Fliegen; Spur 3: PCR-Amplifikat mit den Primern CG34115-F1 + CG34115-R1 genomischer DNA aus *yw* Fliegen.

Wie in Abbildung 4.41 zu sehen, kommt es bei genomischer DNA aus *yw* Fliegen nur zur Amplifikation einer starken Bande, während bei genomischer DNA aus 7272 Fliegen die oben beschriebene Doppelbande nachgewiesen werden kann.

Da das größere Produkt schwächer amplifiziert wird, wird dieses auch in geringeren Anteilen in den TOPO-Vektor kloniert und somit lässt sich das ungleiche Verhältnis der Klone erklären.

#### 4.10.4 Letalitätsanalysen der Mutanten *Pros29*<sup>3311</sup> und CG34115<sup>7272</sup>

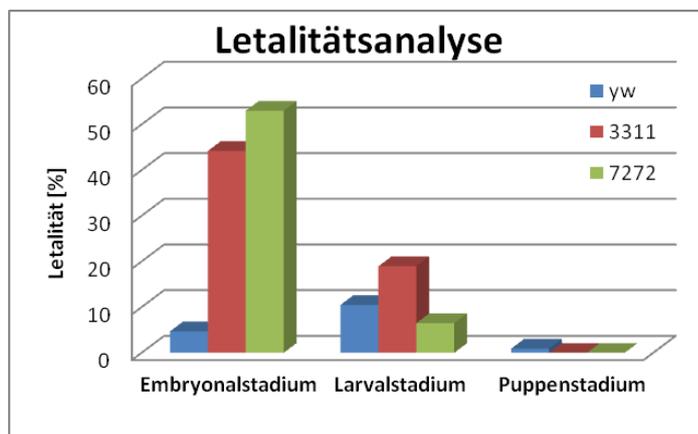
Nachdem die Punktmutation der Stämme *Pros29*<sup>3311</sup> und CG34115<sup>7272</sup> identifiziert werden konnte, sollten bestimmt werden, in welchem Entwicklungsstadium homozygot mutante Tiere der Stämme absterben. Die Bestimmung des Letalitätszeitpunktes erfolgt dabei durch Auszählen von Embryonen und den sich daraus entwickelnden Larven, Puppen und adulten Fliegen. Das Ergebnis der Letalitätsanalyse ist in Tabelle 4.8 und in Abbildung 4.42

dargestellt. Die Werte des Stamms *yw*, der keinerlei Letalitätsfaktoren trägt, diene als Negativkontrolle.

**Tabelle 4.8. Letalitätsanalyse der Stämme *Pros29*<sup>3311</sup> und *CG34115*<sup>7272</sup> im Vergleich zum Stamm *yw*.** Aufgeführt sind die Anzahl der ausgezählten Embryonen, Larven, Puppen und Fliegen.

Fliegenstamm	<i>yw</i>	<i>Pros29</i> <sup>3311</sup>	<i>CG34115</i> <sup>7272</sup>
Anzahl Embryonen	200	190	200
Anzahl Larven	191	106	94
Anteil Larven [%]	95,5%	55,8%	47%
Anzahl Puppen	171	70	81
Anteil Puppen [%]	85,5%	36,8%	40,5%
Anzahl Fliegen	169	70	81
Anteil Fliegen [%]	84,5%	36,8%	40,5%

Bei den Letalitätsraten der Stämme *Pros29*<sup>3311</sup> und *CG34115*<sup>7272</sup> muss dabei beachtet werden, dass die Stämme heterozygot über einem Balancer gehalten werden. Das bedeutet, dass nur 25% der Tiere homozygot für die Mutation sind, weitere 25% sind homozygot für das Balancerchromosom und die restlichen 50% sind heterozygot für die Mutation. Da Balancerchromosomen homozygot letal sind ergibt sich somit schon eine Letalitätsrate von mindestens 25%. Von embryonaler Letalität eines Stammes spricht man daher, wenn 50% der Tier bereits im Embryonalstadium absterben. Diese Anzahl entspricht dann allen Tieren die homozygot für den Balancer oder die Mutation sind.



**Abb.4.42. Letalitätsanalyse der Stämme *Pros29*<sup>3311</sup> und *CG34115*<sup>7272</sup> im Vergleich zu *yw*.** Dargestellt sind die prozentualen Letalitätsraten der Stämme *yw* (blaue Balken), *Pros29*<sup>3311</sup> (rote Balken) und *CG34115*<sup>7272</sup> (grüne Balken) im Embryonal-, Larval- und Puppenstadium.

Bei dem Stamm *Pros29*<sup>3311</sup> kann der Letalitätszeitpunkt nicht eindeutig bestimmt werden. Ungefähr 44% der Tiere sterben im Embryonalstadium, dies entspricht den meisten, jedoch nicht allen Tieren die homozygot für die Mutation sind. Die larvale Letalität von 18,95% liegt auch deutlich höher als wildtypische Letalitätsraten. Der Letalitätszeitpunkt des Stamms

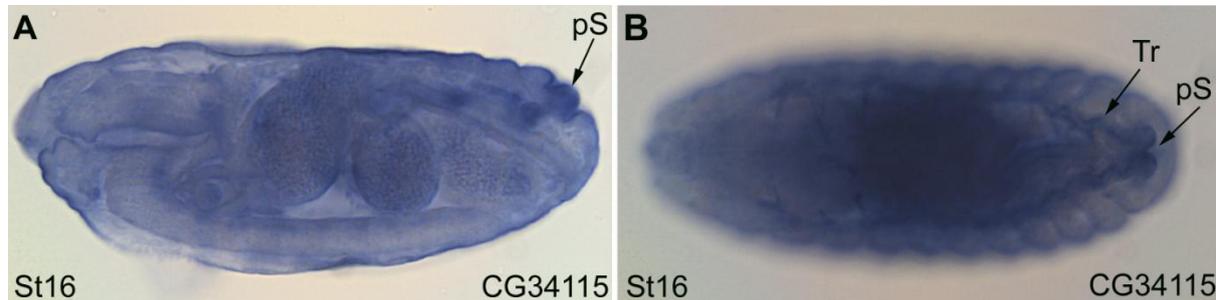
*Pros29*<sup>3311</sup> liegt also am Übergang zwischen dem Embryonal- und dem Larvalstadium, die meisten homozygoten Tiere sterben im Embryonalstadium, ein Teil jedoch erst im Larvalstadium.

Der Stamm CG34115<sup>7272</sup> ist eindeutig embryonal letal. 53% der Embryonen sterben, d.h. nur heterozygote Tiere kommen ins Larvenstadium. Die larvale Letalität von 6,5% entspricht dabei wildtypischen Letalitätswerten und kann vernachlässigt werden, die pupale Letalität beträgt 0%.

#### 4.10.5 Das embryonale Expressionsmuster von CG34115

Da über das Expressionsmuster von CG34115 bisher nichts bekannt war, sollte dies im Folgenden bestimmt werden. Dazu wurden *in situ* Hybridisierungen mit Dig-markierten DNA-Sonden an *yw* Embryonen durchgeführt (3.2.22). Zur Sondenherstellung wurde der komplette genomische Bereich des Gens CG34115 mit den Primern CG34115-F1 und CG34115-R2 (siehe 4.9.4) in einem 1.5kb PCR-Produkt amplifiziert (3.2.17) und zur Sondenmarkierung eingesetzt (3.2.19).

In Abbildung 4.43 sind die *in situ* Hybridisierungen dargestellt.



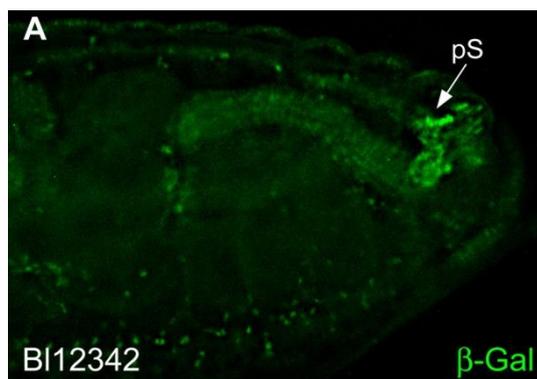
**Abb.4.43.** *In situ* Hybridisierungen von *yw* Embryonen mit einer Dig-markierten CG34115-Sonde. (A) Seitenansicht eines Embryos in Stadium 16. (B) Dorsalansicht auf einen Embryo im Stadium 16. In allen Bildern ist anterior links. Es handelt sich um lichtmikroskopische Aufnahmen. Abk.: pS: posteriore Spirakel; Tr.: Tracheen.

Durch *in situ* Hybridisierungen konnte nachgewiesen werden, dass keine Expression von CG34115 in frühen Stadien der Embryonalentwicklung stattfindet (nicht gezeigt). Wie in Abbildung 4.43 zu sehen, wird die mRNA des Gens CG34115 erst gegen Ende der Embryonalentwicklung exprimiert, und zwar im Stadium 16 spezifisch in den posterioren Spirakeln (Abb.4.43.A, B, Pfeil). Als Spirakel werden bei Insekten die Öffnungen der Tracheen bezeichnet. In Abbildung 4.43.B, in der eine Dorsalansicht eines Embryos im Stadium 16 dargestellt ist, kann man erkennen, dass die posterioren Spirakel mit den Tracheen verbunden sind. Die Larve von *Drosophila* besitzt nur zwei funktionale Spirakelpaare, die

anterioren im ersten Thoraxsegment (T1) und die posterioren im achten Abdominalsegment (A8). Da die anterioren Spirakel aber erst in späten Larvalstadien funktional werden, findet der gesamte Gasaustausch der jungen Larve über die posterioren Spirakel statt (Manning und Krasnow, 1993). Die Bildung der posterioren Spirakel beginnt in Stadium 11 der Embryonalentwicklung und ist in Stadium 16 abgeschlossen (Hu und Castelli-Gair, 1999). Das Gen CG34115 wird also erst gegen Ende der Entwicklung der posterioren Spirakel in diesen exprimiert.

Der Fliegenstamm Bl 12342 (P{PZ}1(2)07806) trägt eine letale P-Element Insertion im Bereich des Gens CG34115. Bei dem P-Element handelt es sich um ein Enhancer-Trap-Element mit dem lacZ Gen als Reporter. Im Folgenden sollte dieser Stamm nun auf eine Reportergenexpression untersucht werden und diese mit dem mRNA-Muster des Gens CG34115 verglichen werden.

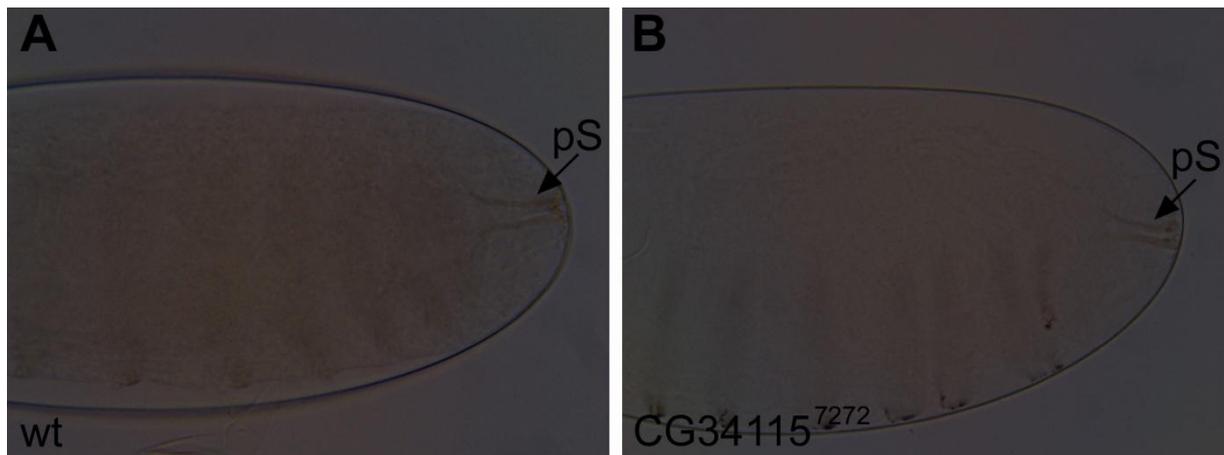
In Abbildung 4.44 ist eine Antikörper-Färbung mit anti- $\beta$ -Galaktosidase-Antikörpern an Bl 12342 Embryonen dargestellt.



**Abb.4.44. Anti- $\beta$ -Galaktosidase-Antikörperfärbung eines Embryos des Stamms Bl 12342 im Stadium 16.** Es kann eine  $\beta$ -Gal-Expression in den posterioren Spirakeln (pS) nachgewiesen werden (Pfeil). Es handelt sich um eine Seitenansicht, anterior liegt links.

Wie in Abbildung 4.44 ersichtlich konnte eine Reportergenexpression in den posterioren Spirakeln nachgewiesen werden.

Nachdem nun analysiert war, in welchen Strukturen CG34115 exprimiert wird, sollte nun die Mutante CG34115<sup>7272</sup> auf Veränderung dieser Struktur untersucht werden. Die posterioren Spirakel sind eine ektodermale Struktur, die aus zwei Teilen aufgebaut ist: der Spirakelkammer und der Stigmatophore. Es sollte also untersucht werden, ob in homozygoten CG34115<sup>7272</sup> Embryonen eine Veränderung der Spirakelkammer oder der Stigmatophoren nachgewiesen werden kann. Dazu wurden Kutikulapräparationen durchgeführt (3.2.27).



**Abb.4.45. Kutikulapräparationen.** Dargestellt sind lichtmikroskopische Aufnahmen von Kutikulatpräparationen von Wildtyp- (A) und homozygoten  $CG34115^{7272}$  Embryonen (B). In allen Bildern ist anterior links, dorsal oben. Abk.: pS: posteriore Spirakel.

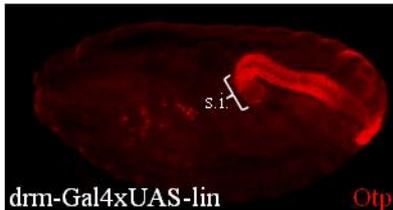
Es konnte keine phänotypische Veränderung der Spirakelkammer oder der Stigmatophoren in homozygoten  $CG34115^{7272}$  nachgewiesen werden (Abb.4.45.A-B). Es konnte bei den Mutanten also kein sichtbarer Defekt der posterioren Spirakel gezeigt werden.

## 5. Diskussion

### 5.1 Unterschiede zwischen dem Expressionsmuster von *otp* und *byn* im Enddarm

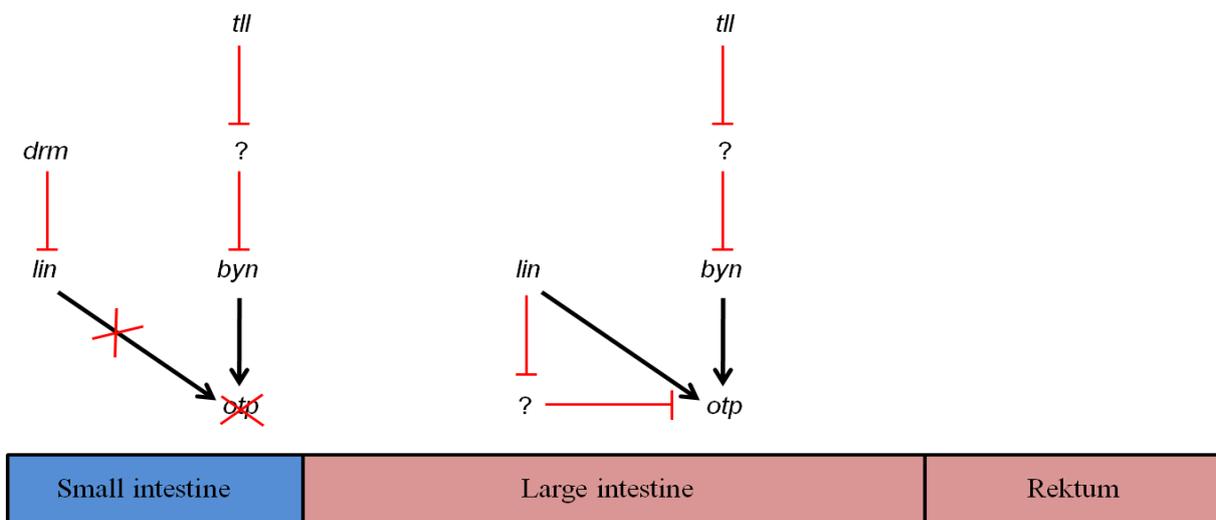
Im Rahmen dieser Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass *otp* im Gegensatz zum T-Box-Gen *brachyenteron* (*byn*) nicht im gesamten embryonalen Enddarm exprimiert wird, sondern ausschließlich im „large intestine“, im Rektum und in den Analplatten (4.1.2.1). Im „small intestine“, dem am weitesten anterior gelegen Teil des Enddarms, findet dagegen eine *byn* Expression statt, ohne dass *otp* dort exprimiert wird (4.1.2.1). Es war jedoch bereits nachgewiesen worden, dass *byn* ausreichend ist, um eine *otp*-Expression zu induzieren und dass eine Überexpression von *byn* mit Hilfe des UAS-Gal4-Systems im Vorderdarm zu einer ektopischen *otp*-Expression führt (Kusch et al., 2002). Somit wäre zu vermuten gewesen, dass in allen Geweben, in denen *byn* exprimiert wird, auch eine *otp*-Expression stattfindet. Da dies so nicht gezeigt werden konnte, gibt es vermutlich neben *byn* noch mindestens ein weiteres Gen, welches an der Regulation der *otp*-Expression im Enddarm beteiligt ist. Als mögliches Kandidatengen hierfür konnte *lines* (*lin*) identifiziert werden (4.6), da es in *lin*-Mutanten nach Stadium 10 zu einem Verlust der *otp*-Expression im Enddarm kommt (Iwaki et al., 2001; 4.6), während *byn* im Enddarm der Mutanten exprimiert wird (Iwaki et al., 2001). *Lin* codiert ein Pionier-Protein ohne bisher bekannte Domänen, welches global im Embryo exprimiert wird und als transkriptioneller Regulator zu wirken scheint (Hatini et al., 2000). Das Zink-Finger-Protein *drumstick* (*drm*) wird spezifisch im „small intestine“ Primordium exprimiert (Iwaki et al., 2001) und wirkt dort antagonistisch zu *lin* (Green et al., 2002). Dabei hat *drm* keinen Einfluss auf die Transkription von *lin* sondern wirkt über eine Protein-Protein-Bindung (Green et al., 2002). Die Aufhebung der Wirkung von *lin* durch *drm* im „small intestine“ wäre eine mögliche Erklärung für das Fehlen der *otp*-Expression in diesem Bereich des Enddarms. Dies widerspricht nicht den oben beschriebenen Ergebnissen von Kusch et al., dass eine ektopische Expression von *byn* im Vorderdarm eine *otp*-Expression induzieren kann. Da *lin* im Embryo global exprimiert wird und nur in wenigen Geweben durch *drm* antagonisiert wird, kann überall dort wo *lin* aktiv ist auch eine ektopische *otp*-Expression durch *byn* induziert werden. Dies würde auch bedeuten, dass es möglich sein sollte, eine ektopische *otp*-Expression in allen Geweben, in denen *byn* exprimiert wird, durch *lin* zu induzieren. So konnte nachgewiesen werden, dass eine Überexpression von *lin* mit Hilfe von *drm*-Gal4 im „small intestine“ zu einer ektopischen *otp*-Expression führt (Abb.5.1). Durch die Überexpression wird die Menge des Lin-Proteins im Vergleich zur Menge des Drm-Proteins im „small intestine“ deutlich erhöht, so dass die Menge von Drm nicht ausreichend ist, um die

Wirkung von Lin aufzuheben. *Otp* liegt also downstream von *lin*. Wie genau *lin* dabei auf *otp* wirkt ist unbekannt, bisher konnten verschiedenste Wirkungen von *lin* auf Zielgene nachgewiesen werden. So wird Lin benötigt, damit Abdominal-B (ABD-B) seine Zielgene aktivieren kann, es scheint dabei als post-translationeller Modifikator oder als Co-Faktor zu wirken (Castelli-Gair, 1998). Auf die Funktion des Zink-Finger-Proteins Bowl wirkt Lin dagegen reprimierend über eine Protein-Protein-Bindung (Hatini et al., 2005).



**Abb.5.1. Ektopische Expression von *otp* durch *lin*.** Dargestellt ist eine fluoreszenzmikroskopische Aufnahme einer anti-Otp-Antikörperfärbung eines *drm-Gal4xUAS-lin* Embryos. Abk. si: „small intestine“.

Es konnte also nachgewiesen werden, dass für die *otp*-Expression im Enddarm sowohl *byn* als auch *lin* benötigt werden. In Abbildung 5.2 ist die Regulation von *otp* im Enddarm schematisch zusammengefasst. Im „large intestine“ und Rektum wird *otp* durch *byn* aktiviert, das wiederum über *tailless (tll)* reguliert wird. *Tll* codiert für einen nukleären Rezeptor mit Repressorfunktion (Moran und Jimenez, 2006), eine Aktivierung von *byn* kann also nur über die Hemmung eines bisher nicht identifizierten Repressors erfolgen. Da *lin* sowohl als Repressor als auch als Aktivator dienen kann (Green et al., 2002), ist sowohl eine direkte Aktivierung von *otp* durch *lin* denkbar, als auch eine indirekte Regulation über die Repression eines bisher nicht identifizierten Repressors. Im „small intestine“ findet keine *otp*-Expression statt. Dort wird die Wirkung von *lin* durch *drm* gehemmt, *byn* allein reicht nicht aus, um eine *otp*-Expression von zu aktivieren.



**Abb.5.2. Regulation von *otp* im Enddarm.**

## 5.2 Enddarmphänotyp der *otp*-Mutanten im Vergleich zu anderen Enddarmmutanten

Die Hauptursache des verkürzten Enddarms bei *otp*-Mutanten ist der fast vollständige Verlust des „large intestine“ (4.2.2; 4.2.4). *byn*-Mutanten zeigen einen ähnlich stark verkürzten Enddarm, bei dem das „large intestine“ degeneriert ist (Kispert et al., 1994; Murakami et al., 1995; Singer et al., 1996; Lengyel und Iwaki, 2002). Außerdem konnte sowohl in *byn*- als auch in *otp*-Mutanten ein Verlust der *engrailed*- (*en*-) Expression im dorsalen Bereich des „large intestine“ nachgewiesen werden (Singer et al., 1996; 4.2.4). Da *en* für die Bildung der „boundary cells“ benötigt wird (Takashima und Murakami, 2001), ist dies eine Erklärung für das Fehlen dieser Zellen in den *otp*-Mutanten. Dieser weitgehend übereinstimmende Enddarmphänotyp der *byn*- und *otp*-Mutanten deutet darauf hin, dass der Phänotyp der *byn*-Mutanten auf einen Verlust der *otp*-Expression im Enddarm zurückzuführen ist. Dafür spricht auch, dass sowohl bei *byn*-Mutanten als auch bei *otp*-Mutanten im Enddarm Apoptose nachgewiesen werden konnte (Singer et al., 1996; 4.2.5). Auch *lin*-Mutanten zeigen einen verkürzten Enddarm, dem das „large intestine“ sowie die „boundary cells“ komplett fehlen (Iwaki et al., 2001). Der Enddarm ist mit ~50% der wildtypischen Länge jedoch nicht so stark reduziert wie der in *otp*-Mutanten, was darauf zurückzuführen ist, dass das „small intestine“ in *lin* Mutanten vergrößert ist (Iwaki et al., 2001). Der Enddarmphänotyp von *lin*-Mutanten scheint also nicht ausschließlich durch den Verlust der *otp*-Expression im Enddarm nach Stadium 10 verursacht zu werden.

## 5.3 Mögliche Funktion von *otp* im larvalen und adulten Enddarm

Im Rahmen dieser Arbeit konnte neben der essenziellen Funktion von *otp* für die embryonale Enddarmentwicklung auch nachgewiesen werden, dass *otp* im larvalen und adulten Enddarm exprimiert wird (4.4; 4.5). Die Expression findet dabei in allen Zellkernen der polyploiden Enterozyten des Ileums, die der Absorption von Wasser und Ionen dienen (Fox und Spradling, 2009), sowie in den Zellen des Rektums statt. Es ist also zu vermuten, dass *otp* auch eine Funktion im larvalen und adulten Enddarm spielt. Da die *otp*-Mutanten jedoch embryonal letal sind, konnte in diesen nicht untersucht werden, ob ein Verlust der *otp*-Expression im larvalen und adulten Enddarm zu Veränderungen führt. Um die Funktion von *otp* im larvalen und adulten Enddarm zu untersuchen, könnte man sich Mosaik-Analysen zu Nutze machen, bei denen homozygot mutante Zellklone in einem wildtypischen Hintergrund erzeugt werden können.

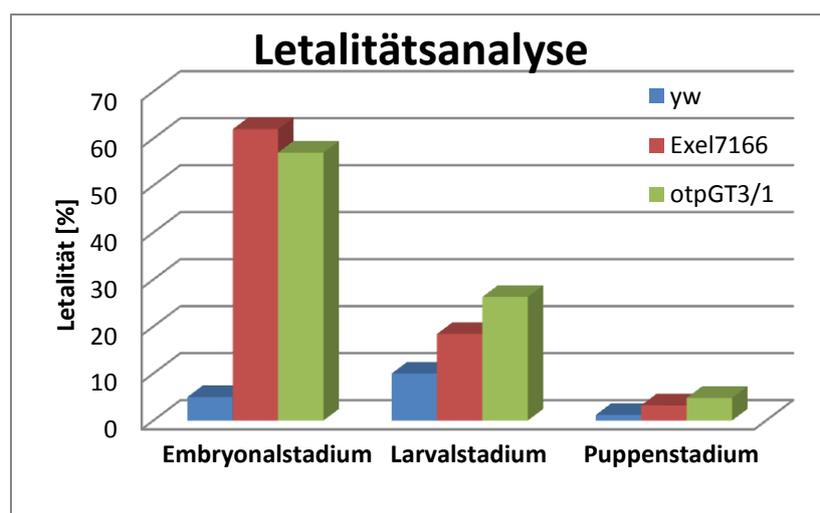
Im intestinalen Trakt von Säugern sorgt eine Population von sich selbst erneuernden intestinalen Stammzellen (ISCs) dafür, dass alte Zellen fortlaufend durch neu produzierte

Zellen ersetzt werden. Die Selbsterneuerung, Amplifizierung und Differenzierung der ISCs findet dabei in sogenannten Krypten statt (Crosnier et al., 2006). Der adulte Enddarm von *Drosophila* wurde kürzlich als eine einzige riesige Krypte mit einem anterioren Ring aus sich selbst erneuernden Stammzellen beschrieben (Takashima et al., 2008). In einer anderen Veröffentlichung konnte jedoch widerlegt werden, dass es aktive Stammzellen im adulten Enddarm von *Drosophila* gibt. Vielmehr handelt es sich um im Ruhezustand befindliche Stammzellen, die an einer Stress-induzierten Gewebereparatur beteiligt sind (Fox und Spradling, 2009). In den Zellen des anterioren Rings findet keine *otp*-Expression statt, es wäre also möglich, dass *otp* im larvalen und adulten Enddarm eine Rolle bei der Ausdifferenzierung von Zellen spielt.

#### 5.4 Erhöhte Letalitätsraten der „Gene Targeting“ Mutante *otp*<sup>GT3/1</sup>

Bei den beiden EMS-Mutanten *otp*<sup>1024</sup> und *otp*<sup>13064</sup> konnte eine embryonale Letalität nachgewiesen werden (Bach, 2005; 4.3.4). Auch die neu erzeugte „Gene Targeting“ Mutante *otp*<sup>GT3/1</sup> zeigt ähnliche embryonale Letalitätswerte (4.3.4). Daneben ergibt sich eine um ~20% erhöhte larvale Letalität im Vergleich zu den EMS-Mutanten, d.h. auch heterozygote Tiere sterben im Laufe der Entwicklung. Insgesamt erreichen sogar nur 30% statt der erwarteten 50% der Tiere das Adultstadium, bei den EMS-Mutanten sind es dagegen zwischen 38 und 46.5%. Dafür kommen mehrere Erklärungen in Frage. Zu einem könnte es sich um ein im Vergleich zu den EMS-Mutanten besonders starkes *otp*-Allel handeln. Da bei beiden EMS-Mutanten die Punktmutation nicht identifiziert werden konnte, kann auch nicht sicher gesagt werden, ob es sich dabei um Null-Allele handelt, der Verlust der Proteinexpression spricht jedoch dafür. Außerdem entspricht der Stamm *otp*<sup>GT3/1</sup> phänotypisch den beiden EMS-Mutanten, dies spricht dafür, dass es sich um vergleichbar starke Allele handelt (4.3.4).

Wenn es auch in heterozygoten Tieren zu einer Beeinträchtigung kommt, es sich also um eine sogenannte Haploinsuffizienz handelt, müssten die erhöhten Werte bei der larvalen Letalität auch bei Deletionen auftreten, in denen der Bereich des *otp*-Gens deletiert ist. Daher wurde die Deletion Exel7166 auf ihre Letalität untersucht. Bei der Deletion Exel7166 ist ein ~110kb großer Bereich zwischen der 57B3 und der 57B5 Region deletiert, der die Gene *Ipk1*, *CG9236*, *otp*, *CG9235*, *drx*, *Act57B*, *CG33704*, *hbn*, *CG15649*, *CG34115*, *CG9344*, *CG15650*, *CG9313*, *CG15651* und *CG3216* beinhaltet. In Abbildung 5.3 ist das Ergebnis der Letalitätsanalyse der Deletion Exel7166 im Vergleich zum Fliegenstamm *yw* und der „Gene Targeting“ Mutante *otp*<sup>GT3/1</sup> dargestellt.



**Abb.5.3. Graphische Darstellung der Letalität der Stämme Exel7166 und  $otp^{GT3/1}$  im Vergleich zum  $yw$ -Stamm.** Dargestellt ist die Letalität [%] in den verschiedenen Entwicklungsstadien (Embryonal-, Larval- und Puppenstadium) der Stämme  $yw$  (blauer Balken), Exel7166 (roter Balken) und  $otp^{GT3/1}$  (grüner Balken).

Die Deletion Exel7166 zeigt eine embryonale Letalität von 62%, es sterben also auch heterozygote Tiere im Embryonalstadium. Auch die larvale Letalität ist im Vergleich zum Wildtyp mit 18% deutlich erhöht. Insgesamt erreichen wie bei der „Gene Targeting“ Mutante  $otp^{GT3/1}$  nur 30% der Tiere das Adultstadium. Dies würde dafür sprechen, dass sich im Bereich der Deletion Exel7166 haploinsuffiziente Gene befinden. *Drosophila* zeigt jedoch eine beeindruckende Toleranz gegenüber Aneuploidie und Fliegen, die heterozygot für Deletionen von über 100kb sind, zeigen normalerweise keinen offensichtlichen dominanten Phänotyp (Marygold, 2007). Die meisten haploinsuffizienten Loci bei *Drosophila* codieren für zytoplasmatische ribosomale Proteine (CRPs) und keines dieser 64 haploinsuffizienten Gene liegt im Bereich der Deletion Exel7166 (Marygold et al., 2007). Auch kein anderes bereits identifiziertes haploinsuffizientes Gen liegt in diesem Bereich, es ist also unwahrscheinlich, dass sich im Bereich der Deletion Exel7166 ein haploinsuffizienter Locus befindet.

Eine andere Erklärung der erhöhten Letalitätsraten wäre, dass durch die Insertion des *white*-Gens im *otp*-Gen beim „Gene Targeting“ Abstände zwischen regulatorischen Elementen und zugehörigen Genen verändert wurden und somit nicht der Funktionsverlust des *otp*-Gens für die erhöhte larvale Letalität verantwortlich ist. Um das zu überprüfen, müsste man das 3.5kb große *white*-Gen, das von loxP-Stellen flankiert ist, mit Hilfe der Cre-Rekombinase entfernen und die Letalität des neu entstandenen Stamms überprüfen. Zeigt dieser keine erhöhte larvale Letalität, so liegt die Ursache in der Veränderung der Abstände zwischen regulatorischen Elementen und den zugehörigen Genen.

## 5.5 Mögliche Ursache des Unterschieds zwischen der *otp*-mRNA und Otp-Protein-expression im ventralen Nervensystem

Im Embryo wird die *otp*-mRNA entlang des gesamten ventralen Nervensystems in Neuronen exprimiert, dabei zeigen die drei Thorakal- und die ersten beiden Abdominal-Segmente eine starke *otp*-Expression und die Abdominal-Segmente 3-8 eine schwache *otp*-Expression. Eine Otp-Proteinexpression findet dagegen nur in den drei Thorakal- und den beiden ersten Abdominal-Segmenten statt (4.1.2.2). Die *otp*-Expression im ventralen Nervensystem des *Drosophila* Embryos muss also einer post-transkriptionellen Regulation unterliegen.

Dies könnte z.B. durch microRNAs (miRNAs) erfolgen, die als Schlüsselmoleküle der sequenzspezifischen post-transkriptionellen Regulation dienen. Unter miRNAs versteht man kurze 21-23 Nukleotide lange, nicht-codierende RNAs, die aus einem Arm einer Haarnadel-ähnlichen 60-100 Nukleotide langen Vorläufer miRNA, der sogenannten pre-miRNA, gebildet werden. Die pre-miRNA wird aus einer primären pri-miRNA gebildet, die durch die RNA-PolymeraseII vom miRNA Gen transkribiert wird (Bartel, 2004). Die essenziellen Schritte der miRNA-Reifung werden dabei durch die beiden RNA-Endonukleasen DROSHA (pri-miRNA zu pre-miRNA) und DICER (pre-miRNA zu reifer miRNA) vermittelt (Lee et al., 2003). miRNAs sind Bestandteile des sogenannten „RNA induced silencing complex“ (RISC), der über die miRNA an der 3'-UTR von mRNAs bindet (siehe Bartel, 2004). Die miRNA-mRNA Bindung erfolgt dabei durch Basenpaarung zwischen einer kurzen Sequenz der miRNA, der sogenannten „Seed“-Sequenz (siehe Bartel, 2009). Die Bindung des RISC an der 3'-UTR kann die Genexpression durch zwei post-transkriptionellen Mechanismen herunter regulieren: durch Zerschneiden der mRNA oder Repression der Translation (Bartel, 2004). miRNAs kommen besonders häufig im Nervensystem vor, wo sie eine besondere Rolle zu spielen scheinen (Siegel, 2011) und kommen somit auch als möglicher Regulator der *otp*-Expression im Nervensystem in Frage. *Drosophila* besitzt mindestens 176 miRNAs, wovon fast die Hälfte in Clustern vorkommt (Ryazansky et al., 2011).

Der *iab-4* Locus, der sich im Bithorax-Komplex befindet, codiert für zwei stabile miRNAs - *iab-4-5p* (5 prime) und *iab-4-3p* (3 prime) (Aravin et al., 2003). Bei Voraussagen von Zielgensequenzen von miRNAs wurde *otp* als mögliches Zielgen von *iab-4-5p* angegeben (Stark et al., 2003, Brenneke et al., 2005). Wie in Abbildung 5.4 ersichtlich, wird *otp* dabei nach *homothorax* (*hth*) und *Ultrabiothorax* (*Ubx*) mit dritthöchster Wahrscheinlichkeit als Zielgen von *iab-4-5p* vorausgesagt und in der 3'-UTR von *otp* konnten zwei potentielle Bindungsstellen der miRNA *iab-4-5p* vorausgesagt werden. Das zweitwahrscheinlichste Zielgen *Ubx* konnte auch bereits *in vivo* als Zielgen bestätigt werden (Ronshaugen et al.,

2005). Das primäre *iab-4* Transkript wird ausschließlich im posterioren Bereich des Embryos in den Abdominal-Segmenten A2-A7 exprimiert (Cumberledge et al., 1990; Ronshaugen et al., 2005; Abb.5.4). Es wäre also möglich, dass die miRNA dort die Proteinexpression von *Otp* im ventralen Nervensystem hemmt.

A	Zielgen	UTR	Z <sub>MAX</sub>	Z <sub>UTR</sub>	#S
1	<i>hth</i> (CG17117-RD)	+	13.72	39.17	4
2	<i>Ubx</i> (CG10388-RA)	+	14.08	22.29	2
3	<i>otp</i> (CG10036-RA)	-	9.92	19.14	2
4	CG32414-RA	-	8.67	16.78	2
5	<i>Or98b</i> (CG1867-RA)	-	16.29	16.29	1



**Abb.5.4. Die miRNA *iab-4*.** (A) Zielgenvoraussage für die miRNA *iab-4-5p*. Der Z-Wert ist dabei ein Maß für die Nicht-Zufälligkeit, Z<sub>Max</sub> ist die Voraussage für die beste einzelne Bindungsstelle, Z<sub>UTR</sub> die Voraussage für alle Bindungsstellen der 3'-UTR. #S gibt die Anzahl der vorausgesagten Bindungsstellen an. (B-D) Expressionsmuster des primären *iab-4* Transkripts (rot) in den Stadien 5 (B), 8 (C) und 11 (D) im Vergleich zum Expressionsmuster von *Ubx* (grün) (aus Ronshaugen et al., 2005).

Eine Fehlexpression der miRNA *iab-4* mit Hilfe des UAS-Gal4-Systems in den MP2-Neuronen des ventralen Nervensystems führt jedoch nicht zu einer Repression der *Otp*-Proteinexpression (nicht gezeigt), somit konnte *otp in vivo* nicht als Zielgen von *iab-4-5p* bestätigt werden. Allerdings scheint es eine Kontext-abhängige Regulation von Zielgenen durch miRNAs zu geben (Bushati et al., 2007). So konnte z.B. beim Zebrafisch *Danio rerio* nachgewiesen werden, dass miR-430 in somatischen Zellen *nanos1* reprimiert, in primordialen Keimzellen wird *nanos1* jedoch stark exprimiert, obwohl miR-430 vorhanden ist (Mishima et al., 2006). Es kann also nicht ausgeschlossen werden, dass eine solche Kontext-abhängige Regulation von *otp* durch die miRNA *iab-4-5p* erfolgt. Zudem befindet sich die Analyse der miRNAs erst in den Anfängen und von vielen ist das Expressionsmuster noch unbekannt, so dass es durchaus möglich ist, dass *otp* über eine noch nicht näher charakterisierte miRNA reguliert wird.

## 5.6 Keine morphologischen Veränderungen im Nervensystem der *otp*-Mutanten

Während die *otp*-Mutanten einen starken Enddarmphänotyp zeigen, konnte bisher keine phänotypische Veränderung im ventralen Nervensystem und im Gehirn homozygot mutanter Embryonen nachgewiesen werden. Durch Rettungsexperimente mit einem Rescue-Konstrukt, welches eine gezielte *otp*-Expression im Enddarm ermöglicht, konnte zwar der Enddarmphänotyp der *otp*-Mutanten fast vollständig (~80% der wildtypischen Enddarmlänge) gerettet werden, nicht jedoch die embryonale Letalität (4.2.3). Dies deutet darauf hin, dass entweder die fast vollständige Wiederherstellung des Enddarmphänotyps nicht ausreichend ist, um die embryonale Letalität zu retten, oder dass diese nicht ausschließlich durch den Enddarmphänotyp sondern auch durch Defekte im Nervensystem verursacht wird.

Beim Zebrafisch konnte nachgewiesen werden, dass *otp* eine wichtige Rolle bei der Spezifizierung und Differenzierung neuroendokriner Zellen spielt. Das Vorderhirn von *otp*-Knockdown-Zebrafischen ist morphologisch weitgehend unverändert, es kommt jedoch zu einem Verlust der Expression des Neuropeptids Isotocin (Eaton und Glasgow, 2007), des Zebrafisch-Homologs von Oxytocin (Acher et al., 1992; Gilligan et al., 2003; Unger und Glasgow 2008).

Geht man also von einer konservierten Funktion von *otp* in der Nervensystementwicklung aus, ist zu vermuten, dass *otp* auch bei *Drosophila* eine Rolle bei der neuroendokrinen Zellentwicklung spielt. Bei *Drosophila* konnte bisher jedoch kein Oxytocin-ähnliches Peptid identifiziert werden (Stafflinger et al., 2008). Im ventralen Nervensystem exprimieren nur etwa 200 der insgesamt 10000 Zellen ein Neuropeptid und werden somit als peptiderge Zelle bezeichnet (Miguel-Aliaga et al., 2004; Park et al., 2008). Jede Unterklasse peptiderger Zellen exprimiert nur eines von ~30 Neuropeptiden (Park et al., 2008). Obwohl die Neuromere des ventralen Nervensystems oft die gleiche Anzahl von Neuronen und Gliazellen enthalten, sind die peptidergen Neurone meist Segment-spezifisch (Miguel-Aliaga et al., 2004, Park et al., 2008). So überleben die Capability (Capa) exprimierenden peptidergen Va-Neurone nur in den Adominal-Segmenten A2-A4 bis ins Larvalstadium, während die Va-Neurone ab Abdominal-Segmenten A5 im Stadium 16 in Apoptose übergehen (Suska et al., 2011). Insgesamt können ab Stadium 17 nur sechs Capa-exprimierende Neurone im ventralen Nervensystem nachgewiesen werden (Suska et al., 2011). Die peptidergen Neurone des Apterous- (Ap-) Clusters sind Thorax-spezifisch, Neuron Ap4 exprimiert spezifisch das Neuropeptid FMRFamid, Neuron Ap1 das Neuropeptid Nplp1 (Park et al., 2004; Baumgart et al., 2007; Karlsson et al., 2010). Diese Segment-Spezifität spielt eine wichtige Rolle bei der Kontrolle des Segment- und Region-spezifischen physiologischen Outputs (Suska et al.,

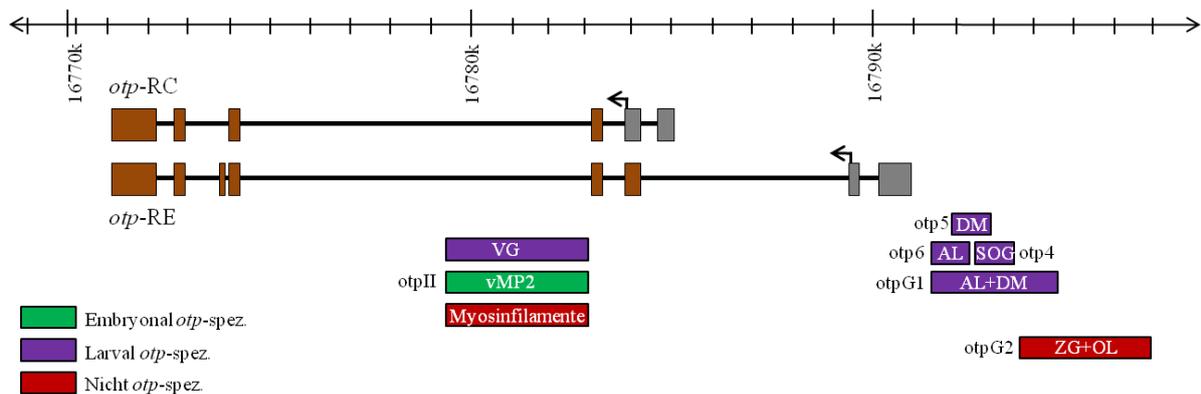
2011). Da die einzelnen Neuropeptide also teilweise nur in wenigen Neuronen des Nervensystems exprimiert werden, kann es schwierig sein, einen möglichen Verlust von wenigen Neuronen in den *otp*-Mutanten nachzuweisen, ohne dass die entsprechenden Antikörper zur Verfügung stehen.

Es wäre auch möglich, dass in den *otp*-Mutanten die betreffenden Neurone zwar vorhanden sind, aber ein verändertes Genexpressionsmuster zeigen. Um dies nachzuweisen, müssten allerdings diese downstream von *otp* gelegenen Gene bekannt sein. Ein solches potentielles Zielgen sollte mit *otp* im Nervensystem co-lokalisieren, bisher konnte aber nur in wenigen Neuronen eine Co-Lokalisation von *otp* mit anderen Nervensystemmarkern nachgewiesen werden.

In den vMP2-Neuronen des ventralen Nervensystems konnte eine Co-Lokalisation der drei Homeobox-Gene *otp*, *drx* und *hbn* nachgewiesen werden (Kaspar, 2008; 4.1.2.). Dabei werden *drx* und *hbn* allerdings zeitlich vor *otp* in diesen Zellen exprimiert, sie kommen also nicht als mögliche Zielgene in Frage (nicht gezeigt). Wie in *hbn*-Mutanten (Kaspar, 2008) sind die vMP2-Neurone auch in den *otp*-Mutanten noch vorhanden und projizieren wildtypisch. Auch eine redundante Funktion von *otp*, *drx* und *hbn* bei der Entwicklung der vMP2-Neurone kann ausgeschlossen werden, da die Neurone auch in der Defizienz *Exel7166*, die alle drei Gene deletiert, noch vorhanden sind (nicht gezeigt). Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass die Zellidentität der vMP2-Neurone in den Mutanten verändert ist, dass also z.B. bestimmte Marker nicht exprimiert werden.

### 5.7 Neu identifizierte regulatorischer Elemente im Bereich des *otp*-Gens

Im Rahmen dieser Arbeit konnten mindestens vier *otp*-spezifische und zwei nicht *otp*-spezifische regulatorische Elemente im Intron- und 5'-Bereich von *otp* identifiziert werden (4.8). In Abbildung 5.5 ist die Lage der neu identifizierten regulatorischen Elemente sowie die Strukturen, in denen eine Reporterexpression stattfindet, dargestellt.



**Abb.5.5. Übersicht über die neu identifizierten regulatorischen Elemente im Bereich des *otp*-Gens.** Oben sind die Exon-Intron-Struktur der beiden Transkripte *otp*-RC und *otp*-RE dargestellt (der Pfeil über den Transkripten deutet die Leserichtung an). Darunter ist die Lage der regulatorischen Elemente dargestellt, wobei rote Boxen für nicht-*otp*-spezifische regulatorische Elemente stehen, grüne Boxen für regulatorische Elemente für eine *otp*-Expression im Embryo, und lilafarbene Boxen für regulatorische Elemente für eine *otp*-Expression im larvalen Gehirn. Abk.: AL: antero-lateral gelegene Neurone; DM: dorso-medial gelegene Neurone; OL: optische Loben; SOG: suboesophageales Ganglion; VG: Ventralganglion; ZG: zentrales Gehirn.

Das Konstrukt pHP\_otpII zeigt eine nicht *otp*-spezifische Reporterexpression im embryonalen Muskelgewebe. Es kann dabei ausgeschlossen werden, dass es sich bei dieser Reporterexpression um Positionseffekte handelt, da drei unabhängige Linien mit unterschiedlichen Integrationsorten (einmal 2.Chromosom, zweimal 3.Chromosom) ein vergleichbares Muster zeigen (nicht gezeigt). Das Gen *Actin 57B* (*Act57B*) liegt ~40kb von *otp* entfernt in der 57B Region, es wird in entgegengesetzter Leserichtung transkribiert und in allen drei embryonalen Muskelgeweben - in der viszeralen Muskulatur, der Skelettmuskulatur und der Herzmuskulatur - exprimiert (Tobin et al., 1990; Keller et al., 1997; Kelly et al., 2002). Das Expressionsmuster von *Act57B* stimmt mit der Reporterexpression von pHP\_otpII überein. Dies deutet darauf hin, dass sich im Bereich von otpII, also in Intron 4 des *otp*-Gens, ein regulatorisches Element von *Act57B* befindet. Es war jedoch bereits ein regulatorisches Element identifiziert worden, welches ausreichend für eine *Act57B*-Expression in allen drei Muskelgeweben ist (Kelly et al., 2002). Dieses 595bp Element liegt im 5'-Bereich von *Act57B* und enthält eine einzelne MEF2- (myocyte enhancer factor 2-) Bindestelle (Kelly et al., 2002). Mit Hilfe von Sequenzanalysen konnten jedoch weder MEF2-

Bindestellen in der Sequenz von *otpII* noch konservierte Bereiche zwischen dem 595bp Element und *otpII* identifiziert werden.

Auch bei Reporterengenanalysen des Homeoboxgens *drx* war bereits ein mögliches regulatorisches Element des Gens *Act57B* identifiziert worden, es liegt im 3'-Bereich von *drx* und somit zwischen den Genen *drx* und *Act57B* (Wild, 2004; Wahl, 2005). Die Reporterexpression des Konstrukts KK sowie des verkürzten Konstrukts BK4.8 stimmt dabei mit der Reporterexpression von *pHP\_otpII* überein. Es handelt sich dabei aber nicht um das oben beschriebene 595bp Element und auch hier konnte im Bereich von BK4.8 keine MEF2-Bindestelle identifiziert werden und es gibt keine konservierten Bereiche zwischen dem 595bp Element und BK4.8 (nicht gezeigt).

Das Konstrukt *pHP\_otpII* zeigt zusätzlich dazu noch eine *otp*-spezifische Reporterexpression in den vMP2-Zellen des ventralen Nervensystems. Während jedoch das *Otp*-Protein nur in den vMP2-Zellen der drei Thorakal- und der ersten zwei Abdominal-Segmente exprimiert wird, findet die Reporterexpression in den vMP2-Neuronen aller Segmente statt. Dies deutet darauf hin, dass in den Abdominal-Segmenten 3-8 ein Faktor aktiv ist, der die Translation von *otp* reprimiert. Bei den vMP2-Neuronen ist bisher keine Segment-spezifische Apoptose bekannt, während die dMP2-Neurone am Ende der Embryonalentwicklung eine Segment-spezifische Apoptose in den Segmenten T1-A5 durchlaufen (Miguel-Aliaga et al., 2004). In den Abdominal-Segmenten A6-A8 verhindert das Hox-Gen *Abdominal-B* die Apoptose, die dMP2-Neurone sind hier auch noch in den Larvalstadien vorhanden (Miguel-Aliaga et al., 2004).

Außerdem konnte im Konstrukt *pHP\_otpII* ein regulatorisches Element für eine *otp*-Expression in sekundären Neuronen des Ventralganglions (VG) identifiziert werden. Ob es sich bei diesem regulatorischen Element um das gleiche handelt wie bei dem für die Expression von *otp* in den vMP2-Zellen des Embryos, wurde bisher nicht nachgewiesen. Dazu müsste man das Ausgangskonstrukt in kleinere Konstrukte unterteilen und untersuchen, ob eine Trennung der regulatorischen Elemente möglich ist. Es ist aber auch durchaus möglich, dass ein regulatorisches Element im Laufe der Entwicklung wiederverwendet wird.

Auch beim Konstrukt *pBPGUw\_otpG1* konnte eine *otp*-spezifische Reporterexpression im larvalen Gehirn nachgewiesen werden. Dabei konnte neben einer Co-Lokalisation mit *otp* in zwei Zellclustern der Hemisphären auch eine Reporterexpression in *otp*-negativen Zellen des larvalen Gehirns nachgewiesen werden. Auch bei Reporterengenanalysen von *twin-of-eyeless* (*toy*), die mit dem gleichen Vektor durchgeführt wurden, war nachgewiesen worden, dass alle Linien neben einer Reporterexpression in *toy*-positiven Neuronen auch eine

Reporterexpression in *toy*-negativen Neuronen zeigen (Pfeiffer et al., 2008). Es konnte gezeigt werden, dass regulatorische Elemente, die aus ihrem natürlichen Kontext genommen werden, neben dem Expressionsmuster des endogenen Gens oft zusätzliche reproduzierbare Muster zeigen (Pfeiffer et al., 2008). Dies kommt entweder durch fehlende Konkurrenz zwischen regulatorischen Elementen oder durch die Trennung eines regulatorischen Elements von Repressor-Elementen zustande (Pfeiffer et al., 2008).

Um zu untersuchen, ob sich in dem Konstrukt pBPGUw\_otpG1 ein oder mehrere regulatorische Elemente befinden, wurde das Konstrukt in drei überlappende kleinere Fragmente unterteilt und diese auf eine Reporterexpression untersucht. So konnte nachgewiesen werden, dass sich im Bereich von otpG1 mindestens drei regulatorische Elemente für eine *otp*-Expression im larvalen Gehirn befinden. Auch hier konnte wieder bei allen drei Reporterkonstrukten das oben beschriebene Phänomen beobachtet werden, dass eine Reporterexpression jeweils auch in *otp*-negativen Zellen stattfindet. So aktiviert das Konstrukt pBPGUw\_otp5 eine Reporterexpression in allen sechs DM-Lineages während *otp* nur in Zellen der DM6-Lineage exprimiert wird.

Das Konstrukt pBPGUw\_otpG2 zeigt eine nicht *otp*-spezifische Expression im larvalen Gehirn, und zwar in Zellclustern des zentralen Gehirn und in den optischen Loben. Es könnte sich dabei um ein regulatorisches Element von *drx* oder *hbn* handeln, die beide im Gegensatz zu *otp* in den optischen Loben exprimiert werden.

Das Cluster aus den drei Genen *otp*, *drx* und *hbn* ist hochkonserviert, es konnte außer bei *Drosophila* noch bei drei weiteren Insektenarten identifiziert werden. So kommen die drei Homeoboxgene auch bei dem Moskito *Anopheles gambiae*, der Honigbiene *Apis mellifera* und dem Mehlkäfer *Tribolium castaneum* gecluster vor und außer bei *Anopheles* (hier ist die Reihenfolge von *otp* und *rx* vertauscht) sogar in gleicher Reihenfolge (Mazza et al., 2010). Dies deutet darauf hin, dass auch die Bereiche und die Abstände zwischen den Genen eine Rolle bei der Funktion der Gene spielen. So könnten z.B. gemeinsame regulatorische Elemente für alle drei Gene des Clusters existieren oder ein regulatorisches Element des einen Gens im 3'-, 5'- oder Intron-Bereich eines anderen Gens des Clusters liegen. Bei Vertebraten ist das Cluster dagegen aufgelöst, *otp* und *rx* werden von verschiedenen Chromosomen codiert und es ist kein *hbn* homologes Gen bekannt (Mazza et al., 2010).

Obwohl der komplette Intron-Bereich sowie der 5'-Bereich von *otp* auf regulatorische Elemente untersucht wurde, konnten nicht alle Elemente identifiziert werden. So fehlen vor allem Elemente für die *otp*-Expression im embryonalen Nervensystem. Diese können jedoch auch weiter von *otp* entfernt, z.B. in Introns anderer Gene liegen, was eine gezielte

Identifizierung schwierig macht. Es wäre auch möglich, dass eine Kombination von regulatorischen Elementen, die bei den Reporter-gen-Analysen unabhängig voneinander untersucht wurden, für eine *otp*-Expression nötig ist. Eine andere mögliche Erklärung ist, dass nicht alle regulatorischen Elemente in Verbindung mit einem heterologen Promotor funktionieren. So konnten bei Reporter-gen-Analysen des Gens *hedgehog* (*hh*) regulatorische Elemente identifiziert werden, die nur in Verbindung mit dem endogenen Promotor von *hh* zur einer Reporter-genexpression führen, nicht jedoch in Verbindung mit dem basalen Promotor *hs43* (Ntini und Wimmer, 2011). Dieser basale *hs43*- (= *Hsp70*-) Promotor ist auch Bestandteil der pH-Pelican Vektoren, die für einen Teil der Reporter-gen-Analysen dieser Arbeit verwendet wurden.

### 5.8 Otp-Expression im larvalen Gehirn

In Rahmen dieser Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass Otp im larvalen Gehirn hauptsächlich in sekundären Neuronen exprimiert wird. So findet in den beiden Hemisphären ausschließlich eine Expression in sekundären Neuronen statt (4.7.2). Unter sekundären Neuronen versteht man bei *Drosophila* Neurone, die erst im Larvalstadium gebildet werden, während man unter primären Neuronen embryonal gebildete Neurone versteht. Die Otp-Expression im Gehirn bleibt also nicht über die verschiedenen Entwicklungsstadien permanent angeschaltet, sondern die Expression in den primären Neuronen des Gehirns wird nach dem Embryonalstadium ausgeschaltet und es kommt in den sekundären Neuronen, die nach einer kurzen Ruhezeit der Neuroblasten in den Larvalstadien gebildet werden, zu einer Otp-Expression.

Im Ventralganglion des larvalen Gehirns wird Otp ausschließlich in den Thorakal-Segmenten exprimiert und unterscheidet sich somit von der Otp-Expression entlang des ventralen Nervensystems im Embryo, in dem Otp in den drei Thorakal- und den ersten beiden Abdominal-Segmenten exprimiert wird (4.7). In Ventralganglion wird Otp sowohl in lateral gelegenen Zellclustern aus sekundären Neuronen als auch in zentral gelegenen einzelnen primären Neuronen exprimiert. Während die Expression in einigen primären Neuronen in den Thorakal-Segmenten also über das Embryonalstadium hinaus angeschaltet bleibt, muss diese in den entsprechenden Neuronen in den ersten beiden Abdominal-Segmenten abgeschaltet werden. Es wäre möglich, dass die entsprechenden primären Neurone in den Abdominal-Segmenten in Apoptose gehen.

Im Gegensatz zum ventralen Nervensystem des Embryos kann im Ventralganglion der Larve kein Unterschied zwischen der *otp*-mRNA- und der Otp-Proteinexpression nachgewiesen

werden, die *otp*-Expression in der Larve unterliegt also keiner post-transkriptionellen Regulation (4.7.1-2).

Im larvalen und adulten Nervensystem existiert ein Segment-abhängiger Unterschied bezüglich der Anzahl der postembryonalen Neuroblasten und des Proliferationszeitfensters (Truman und Bate, 1988). In den Abdominal-Segmenten ist das Proliferationszeitfenster der Neuroblasten kürzer und die Lineages bestehen daher aus weniger Zellen als in den Thorakal-Segmenten. So limitiert das Hox-Gen Abdominal-A die Anzahl der Nachkommen einer einzelnen neuronalen Vorläuferzelle, indem es den Zeitpunkt der Apoptose in Neuroblasten kontrolliert (Bello et al., 2003). Eine mögliche Erklärung, warum *otp* nur in Neuronen der Thorakal-Segmente exprimiert wird wäre also, dass die entsprechenden Neurone in den Abdominal-Segmenten gar nicht gebildet werden, sondern dass es sich dabei um Thorax-spezifische Neurone handelt.

### **5.9 Nicht-EMS-typische Punktmutationen der Mutanten *Pros29*<sup>3311</sup> und *CG34115*<sup>7272</sup>**

Die beiden Mutanten *Pros29*<sup>3311</sup> und *CG34115*<sup>7272</sup> stammen aus dem gleichen EMS-Mutagenese-Screen der 57B Region wie die beiden *otp*-Mutanten *otp*<sup>1024</sup> und *otp*<sup>13064</sup>. EMS ist ein chemisches Mutagen, das in der DNA eine Alkylierung von Guaninresten bewirkt (Snow et al., 1984). Das so entstandene Ethyl-Guanin paart sich mit T statt C und es kommt somit zu einem Basenaustausch von G/C nach A/T. Bei der Mutante *Pros29*<sup>3311</sup> konnte jedoch ein Basenaustausch von T nach A und bei der Mutante *CG34115*<sup>7272</sup> von T nach C nachgewiesen werden (4.10.2; 4.10.3). In beiden Fällen handelt es sich also nicht um den typischen EMS-Austausch. Es scheint jedoch speziesabhängig zu sein, mit welcher Wahrscheinlichkeit es zu diesem EMS-typischen Basenaustausch kommt. Während es bei *Arabidopsis* in über 99% der Fälle zu einem G/C nach A/T Austausch kommt (Greene et al., 2003; Cooper et al., 2008), variieren die Werte bei *Drosophila* zwischen 74% (Cooper et al., 2008), 84% (Winkler et al., 2005) und 100% (Bentley et al., 2000). Der zweithäufigste Austausch bei *Drosophila* ist ein A/T nach T/A Austausch (16%) (Cooper et al., 2008), wie er der Mutante *Pros29*<sup>3311</sup> nachgewiesen werden konnte. Die unterschiedlichen prozentualen Verhältnisse zwischen *Arabidopsis* und *Drosophila* deuten darauf hin, dass sich der Reparaturmechanismus von alkylierten Guanin-Resten zwischen den Organismen unterscheidet.

### 5.10 Auswirkungen Punktmutationen der Mutanten *Pros29*<sup>3311</sup> und *CG34115*<sup>7272</sup>

Bei der Mutante *CG34115*<sup>7272</sup> konnte ein T nach C Austausch der 2.Base des Startcodons nachgewiesen werden (4.10.3). Ohne Startcodon kann die mRNA nicht translatiert werden, es wird kein Protein gebildet. Bei der Mutante *7272*<sup>CG34155</sup> handelt es sich also um ein Null-Allel.

Bei der Mutante *Pros29*<sup>3311</sup> konnte ein T nach A Austausch der 2.Base von Intron 1 nachgewiesen werden (4.10.2). In diesem Bereich des Introns befinden sich die Consensus-Sequenzen der Spleiß-Donorstelle. Die Spleiß-Donorstelle (5'-Spleißstelle) am Anfang jedes Introns ist genau wie die Spleiß-Akzeptorstelle (3'-Spleißstelle) am Ende jedes Introns sowie die etwa 20-50 Basen stromaufwärts von der Spleiß-Akzeptorstelle gelegene Verzweigungsstelle („Branching-Site“) hoch konserviert und essenziell für ein funktionierendes Spleißen. Die 5'-Spleißstelle bei *Drosophila* enthält die Sequenz MAG^GTRAGT (M steht für A oder C, R für A oder G), wobei die ersten beiden Positionen des Introns (GT) absolut invariant sind (Mount et al., 1992). Die Mutation an dieser essenziellen Position der Spleiß-Donorstelle führt also dazu, dass das Intron 1 nicht gespleißt werden kann.

In *Drosophila* existiert genau wie in Hefen und Säugerzellen ein Kontrollmechanismus, der verhindert, dass nicht prozessierte RNA aus dem Zellkern exportiert wird (Custodio et al., 1999; Hilleren et al., 2001; Jensen et al., 2001; Eberle et al., 2010). So konnte in *Drosophila* S2-Zellen nachgewiesen werden, dass eine mRNA des humanen  $\beta$ -Globulin, die Mutationen in der Spleiß-Donor und Spleiß-Akzeptorstelle enthält, nicht aus dem Kern exportiert und somit auch nicht translatiert wird (Eberle et al., 2010). Es ist also zu vermuten, dass die nicht gespleißte *Pros29*-mRNA der Mutante *Pros29*<sup>3311</sup> nicht aus dem Zellkern exportiert, sondern abgebaut wird.

Selbst wenn dieser Kontrollmechanismus im Fall der Mutation von *Pros29*<sup>3311</sup> nicht greifen würde, und es zum Kernexport und zur Translation der nicht gespleißten mRNA käme, würde ein stark verändertes Protein entstehen. In Abbildung 5.6 sind die wildtypische und die mögliche mutierte Aminosäuresequenz des *Pros29*-Proteins dargestellt.

wt <i>Pros29</i>	M <sup>^</sup> ARRYDSRTTIFSPENGRLYQVEYAMEAISHAGTCLGILAEDGILLAAECSRSTNKLKLSAIIPSEKIYRLNE <sup>^</sup> ...
<i>Pros29</i> <sup>3311</sup>	M VSTAPRRPVLVStopp

**Abb.5.6. Wildtypische und mutierte Aminosäuresequenz von *Pros29*.** Dargestellt sind die durch Exon 1 und 2 codierte wildtypische Aminosäuresequenz des *Pros29*-Proteins (oben) sowie die Aminosäuresequenz des *Pros29*-Proteins der Mutante *Pros29*<sup>3311</sup> (unten).

Da bei der Mutante *Pros29*<sup>3311</sup> die Sequenz von Intron 1 nicht gespeißt ist, wird diese als codierende Sequenz gelesen. In diesem Fall kommt es bei der Translation nach nur 12 Aminosäuren aufgrund eines Stoppcodons zu einem Abbruch der Aminosäuresequenz. Das mutierte Protein besteht also nur aus 12 Aminosäuren, von denen nur die erste und die achte Aminosäure mit der wildtypischen Sequenz übereinstimmen. Es kann also ausgeschlossen werden, dass dieses Protein funktional wäre.

### 5.11 Mögliche Phänotypen der Mutanten CG34155<sup>7272</sup> und *Pros29*<sup>3311</sup>

In der vorliegenden Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass das Gen CG34115 in den posterioren Spirakeln exprimiert wird (4.10.5). Daher wurde vermutet, dass die Null-Mutante CG34155<sup>7272</sup> einen Phänotyp in den posterioren Spirakeln zeigt. Mit Hilfe von Kutikula-Präparationen konnte jedoch keine morphologische Veränderung der posterioren Spirakel nachgewiesen werden (4.10.5).

Der homeotische Transkriptionsfaktor ABD-B wird für die Bildung der posterioren Spirakel benötigt (Sanchez-Herrero et al., 1985). Downstream von Abd-B werden die Gene *cut* (*ct*), *empty spiracles* (*ems*), *nubbin* (*nub*), *klumpfuss* (*klu*) und *spalt* (*sal*) exprimiert. *Ct*, *ems*, *nub* und *klu* werden in überlappenden Mustern in der Spirakelkammer exprimiert, *sal* in den Zellen, welche die Spirakelkammer umgeben und die Stigmatophore bilden (Hu und Castelli-Gair, 1999). Weiter downstream dieser Abd-B Zielgene werden die Transkriptionsfaktoren *grainy head* (*grh*), *trachealess* (*trh*) und *engrailed* (*en*) aktiviert. Während sich in *sal*-Mutanten die Stigmatophoren nicht bilden, sind in *ems*- und *ct*- Mutanten die Spirakelkammer, nicht jedoch die Stigmatophoren betroffen (Hu und Castelli-Gair, 1999). *Klu*- und *nub*-Mutanten zeigen dagegen keine phänotypische Veränderung der posterioren Spirakel, die Gene sind also entweder redundant oder sie werden nicht für die Morphogenese der posterioren Spirakel benötigt (Hu und Castelli-Gair, 1999). Es gibt also neben CG34115 weitere Gene, die zwar in den Spirakeln exprimiert werden, die aber keinen Phänotyp zeigen. Da die Mutante 7272<sup>CG34155</sup> aber im Gegensatz zu *klu*-Mutanten eine embryonale Letalität zeigt (4.10.4) und keine Expression des Gens CG34115 in anderen embryonalen Strukturen nachgewiesen werden konnte, ist zu vermuten, dass die Spirakel zwar morphologisch wildtypisch aussehen, jedoch nicht funktional sind.

Bei der Mutante *Pros29*<sup>3311</sup> konnte in ersten Analysen kein Ventralfurchenphänotyp festgestellt werden, wie er bei *Pros29*-RNAi-Allelen beschrieben ist (Gong et al, 2004).

## 5.12 Ausblick

Durch Erzeugung einer *otp*-Mutante, bei der ausschließlich das Nervensystem-spezifische Transkript betroffen ist, könnte untersucht werden, ob die embryonale Letalität der *otp*-Allele allein durch den Enddarmphänotyp verursacht wird oder durch eine Kombination aus dem Enddarmphänotyp und einem noch nicht identifizierten ZNS-Phänotyp.

Um die regulatorischen Elemente im Reportergenkonstrukt pHP\_otpII genauer zu lokalisieren, könnten dieses Konstrukt in mehrere kleinere, überlappende Konstrukte unterteilt werden und diese dann auf eine Reporterexpression untersucht werden. Dadurch sollte es möglich sein, das nicht *otp*-spezifische regulatorische Element von dem *otp*-spezifische zu trennen. Außerdem könnte untersucht werden, ob sich das regulatorische Element für die embryonale von dem für die larvale *otp*-spezifische Expression trennen lässt, also ob es sich dabei um zwei regulatorische Elemente oder nur ein einziges handelt.

Alle in dieser Arbeit beschriebenen Reportergenkonstrukte wurde auf eine *otp*-spezifische Reporterexpression im Embryo und in der Larve untersucht. Nach einer genauen Analyse der *otp*-Expression im adulten Gehirn könnten alle Konstrukte auf eine Reporterexpression im adulten Gehirn untersucht werden. So befinden vielleicht in den Konstrukten, bei denen bisher keine Reporterexpression nachgewiesen werden konnte, regulatorische Elemente für eine adulte *otp*-Expression.

Mit Hilfe von MARCM-Analysen konnten erste Lineage-Analysen der *otp*-Expression im larvalen Gehirn erfolgen. Um alle larvalen Lineages zu bestimmen, sind weitere MARCM-Analysen sowie bessere bildgebenden Methoden (hochauflösende konfokale Mikroskopie) notwendig. Da die *otp*-Mutanten embryonal letal sind, kann in diesen nicht die Funktion von *otp* im larvalen Gehirn untersucht werden. Auch hierzu kann man sich MARCM-Analysen zu Nutze machen. So können homozygot mutante Zellklone in einem heterozygoten Hintergrund erzeugt werden (Wu und Luo, 2006; Lee und Luo, 2001; Lee und Luo, 1999) und diese dann auf einen Phänotyp untersucht werden.

## 6. Literaturverzeichnis

1. Acampora D, Postiglione MP, Avantaggiato V, Di Bonito M, Simione A (2000). The role of *Otx* and *Otp* genes in brain development. *Int J Dev Biol* 44:669-677
2. Acampora D, Postiglione MP, Avantaggiato V, Di Bonito M, Vaccarino FM, Michaud J, Simione A (1999). Progressive impairment of developing neuroendocrine cell lineages in the hypothalamus of mice lacking the *Orthopedia* gene. *Genes Dev* 13:2787-2800
3. Adams MD et al. (2000). The genome of *Drosophila melanogaster*. *Science* 287:2185-2195
4. Acher R, Chauvet J, Chauvet MT, Michel G, Rouille Y (1997). Molecular evolution of neurohypophysial hormones in relation to osmoregulation: the two fish options. *Fish Physiol Biochem* 17:325-332
5. Bach NM (2005). Charakterisierung des Homöobox-Gens *orthopedia* der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster*. Diplomarbeit, Universität des Saarlandes
6. Barolo S, Caver LA, Posakony JW (2000). GFP and  $\beta$ -galactosidase transformation vectors for promoter / enhancer analysis in *Drosophila*. *BioTechniques* 29:726-732
7. Barolo S, Castro B, Posakony JW (2004). New *Drosophila* transgenic reporters: insulated P-element vectors expressing fast-maturing RFP. *BioTechniques* 36:436-442
8. Bartel DP (2004). MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 116:281-297
9. Bartel DP (2009). MicroRNAs: Target Recognition and Regulatory Functions. *Cell* 136: 215-233
10. Bate CM (1976). Embryogenesis of an insect nervous system. I. A map of the thoracic and abdominal neuroblasts in *Locusta migratoria*. *J Embryol Exp Morphol* 35:107-123
11. Bauer V (1904). Zur inneren Metamorphose des Zentralnervensystems der Insekten. *Zool Jahrb Abt Anat Ontog Tiere* 20:123-152
12. Baumgardt M, Miguel-Aliaga I, Karlsson D, Ekman H, Thor S (2007). Specification of neuronal identities by feedforward combinatorial coding. *PLoS Biol* 5:e37
13. Bello BC, Hirth F, Gould AP (2003). A pulse of the *Drosophila* Hox protein Abdominal-A schedules the end of neural proliferation via neuroblast apoptosis. *Neuron* 37:209-219
14. Bentley A, MacLennan B, Calvo J, Dearolf CR (2000). Targeted recovery of mutations in *Drosophila*. *Genetics* 156: 1169-1173

15. Berger C, Urban J, Technau GM (2001). Stage-specific inductive signals in the *Drosophila* neuroectoderm control the temporal sequence of neuroblast specification. *Development* 128:3243-3251
16. Bernard P und Couturier M (1992). Cell Killing by the F Plasmid CcdB Protein Involves Poisoning of DNA-Topoisomerase II Complexes. *J Mol Biol* 226:735-745
17. Bernard P, Gabant P, Bahassi EM, Couturier M (1994). Positive Selection Vectors Using the F Plasmid *ccdB* Killer Gene. *Gene* 148:71-74
18. Bevis BJ, Glick BS (2002). Rapidly maturing variants of the Discosom red Fluorescent protein (dsRed). *Nat Biotechnol* 20:83-87
19. Bier E (2005). *Drosophila*, the golden bug, emerges as a tool for human genetics. *Nature Review Genetics* 6:9-23
20. Bischof J, Maeda RK, Hediger M, Karch F, Basler K (2007). An optimized transgenesis system for *Drosophila* using germ-line-specific phiC31 integrases. *PNAS* 104:3312-3317
21. Blake KJ, Myette G, Jack J (1998). The products of ribbon and raw are necessary for proper cell shape and cellular localization of nonmuscle myosin in *Drosophila*. *Dev Biol* 2003:177-188
22. Blechman J, Borodovsky N, Eisenberg M, Nabel-Rosen H, Grimm J, Levkowitz G (2007). Specification of hypothalamic neurons by dual regulation of the homeodomain protein Orthopedia. *Development* 134:4417-4426
23. Booker R, Truman JW (1987). Postembryonic neurogenesis in the CNS of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. II. Hormonal control of imaginal nest cell degeneration and differentiation during metamorphosis. *J Neurosci* 7: 4107-4114
24. Boone JQ, Doe CQ (2008). Identification of *Drosophila* type II neuroblast lineages containing transit amplifying ganglion mother cells. *Dev Neurobiol* 68:1185-1195
25. Bopp D, Burri M, Baumgartner S, Frigerio G, Noll M (1986). Conservation of a large protein domain in the segmentation gene paired and in functionally related genes of *Drosophila*. *Cell* 47:1033-1040
26. Bossing T, Udolph G, Doe CQ, Technau GM (1996). The embryonic central nervous system lineages of *Drosophila melanogaster*. I. Neuroblast lineages derived from the ventral half of the neuroectoderm. *Dev Biol* 179:41-64

27. Brand AH, Perrimon N (1993). Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* 118:401–415
28. Brennecke J, Stark A, Russell RB, Cohen SM (2005). Principles of microRNA-target recognition. *PLoS Biol.* 3:e85
29. Broadus J, Skeath JB, Spana EP, Bossing T, Technau G, et al. (1995). New neuroblast markers and the origin of the aCC/pCC neurons in the *Drosophila* central nervous system. *Mech Dev* 53:393–402
30. Burri M, Tromvoukis Y, Bopp D, Frigerio G, Noll M (1989). Conservation of the paired domain in metazoans and its structure in three isolated human genes. *EMBO J* 8:1183-1190
31. Bushati N, Cohen SM (2007). microRNA functions. *Annu Rev Cell Dev Biol* 23:175-205
32. Campos-Ortega JA, Hartenstein V (1997). *The embryonic Development of Drosophila melanogaster*. 2nd Edition. Springer, Berlin
33. Caqueret A, Coumailleau, P, Michaud, JL (2005). Regionalization of the Anterior Hypothalamus in the Chick Embryo. *Dev Dyn* 233:652-658
34. Carroll SB (1995). Homeotic genes and the evolution of arthropods and chordates. *Nature* 376:479-485
35. Castelli-Gair J (1998). The *lines* gene of *Drosophila* is required for specific functions of the Abdominal-B HOX protein. *Development* 125:1269-1274
36. Cavalieri V, Spinelli G, Di Bernardo M (2003). Impairing Otp homeodomain function in oral ectoderm cells affects skeletogenesis in sea urchin embryos. *Dev Biol* 262:107-18
37. Copper JL, Bradley JT, Henikoff S (2008). Fly-Till – Reverse genetics using a living point mutation resource. *Fly* 2:300-302
38. Crosnier C, Stamatakis D, Lewis J (2006). Organizing cell renewal in the intestine: stem cells, signals and combinatorial control. *Nat Rev Genet* 7:349-359
39. Cumberland S, Zaratzian A, Sakonju S (1990). Characterization of two RNAs transcribed from the cis-regulatory region of the abd-A domain within the *Drosophila* bithorax complex. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:3259-3263

40. Custodio N, Vivo M, Antoniou M, Carmo-Fonseca C (2007). Splicing- and cleavage-independent requirement of RNA polymerase II CTD for mRNA release from the transcription site. *J Cell Biol* 179:199–207
41. Davis RJ, Tavsanlı BC, Dittrich C, Walldorf U, Mardon G (2003). *Drosophila retinal homeobox (drx)* is not required for establishment of the visual system, but is required for brain and clypeus development. *Dev Bio* 259: 272-287
42. De la Escalera S, Bockamp EO, Moya F, Piovant M, Jiménez F (1990). Characterization and gene cloning of neurotactin, a *Drosophila* transmembrane protein related to cholinesterases. *EMBO J* 9:3593-3601
43. Del Giacco L, Sordino G, Pistocchi A, Andreakis N, Tarallo R, Di Benedetto B, Cotelli F (2006). Differential regulation of the zebrafish *orthopedia I* gene during fate determination of diencephalic neurons. *BMC Dev Biol* 6:50
44. Diaz RJ, Harbecke R, Singer JB, Pignoni F, Janning W, Lengyel JA (1996). Graded effect of tailless on posterior gut development: Molecular basis of an allelic series of a nuclear receptor gene. *Mech Dev* 54:119-130
45. Di Bernardio M, Castagnetti S, Bellomonte D, Olivieri P, Melfi R, Palla F, Spinelli G (1999). Spatially restricted expression of *PIOtp*, a *Paracentrotus lividus* *Orthopedia*-related homeobox gene, is correlated with oral ectodermal patterning and skeletal morphogenesis in late-cleavage sea urchin embryos. *Development* 126: 2171-2179
46. Di Bernardo M, Bellomonte D, Castagnetti S, Melfi R, Oliveri P, Spinelli G (2000). Homeobox genes and sea urchin development. *Int J Dev Biol* 44:637-643
47. Doe CQ (1992). Molecular markers for identified neuroblasts and ganglion mother cells in the *Drosophila* central nervous system. *Development* 116:855-863
48. Doe CQ, Goddman CS (1985). Early events in insect neurogenesis. I. Development and segmental differences in the pattern of neuronal precursor cells. *Dev Biol* 111:193-205
49. Doe CQ, Hiromi Y, Gehring WJ, Goodman CS (1988). Expression and function of the segmentation gene *fushi tarazu* during *Drosophila* neurogenesis. *Science* 239:170-175
50. Eaton JL, Glasgow E (2007). Zebrafish *orthopedia (otp)* is required for isotocin cell development. *Dev Genes Evol* 217:149-158

51. Eberle AB, Hesse V, Helbig R, Dantoft W, Gimber N, Visa N (2010). Splice-site mutations cause Rrp6-mediated nuclear retention of the unspliced RNAs and transcriptional down-regulation of the splicing-defective genes. *PLoS One* 5:e11540
52. Eggert T, Hauck B, Hildebrandt N, Gehring WJ, Walldorf U (1998). Isolation of a *Drosophila* homolog of the vertebrate homeobox gene *Rx* and its possible role in brain and eye development. *PNAS* 95:2343-2348
53. FlyBase Genome Annotators (2011). Changes affecting gene model number or type in release 5.33 of the annotated *D.melanogaster* genome. [Flybase.org](http://flybase.org)
54. Fox DT, Spradling AC (2009). The *Drosophila* hindgut lacks constitutively active adult stem cells but proliferates in response to tissue damage. *Cell Stem Cell* 5:290-297
55. Frigerio G, Burri M, Bopp D, Baumgartner S, Noll M (1986). Structure of the segmentation gene paired and the *Drosophila* PRD gene set as part of a gene network. *Cell* 47:735-746
56. Furukawa T, Kozak CA, Cepko CL (1997). Rax, a novel paired-type homeobox gene, shows expression in the anterior neural fold and developing retina. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:3088-3093
57. Fuss B, Meissner T, Bauer R, Lehmann C, Eckardt F, Hoch M (2001). Control of endoreduplication domains in the *Drosophila* gut by the knirps and knirps-related genes. *Mech Dev* 100:15-23
58. Galliot B, de Vargas C, Miller D (1999). Evolution of homeobox genes: Q50 Paired-like genes founded the Paired class. *Dev Genes Evol* 209:186-197
59. Ghysen A, Dambly-Chaudiere C (1989). Genesis of the *Drosophila* peripheral nervous system. *Trends Genet* 5:251-255
60. Gilligan P, Brenner S, Venkatesh B (2003). Neurone-specific expression and regulation of the pufferfish isotocin and vasotocin genes in transgenic mice. *J Neuroendocrinol* 15:1027-1036
61. Golic MM und Golic KG (1996). A quantitative measure of the mitotic pairing of alleles in *Drosophila melanogaster* and the influence of structural heterozygosity. *Genetics* 143: 385-400
62. Gong L, Puri M, Unlu M, Young M, Robertson K, Viswanathan S, Krishnaswamy A, Dowd SR, Minden JS (2004). *Drosophila* ventral furrow morphogenesis: a proteomic analysis. *Development* 131: 643-656
63. Gong WJ, Golic KG (2003). Ends-out, or replacement, gene targeting in *Drosophila*. *PNAS* 100:2556-2561

64. Gong WJ, Golic KG (2004). Genomic deletions of the *Drosophila melanogaster Hsp70* genes. *Genetics* 168: 1467-1476
65. Gong L, Puri M, Unlu M, Young M, Robertson K, Viswanathan S, Krishnaswamy A, Dowd SR, Minden JS (2004). *Drosophila* ventral furrow morphogenesis: a proteomic analysis. *Development* 131: 643-656
66. Goshima G, Wollman R, Goodwin SS, Zhang N, Scholey JM, Vale RD, Stuurman N (2007). Genes required for mitotic spindle assembly in *Drosophila* S2 cells. *Science* 316:417-421
67. Grant SGN, Jessee J, Bloom FR, Hanahan D (1990). Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *Escherichia coli* methylation restriction mutant. *PNAS* 87:4645-4649
68. Green RB, Hatini V, Johansen KA, Liu XJ, Lengyel JA (2002). Drumstick is a zinc finger protein that antagonizes Lines to control patterning and morphogenesis of the *Drosophila* hindgut. *Development* 129:3645-3656
69. Greene EA, Codomo CA, Taylor NE, Henikoff JG, Till BJ, Reynolds SH, Enns LC, Burtner C, Johnson JE, Odden AR, Comai L, Henikoff S (2003). Spectrum of chemically induced mutations from a large-scale reverse-genetic screen in *Arabidopsis*. *Genetics* 164:731-740
70. Gregory SL, Kortschak RD, Kalionis B, Saint R (1996). Characterization of the dead ringer gene identifies a novel, highly conserved family of sequence-specific DNA binding-proteins. *Mol Cell Biol* 16:792-799
71. Groth AC, Fish M, Nusse R, Calos MP (2004). Construction of transgenic *Drosophila* by using the site-specific Integrase from Phage  $\Phi$ C31. *Genetics* 166:1775-1782
72. Haass C, Pesold-Hurt B, Kloetzel PM (1990). The *Drosophila* PROS-29 gene is a new member of the PROS-gene family. *Nucleic Acids Res* 18:4018
73. Hanahan D (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 166:557-580
74. Harbecke R, Janning W (1989). The segmentation gene *kruppel* of *Drosophila melanogaster* has homeotic properties. *Genes Dev* 3:114-122
75. Harbecke R, Lengyel JA (1995). Genes controlling posterior gut development in the *Drosophila* embryo. *Dev Biol* 204:308-329

76. Harrison DA, Perrimon N (1993). Simple and efficient generation of marked clones in *Drosophila*. *Curr Biol* 3:424-433
77. Harrison DA, McCoon PE, Binari R, Gilman M, Perrimon N (1998). *Drosophila* unpaired encodes a secreted protein that activates the JAK signaling pathway. *Genes Dev* 12:3252-3263
78. Hartenstein V, Posakony JW (1990). Sensillum development in the absence of cell division: the sensillum phenotype of the *Drosophila* mutant string. *Dev Biol* 138:147-158
79. Hartmann B, Reichert H (1998). The genetics of embryonic brain development in *Drosophila*. *Mol Cell Neurosci* 12:194-205
80. Hatini V, Bokor P, Goto-Mandeville R, DiNardo S (2000). Tissue- and stage-specific modulation of Wingless signaling by the segment polarity gene lines. *Genes Dev* 14:1364-1376
81. Hatini V, Green RB, Lengyel JA, Bray SJ, DiNardo S (2005). The Drumstick/Lines/Bowl regulatory pathway links antagonistic Hedgehog and Wingless signaling inputs to epidermal cell differentiation. *Genes Dev* 19:709-718
82. Hilleren P, McCarthy T, Rosbash M, Parker R, Jensen TH (2001). Quality control of mRNA 3'-end processing is linked to the nuclear exosome. *Nature* 413:538-542
83. Hirth F, Kammermeier L, Frei E, Walldorf U, Noll M, Reichert H (2003). An urbilaterian origin of the tripartite brain: developmental genetic insights from *Drosophila*. *Development* 130:2365-2373
84. Hoch M, Pankratz MJ (1996). Control of gut development by forkhead and cell signalling molecules in *Drosophila*. *Mech Dev* 58:3-14
85. Hortsch M, Patel NH, Bieber AJ, Traquina ZR, Goodman CS (1990). *Drosophila* neurotactin, a surface glycoprotein with homology to serine esterases, is dynamically expressed during embryogenesis. *Development* 110:1327-1340
86. Hu N, Castelli-Gair J (1999). Study of the posterior spiracles of *Drosophila* as a model to understand the genetic and cellular mechanisms controlling morphogenesis. *Dev Bio* 214:197-210
87. Hummel T, Krukkert K, Roos J, Davis G, Klämbt C (2000). *Drosophila* Futsch/22C10 is a MAP1B-like protein required for dendritic and axonal development. *Neuron* 26:357-370

88. Ishikawa Y, Yoshimoto M, Yamamoto N, Ito H, Yasuda T, Tokunaga F, Iigo M, Wakamatsu Y, Ozato K (2001). Brain structures of a medaka mutant, *el* (eyeless), in which eye vesicles do not evaginate. *Brain Behav Evol* 58: 173-184
89. Ito K, Urban J, Technau GM (1995). Distribution, classification, and development of *Drosophila* glial cells in the late embryonic and early larval ventral nerve cord. *Roux's Arch Dev Biol* 204:284–307
90. Iwaki DD, Johansen KA, Singer JB, Lengyel JA (2001). *Drumstick*, *bowl*, and *lines* are required for patterning and cell rearrangement in the *Drosophila* embryonic hindgut. *Dev Bio* 240:611-626
91. Jack J, Myette G (1997). The genes *raw* and *ribbon* are required for proper shape of tubular tissue in *Drosophila*. *Genetics* 147:243-253
92. Jacobs JR, Hiromi Y, Patel NH, Goodman CS (1989). Lineage, migration and morphogenesis of longitudinal glia in the *Drosophila* CNS as revealed by a molecular lineage marker. *Neuron* 2:1625-1631
93. Jensen TH, Patricio K, McCarthy T, Rosbash M (2001). A block to mRNA nuclear export in *S. cerevisiae* leads to hyperadenylation of transcripts that accumulate at the site of transcription. *Mol Cell* 7: 887-898
94. Johansen KA, Green RB, Iwaki DD, Hernandez JB, Lengyel JA (2003). The *Drm-Bowl-Lin* relief-of-repression hierarchy controls fore- and hindgut patterning and morphogenesis. *Mech Dev* 120:1139-1151
95. Johansen KA, Iwaki DD, Lengyel JA (2003). Localized JAK/STAT signaling is required for oriented cell rearrangement in a tubular epithelium. *Development* 130:135-145
96. Karlsson D, Baumgardt M, Thor S (2010). Segment-specific neuronal subtype specification by the integration of anteroposterior and temporal cues. *PLoS Biol* 8:e1000368
97. Kaspar P (2008). Die Bedeutung des Homeoboxgens *homeobrain* für die embryonale Gehirnentwicklung von *Drosophila melanogaster*. Dissertation, Universität des Saarlandes
98. Kaufman TC, Thomas C, Lewis, RA, Wakimoto B (1980). Cytogenetic analysis of chromosome 3 in *Drosophila melanogaster*: The homoeotic gene complex in polytene chromosome interval 84A-B. *Genetics* 94:115-133
99. Keller CA, Erickson MS, Abmayr SM (1997). Misexpression of *nautilus* induces myogenesis in cardioblasts and alters the pattern of somatic muscle fibers. *Dev Biol* 181:197-212

- 100.Kelly KK, Meadows SM, Cripps RM (2002). *Drosophila* MEF2 is a direct regulator of *Actin57B* transcription in cardiac, skeletal, and visceral muscle lineages. *Mech Dev* 110:39-50
- 101.Kispert A, Herrmann BG, Leptin M, Reuter, R (1994). Homologs of mouse *Brachyury* gene are involved in the specification of posterior terminal structures in *Drosophila*, *Tribolium*, and *Locusta*. *Genes Dev* 8: 2137-2150
- 102.Kusch T, Reuter R (1999). Functions for *Drosophila* brachyenteron and forkhead in mesoderm specification and cell signalling. *Development* 126:3991-4003
- 103.Kusch T, Storck T, Walldorf U, Reuter R (2002). *Brachyury* proteins regulate target genes through modular binding sites in a cooperative fashion. *Genes Dev* 16:518-529
- 104.Landgraf M, Bossing T, Technau GM, Bate M (1997). The origin, location, and projections of the embryonic abdominal motoneurons of *Drosophila*. *J Neurosci* 17:9642-9655
- 105.Landy A (1989). Dynamic, Structural, and Regulatory Aspects of Lambda Site-specific Recombination. *Ann Rev Biochem* 58:913-949
- 106.Larsen C, Shy D, Spindler SR, Fung S, Peraanu W, Younossi-Hartenstein A, Hartenstein V (2009). Patterns of growth, axonal extension and axonal arborization of neuronal lineages in the developing *Drosophila* brain. *Dev Biol* 335:289-304
- 107.Laski FA, Rio DC, Rubin GM (1986). Tissue specificity of *Drosophila* P element transposition is regulated at the level of mRNA splicing. *Cell* 44:7-19
- 108.Lee T, Luo L (1999). Mosaic analysis with a repressible cell marker for studies of gene function in neuronal morphogenesis. *Neuron* 22:451-461
- 109.Lee T, Luo L (2001). Mosaic analysis with a repressible cell marker (MARCM) for *Drosophila* neural development. *Trends Neurosci* 24:251-254
- 110.Lee Y, Ahn C, Han J, Choi H, Kim J, Yim J, Lee J, Provost P, Radmark O, Kim S, Kim VN (2003). The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* 425:415-419
- 111.Lengyel JA, Iwaki DD (2002). It takes guts: the *Drosophila* hindgut as a model system for organogenesis. *Dev Bio* 243:1-19
- 112.Levine M, Tjian R (2003). Transcription regulation and animal diversity. *Nature* 424:147-151
- 113.Lewis EB (1978). A gene complex controlling segmentation in *Drosophila*. *Nature* 276:565-570

- 114.Lin X, State MW, Vaccarino FM, Grealley J, Hass M, Lackman JF (1999). Identification, Chromosomal Assignment, and Expression Analysis of the Human Homeodomain-Containing Gene *Orthopedia* (*OTP*). *Genomics* 60:96-104
- 115.Liu X, Kiss I, Lengyel JA (1999). Identification of genes controlling Malpighian tubule and other epithelial morphogenesis in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 151:685-695
- 116.Loosli F, Winkler S, Burgtorf C, Wurmbach E, Ansorge W, Henrich T, Grabher C, Arendt D, Carl M, Krone A, Grzebisz E, Wittbrodt J (2001). Medaka eyeless is the key factor linking retinal determination and eye growth. *Development* 128:4035-4044
- 117.Mahoney PA, Lengyel JA (1987). The zygotic segmentation mutant tailless alters the blastoderm fate map of the *Drosophila* embryo. *Dev Biol* 122:464-470
- 118.Manning G und Krasnow MA (1993). Development of the *Drosophila* tracheal system. In "The Development of *Drosophila melanogaster*" (M. Bate and A. Martı́nez Arias, Ed.), Vol. 1:609–685. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY
- 119.Marygold SJ, Roote J, Reuter G, Lambertsson A, Ashburner M, Millburn GH, Harrison PM, Yu Z, Kenmochi N, Kaufman TC, Leervers SJ, Cook KR (2007). The ribosomal protein genes and Minute loci of *Drosophila melanogaster*. *Genome Biol* 8:R216
- 120.Mathers PH, Grinberg A, Mahon KA, Jamrich M (1997). The Rx homeobox gene is essential for vertebrate eye development. *Nature* 387:603–607
- 121.Matz MV, Frdkov AF, Labas YA, Savitsky AP, Zaraisky AG, Markelov ML, Lukyanov SA (1999). Fluorescent proteins from nonbioluminescent Anthozoa species. *Nat Biotechnol* 17:969-973
- 122.Mazza ME, Pang K, Reitzel AM, Martindale MQ, Finnerty JR (2010). A conserved cluster of three PRD-class homeobox genes (homeobrain, rx and orthopedia) in the Cnidaria and Protostomia. *Evodevo* 1:3
- 123.McGinnis W, Garber RL, Wirz J, Kuroiwa A, Gehring WJ (1984). A homologous protein-coding sequence in *Drosophila* homeotic genes and its conservation in other metazoa. *Cell* 37:403-408
- 124.Miguel-Aliaga I, Thor S (2004). Segment-specific prevention of pioneer neuron apoptosis by cell-autonomous, postmitotic Hox gene activity. *Development* 131:6093-6105

125. Miller DM, Shen MM, Shamu CE, Burglin TR, Ruvkun G, Dubois ML, Ghee M, Wilson L (1992). *C. elegans unc-4* gene encodes a homeodomain protein that determines the pattern of synaptic input to specific motor neurons. *Nature* 355:841-845
126. Mishima Y, Giraldez AJ, Takeda Y, Fujiwara T, Sakamoto H, Schier AF, Inoue K (2006). Differential regulation of germline mRNAs in soma and germ cells by zebrafish miR-430. *Curr Biol* 16:2135-2142
127. Miura H, Yanazawa M, Kato K, Kitamura K (1997). Expression of a novel *aristaless* related homeobox gene 'Arx' in the vertebrate telencephalon, diencephalon and floor plate. *Mech Dev* 65:99-109
128. Mohler J, Vani K (1992). Molecular organization and embryonic expression of the *hedgehog* gene involved in cell-cell communication in segmental patterning of *Drosophila*. *Development* 115:957-971
129. Murakami R, Shigenago A, Kawakita M, Takimoto K, Yamaoka I, Akasaka K, Shimada H (1995). *Aproctous*, a locus that is necessary for the development of the proctodeum in *Drosophila* embryos, encodes a homolog of the vertebrate *Brachyury* gene. *Roux's Arch Dev Biol* 205:89-96
130. Murakami R, Takashima S, Hamaguchi T (1999). Developmental genetics of the *Drosophila* gut: Specification of primordia, subdivision and overt-differentiation. *Cell Mol Biol* 45:661-676
131. Nassif C, Noveen A, Hartenstein V (1998). Embryonic development of the *Drosophila* brain. I. Pattern of pioneer tracts. *J Comp Neurol*. 402:10-31
132. Nederbragt AJ, Welscher P, van den Driesche S, van Loon AE, Dictus WJ (2002). Novel and conserved roles for orthodenticle/ *otx* and orthopedia/ *otp* orthologs in the gastropod mollusc *Patella vulgate*. *Dev Genes Evol* 212:330-337
133. Neckameyer WS, White K (1993). *Drosophila* tyrosine hydroxylase is encoded by the pale locus. *J Neurogenet.* 8:189-199
134. Ntini E, Wimmer EA (2011). Unique establishment of procephalic head segments is supported by the identification of *cis*-regulatory elements driving segment-specific segment polarity gene expression in *Drosophila*. *Dev Genes Evol* 221:1-16
135. Otting G, Qian YQ, Billeter M, Müller M, Affolter M, Gehring WJ, Wüthrich K (1990). Protein-DNA contacts in the structure of a homeodomain-DNA complex determined by nuclear magnetic resonance spectroscopy in solution. *EMBO J* 9:3085-3092
136. Park D, Han M, Kim YC, Han KA, Taghert PH (2004). Ap-let neurons--a peptidergic circuit potentially controlling ecdysial behavior in *Drosophila*. *Dev Biol* 269:95-108

- 137.Park D, Veenstra JA, Park JH, Taghert PH (2008). Mapping peptidergic cells in *Drosophila*: where DIMM fits in. *PLoS One* 3:e1896
- 138.Patel NH, Martin-Blanco E, Coleman KG, Poole SJ, Ellis MC, Kornberg TB, Goodman CS (1989). Expression of engrailed proteins in arthropods, annelids and chordates. *Cell* 58:955-968
- 139.Pellizzari L, Tell G, Fabbro D, Pucillo C, Damante G (1997). Functional interference between contacting amino acids of homeodomains. *FEBS Lett* 407:320-324
- 140.Percival-Smith A, Müller M, Affolter M, Gehring WJ (1990). The interaction with DNA of wild-type and mutant fushi tarazu homeodomains. *EMBO J* 9:3967-3974
- 141.Pfeiffer BD, Jenett A, Hammonds AS, Ngo T-TB, Misra S, Murphy C, Scully A, Carlson JW, Wan KH, Lavery TR, Mungall C, Svirskas R, Kadonaga JT, Doe CQ, Eisen MB, Celniker SE, Rubin GM (2008). Tools for neuroanatomy and neurogenetics in *Drosophila*. *PNAS* 105:9715-9720
- 142.Pignoni F, Baldarelli RM, Steingrímsson E, Diaz RJ, Patapoutian A, Merriam JR, Lengyel JA (1990). The *Drosophila* gene *tailless* is expressed at the embryonic termini and is a member of the steroid receptor superfamily. *Cell* 62:151-163
- 143.Psenner K. 2001. Molekulargenetische Untersuchungen des Homöobox Genkomplexes 57B von *Drosophila melanogaster*. Diplomarbeit, Universität Hohenheim.
- 144.Raffael M (2006). Molekulargenetische Untersuchung der 57B Region auf dem rechten Arm des zweiten Chromosoms bei *Drosophila melanogaster*. Diplomarbeit, Universität des Saarlandes
- 145.Ryazansky SS, Gvozdev VA, Berezikov E (2011). Evidence for post-transcriptional regulation of clustered microRNAs in *Drosophila*. *BMC Genomics* 12:371
- 146.Robertson CW (1936). The metamorphosis of *Drosophila melanogaster*, including an accurately timed account of the principal morphological changes. *J Morphol* 59:351–399
- 147.Robertson HM, Preston CR, Phillis RW, Johnson-Schlitz DM, Benz WK, Engels WR (1988). A stable source of P-element transposase in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 118:461-470
- 148.Robinow S, White K (1988). The locus *elav* of *Drosophila melanogaster* is expressed in neurons at all developmental stages. *Dev Biol* 126:294-303
- 149.Robinow S, White K (1991). Characterization and spatial distribution of the ELAV protein during *Drosophila melanogaster* development. *J Neurobiol* 22:443-461

- 150.Rong YS, Golic KG (2000). Gene targeting by homologous recombination in *Drosophila*. *Science* 288:2013-2018
- 151.Rong YS, Golic KG (2001). A targeted gene knockout in *Drosophila*. *Genetics* 157:1307-1312
- 152.Rong YS, Titen SW, Xie HB, Golic MM, Bastiani M, Babdyopadhyay P, Olivera BM, Brodsky M, Rubin GM, Golic KG (2002). Targeted mutagenesis by homologous recombination in *D.melanogaster*. *Genes and Development* 16:1568-1581
- 153.Rubin GM, Spradling AC (1982). Genetic transformation of *Drosophila* of transposable element vectors. *Science* 218:348-353
- 154.Sanchez-Soriano S, Russel S (2000). Regulatory mutations of the *Drosophila* Sox gene *Dichaete* reveals new functions in embryonic brain and hindgut development. *Dev Biol* 220:307-321
- 155.San Martin B, Bate M (2001). Hindgut visceral mesoderm requires an ectodermal template for normal development in *Drosophila*. *Development* 128:233-242
- 156.Schmidt H, Rickert C, Bossing T, Vef O, Urban J, et al. (1997). The embryonic central nervous system lineages of *Drosophila melanogaster*. II. Neuroblast lineages derived from the dorsal part of the neuroectoderm. *Dev Biol* 189:186-204
- 157.Schneitz K, Spielmann P, Noll M (1993). Molecular genetics of *Aristaless*, a prd-type homeo box gene involved in the morphogenesis of proximal and distal pattern elements in a subset of appendages in *Drosophila*. *Genes Dev* 7:911
- 158.Seeger M, Tear G, Ferres-Marco D, Goodman CS (1993). Mutations affecting growth cone guidance in *Drosophila*: genes necessary for guidance toward or away from the midline. *Neuron* 10:409-426
- 159.Shandala T, Kortschak RD, Gregory SL, Saint R (1999). The *Drosophila* *dead ringer* gene is required for early embryonic patterning through regulation of *argos* and *buttonhead* expression. *Development* 126:4341-4349
- 160.Shuman S (1994). Novel Approach to Molecular Cloning and Polynucleotide Synthesis Using *Vaccinia* DNA Topoisomerase. *J Biol Chem* 269:32678-32684
- 161.Siegel G, Saba R, Schratt G (2011). microRNAs in neurons: manifold regulatory roles at the synapse. *Curr Opin Genet Dev* 21:491-497

- 162.Simeone A, D'Apice MR, Nigro V, Casanova J, Graziani F, Acampora D, Avantaggiato V (1994). *Orthopedia*, a novel homeobox containing gene expressed in the developing CNS of both mouse and *Drosophila*. *Neuron* 13:83-101
- 163.Singer JB, Harbecke R, Kusch T, Reuter R, Lengyel JA (1996). *Drosophila brachyenteron* regulates gene activity and morphogenesis in the gut. *Development* 122:3707-3718
- 164.Skeath JB, Carroll SB (1992). Regulation of proneural gene expression and cell fate during neuroblast segregation in the *Drosophila* embryo. *Development* 114:939-946
- 165.Smith ST, Jaynes JB (1996). A conserved region of engrailed, shared among all en-, gsc-, Nk1-, Nk2- and msh-class homeoproteins, mediates active transcriptional repression in vivo. *Development* 122:3141-3150
- 166.Smith AV, Orr-Weaver TL (1991). The regulation of the cell cycle during *Drosophila* embryogenesis: the transition to polyteny. *Development* 112:997-1008
- 167.Snow ET, Foote RS, Mitra S (1984). Base-pairing properties of O6-methylguanine in template DNA during in vitro DNA replication. *J Biol Chem* 259:8095-8100
- 168.Spradling AC und Rubin GM (1983). The effect of chromosomal position on the expression of the *Drosophila xanthine dehydrogenase* gene. *Cell* 34:47-57
- 169.Stafflinger E, Hansen KK, Hauser F, Schneider M, Cazzamali G, Williamson M, Grimmelikhuijzen CJ (2008). Cloning and identification of an oxytocin/vasopressin-like receptor and its ligand from insects. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:3262-3267
- 170.Stark A, Brennecke J, Russell RB, Cohen SM (2003). Identification of *Drosophila* MicroRNA targets. *PLoS Biol* 1:E60
- 171.Suska A, Miguel-Aliaga I, Thor S (2011). Segment-specific generation of *Drosophila* Capability neuropeptide neurons by multi-faceted Hox cues. *Dev Biol* 353:72-80
- 172.Takashima S, Mkrtchyan M, Younossi-Hartenstein A, Merriam JR, Hartenstein V (2008). The behaviour of *Drosophila* adult hindgut stem cells is controlled by Wnt and Hh signalling. *Nature* 454:651-655
- 173.Takashima S, Murakami R (2001). Regulation of pattern formation in the *Drosophila* hindgut by wg, hh, dpp and en. *Mech Dev* 101:79-90

174. Tautz D, Pfeifle C (1989). A non-radioactive in situ hybridization method for the localization of specific RNAs in *Drosophila* embryos reveals translation control for the segmentation gene hunchback. *Chromosoma* 98:81-85
175. Tayler AM, Nakano Y, Mohler J, Ingham PW (1993). Contrasting distributions of patched and hedgehog proteins in the *Drosophila* embryo. *Mech Dev* 42: 89-96
176. Teppas U, Hartenstein V (1994). The development of cellular junctions in the *Drosophila* embryo. *Dev Biol* 161:563-596
177. Teppas U, Theres C, Knust E (1990). *Crumbs* encodes an EGF-like protein expressed on apical membranes of *Drosophila* epithelial cells and required for organization of epithelia. *Cell* 61:787-799
178. Tessmar-Raible K, Raible F, Christodoulou F, Guy K, Rembold M, Hausen H, Arendt D (2007). Conserved sensory-neurosecretory cell types in annelid and fish forebrain: insights into hypothalamus evolution. *Cell* 129:1389-1400
179. Thomas JB, Bastiani MJ, Bate CM, Goodman CS (1984). From grasshopper to *Drosophila*: a common plan for neuronal development. *Nature* 310:203-207
180. Thorpe HM und Smith MCM (1998). *In vitro* site-specific integration of bacteriophage DNA catalyzed by a recombinase of the resolvase/invertase family. *PNAS* 95:5505–5510
181. Tobin SL, Cook PJ, Burn TC (1990). Transcripts of individual *Drosophila* actin genes are differentially distributed during embryogenesis. *Dev Genet* 11: 15-26
182. Treisman J, Gönczy P, Vashishtha M, Harris E, Desplan C (1989). A single amino acid can determine the DNA binding specificity of homeodomain proteins. *Cell* 59:553-562
183. Truman JW, Ball EE (1998). Patterns of embryonic neurogenesis in a primitive wingless insect, the silverfish, *Ctenolepisma longicaudata*: comparison with those seen in flying insects. *Dev Genes Evol* 208:357-368
184. Truman JW, Bate M (1988). Spatial and temporal patterns of neurogenesis in the central nervous system of *Drosophila melanogaster*. *Dev Biol* 125:145-157
185. Tucker P, Laemle L, Munson A, Kanekar S, Oliver ER, Brown N, Schlecht H, Vetter M, Glaser T (2001). The eyeless mouse mutation (*ey1*) removes an alternative start codon from the *Rx/rax* homeobox gene. *Genesis* 31:43-53

186. Unger JL, Glasgow E (2003). Expression of isotocin-neurophysin mRNA in developing zebrafish. *Gene Expression Patterns* 3:105-108
187. Urbach R, Schnabel R, Technau GM (2003). The pattern of neuroblast formation, mitotic domains, and proneural gene expression during early brain development in *Drosophila*. *Development* 130:3589–3606
188. Urbach R, Technau GM (2003). Early steps in building the insect brain: neuroblast formation and segmental patterning in the developing brain of different insect species. *Arthropod Struct Dev* 32:103-123
189. Wahl B (2005). Identifizierung und Charakterisierung von regulatorischen Elementen des retinalen Homöoboxgens (*drx*) von *Drosophila melanogaster*. Diplomarbeit, Universität des Saarlandes
190. Walldorf U, Gehring WJ (1992). *Empty spiracles*, a gap gene containing a homeobox involved in *Drosophila* head development. *EMBO J* 11:2247-2259
191. Walldorf U, Kiewe A, Wickert M, Ronshaugen M, McGinnis W (2000). *Homeobrain*, a novel paired-like homeobox gene is expressed in the *Drosophila* brain. *Mech Dev* 96:141-144
192. Weigel D, Jäckle H (1990). The fork head domain: a novel DNA binding motif of eukaryotic transcription factors? *Cell* 63(3):455-456
193. White JG, Southgate E, Thomson JN (1992). Mutations in the *Caenorhabditis elegans unc-4* gene alter the synaptic input to ventral cord motor neurons. *Nature* 355:838-841
194. White K, Grether ME, Abrams JM, Young L, Farrell K, Steller H (1994). Genetic control of programmed cell death in *Drosophila*. *Science* 264:677-683
195. Wild RJ (2004). Funktionelle und regulatorische Analyse zur Charakterisierung des retinalen Homöobox-Gens *drx* von *Drosophila melanogaster*. Diplomarbeit, Universität des Saarlandes
196. Winkler S, Loosli F, Henrich T, Wakamatsu Y, Wittbrodt J (2000). The conditional medaka mutation *eyeless uncouples* patterning and morphogenesis of the eye. *Development* 127:1911–1919
197. Winkler S, Schwabedissen A, Backasch D, Bökel C, Seidel C, Bönisch S, Fürthauer M, Kuhrs A, Cobreros L, Brand M, González-Gaitán M (2005). Target-selected mutant screen by TILLING in *Drosophila*. *Genom Res* 15:718-723
198. Wu JS, Luo L (2006). A protocol for mosaic analysis with a repressible cell marker (MARCM) in *Drosophila*. *Nat Protoc* 1: 2583- 2589

- 199.Xiong WC, Okano H, Patel NH, Blendy JA, Montell C (1994). *Repo* encodes a glial-specific homeodomain protein required in the *Drosophila* nervous system. *Genes Dev* 8:981-994
- 200.Younossi-Hartenstein A, Nassif C, Green P, Hartenstein V (1996). Early neurogenesis of the *Drosophila* brain. *J Comp Neurol* 370:313-329
- 201.Younossi-Hartenstein A, Nguyen B, Shy D, Hartenstein V (2006). Embryonic origin of the *Drosophila* brain neuropile. *J Comp Neurol* 497:981-998
- 202.Zacharias D, Williams JLD, Meier T, Reichert H (1993). Neurogenesis in the insect brain: Cellular identification and molecular characterization of brain neuroblasts in the grasshopper embryo. *Development* 118:941-955
- 203.Zhang L, Mathers PH, Jamrich M (2000). Function of Rx, but not Pax6, is essential for the formation of retinal progenitor cells in mice. *Genesis* 28:135-142

## 7. Anhang

**Tab. 7.1. Im Screen eingesetzte Defizienzstämme des Bloomington *Drosophila* Stock Centers (Indiana University, USA).**

Stamnummer	Bezeichnung	Bruchpunkte
<b>Defizienzen-Sammlung des X-Chromosoms („Deficiency Kit“ DK1):</b>		
Bl 1329	Df(1)BA1	1A1;2A
Bl 936	Df(1)64c18	2E1-2;3C2
Bl 939	Df(1)dm75e19	3C11;3E4
Bl 940	Df(1)A113	3D6-E1;4F5
Bl 944	Df(1)JC70	4C15-16;5A1-2
Bl 5705	Df(1)BA2-8	4F5;5A13
Bl 945	Df(1)C149	5A8-9;5C5-6
Bl 946	Df(1)C149	5A8-9;5C5-6
Bl 5281	Df(1)dx81	5C3-10;6C3-12
Bl 9625	Df(1)ED6878	6C12;6D8
Bl 3196	Df(1)Sxl-bt	6E2;7A6
Bl 948	Df(1)ct-J4	7A2-3;7C1
Bl 3221	Df(1)ct4b1	7B2-4;7C3-4
Bl 949	Df(1)C128	7D1;7D5-6
Bl 950	Df(1)RA2	7D10;8A4-5
Bl 951	Df(1)KA14	7F1-2;8C6
Bl 3651	Df(1)lz-90b24	8B5-6;8D8-9
Bl 952	Df(1)C52	8E;9C-D
Bl 954	Df(1)v-L15	9B1-2;10A1-2
Bl 3560	Df(1)v-N48	9F;10C3-5
Bl 962	Df(1)N105	10F7;11D1
Bl 967	Df(1)C246	11D-E;12A1-2
Bl 1039	Df(1)RK4	12F5-6;13A9-B1
Bl 7339	ln(1)AC2[L]AB[R]	9D5-E1;9E7-8 + 13B5-6;13B5-6;13E1-2
Bl 3347	Df(1)sd72b	13F1;14B1
Bl 2099	Df(1)XR38	14A;15D
Bl 125	Df(1)4b18	14B8;14C1
Bl 3217	Tp(1;2)r[+] <sup>75c</sup>	14B13;15A9
Bl 5272	Df(1)r-D1	14C5-6;15B1
Bl 4741	Df(1)B25	15D3;16A4-6
Bl 4953	Df(1)BK10	16A2;16C7-10
Bl 6217	Df(1)RR79	16C;16F
Bl 970	Df(1)N19	17A1;18A2
Bl 971	Df(1)JA27	18A5;18D

Bl 972	Df(1)HF396	18E1-2;20
Bl 977	Df(1)DCB1-35b	19F1-2;20E-F
Bl 3714	Df(1)A209	20A-20F
<b>Defizienzen-Sammlung des 2. Chromosoms („Deficiency Kit“ DK2):</b>		
Bl 3638	Df(2L)net-PMF	21A1;21B7-8
Bl 6283	Df(2L)BSC4	21B7-C1;21C2-3
Bl 8672	Df(2L)BSC106	21B8;21C4
Bl 6608	Df(2L)BSC16	21C3-4;21C6-8
Bl 3084	Df(2L)ast2	21D1-2;22B2-3
Bl 3133	Df(2L)dp-79b	22A2;22D5-E1
Bl 7144	Df(2L)BSC37	22D2-3;22F1-2
Bl 6648	Df(2L)dpp[d14]	22E4-F2;22F3-23A1
Bl 90	Df(2L)C144	22F4-23A1;23C2-4
Bl 1567	Df(2L)JS17	23C1-2;23E1-2
Bl 6875	Df(2L)BSC28	23C5-D1;23E2
Bl 6965	Df(2L)BSC31	23E5;23F4-5
Bl 6507	Df(2L)drm-P2	23F3-4;24A1-2
Bl 5330	Df(2L)ed1	24A2;24D4
Bl 693	Df(2L)sc19-8	24C2-8;25C8-9
Bl 8674	Df(2L)BSC109	25C4;25C8
Bl 7497	Df(2L)Exel6011	25C8;25D5
Bl 781	Df(2L)cl-h3	25D2-4;26B2-5
Bl 490	Df(2L)E110	25F3-26A1;26D3-11
Bl 6299	Df(2L)BSC5	26B1-2;26D1-2
Bl 6338	Df(2L)BSC6	26D3-E1;26F4-7
Bl 6374	Df(2L)BSC7	26D10-E1;27C1
Bl 2414	Df(2L)spd[j2]	27C1-2;28A
Bl 5420	Df(2L)Dwee1-W05	27C2-3;27C4-5
Bl 4956	Df(2L)XE-3801	27E2;28D1
Bl 7147	Df(2L)BSC41	28A4-B1;28D3-9
Bl 140	Df(2L)Trf-C6R31	28DE;28DE
Bl 179	Df(2L)TE29Aa-11	28E4-7;29B2-C1
Bl 2892	Df(2L)N22-14	29C1-2;30C8-9
Bl 6478	Df(2L)BSC17	30C3-5;30F1
Bl 1045	Df(2L)Mdh	30D-30F;31F
Bl 8469	Df(2L)BSC50	30F4-5;31B1-4
Bl 3366	Df(2L)J2	31B;32A
Bl 7142	Df(2L)BSC32	32A1-2;32C5-D1
Bl 7143	Df(2L)BSC36	32D1;32D4-E1

Bl 5869	Df(2L)FCK-20	32D1;32F1-3
Bl 3079	Df(2L)Pr1	32F1-3;33F1-2
Bl 6999	Df(2L)BSC30	34A3;34B7-9
Bl 3138	Df(2L)b87e25	34B12-C1;35B10-C1
Bl 3588	Df(2L)TE35BC-24	35B4-6;35F1-7
Bl 1491	Df(2L)r10	35D1;36A6-7
Bl 2583	Df(2L)cact-255rv64	35F-36A;36D
Bl 420	Df(2L)TW137	36C2-4;37B9-C1
Bl 567	Df(2L)pr-A16	37B2-12;38D2-5
Bl 167	Df(2L)TW161	38A6-B1;40A4-B1
Bl 7531	Df(2L)Exel6049	39E7;40D3
Bl 4959	Df(2L)C'	h35;h38L
Bl 749	ln(2R)bw[Vde2L]Cy[R]	h42-h43;42A2-3
Bl 1007	Df(2R)nap9	42A1-2;42E6-F1
Bl 1888	Df(2R)ST1	42B3-5;43E15-18
Bl 3368	Df(2R)cn9	42E;44C
Bl 198	Df(2R)H3C1	43F;44D3-8
Bl 201	Df(2R)H3E1	44D1-4;44F12
Bl 3591	Df(2R)Np5	44F10;45D9-E1
Bl 4966	Df(2R)w45-30n	45A6-7;45E2-3
Bl 6917	Df(2R)BSC29	45D3-4;45F2-6
Bl 9410	Df(2R)BSC132	45F6;46B12
Bl 1743	Df(2R)B5	46A;46C
Bl 1702	Df(2R)X1	46C;47A1
Bl 447	Df(2R)stan1	46D7-9;47F15-16
Bl 190	Df(2R)en-A	47D3;48B2
Bl 1145	Df(2R)en30	48A3-4;48C6-8
Bl 7145	Df(2R)BSC39	48C5-D1;48D5-E1
Bl 4960	Df(2R)CB21	48E;49A
Bl 7146	Df(2R)BSC40	48E1-2;48E2-10
Bl 5879	Df(2R)BSC3	48E12-F4;49A11-B6
Bl 754	Df(2R)vg-C	49A4-13;49E7-F1
Bl 442	Df(2R)CX1	49C1-4;50C23-D2
Bl 6516	Df(2R)BSC18	50D1;50D2-7
Bl 7875	Df(2R)Exel7130	50D4;50E4
Bl 9496	Df(2R)BSC134	50E1;50E6
Bl 7876	Df(2R)Exel7131	50E4;50F6
Bl 6455	Df(2R)BSC11	50E6-F1;51E2-4
Bl 3518	Df(2R)Jp1	51D3-8;52F5-9

Bl 3520	Df(2R)Jp8	52F5-9;52F10-53A1
Bl 7445	Df(2R)BSC49	53D9-E1;54B5-10
Bl 7414	Df(2R)BSC44	54B1-2;54B7-10
Bl 5680	Df(2R)robl-c	54B17-C4;54C1-4
Bl 5574	Df(2R)k10408	54C1-4;54C1-4
Bl 7441	Df(2R)BSC45	54C8-D1;54E2-7
Bl 6779	Df(2R)14H10Y-53	54D1-2;54E5-7
Bl 6780	Df(2R)14H10W-35	54E5-7;55B5-7
Bl 1547	Df(2R)PC4	55A;55F
Bl 757	Df(2R)P34	55E2-4;56C1-11
Bl 6647	Df(2R)BSC22	56D7-E3;56F9-12
Bl 3467	Df(2R)AA21	56F9-17;57D11-12
Bl 7896	Df(2R)Exel7162	56F11;56F16
Bl 6609	Df(2R)BSC19	56F12-14;57A4
Bl 5246	Df(2R)Egfr5	57D2-8;58D1
Bl 282	Df(2R)X58-12	58D1-2;59A
Bl 3909	Df(2R)59AD	59A1-3;59D1-4
Bl 7273	Df(2R)vir130	59B;59D8-E1
Bl 1682	Df(2R)or-BR6	59D5-10;60B3-8
Bl 9691	Df(2R)BSC155	60B9;60C4
Bl 2604	Df(2R)Px2	60C5-6;60D9-10
Bl 9069	Df(2R)ED4065	60C8;60E8
Bl 2471	Df(2R)M60E	60E2-3;60E11-12
Bl 3157	Df(2R)ES1	60E6-8;60F1-2
Bl 4961	Df(2R)Kr10	60F1;60F5
<b>Defizienzen-Sammlung des 3. Chromosoms („Deficiency Kit“ DK3):</b>		
Bl 2577	Df(3L)emc-E12	61A;61D3
Bl 439	Df(3L)Ar14-8	61C5-8;62A8
Bl 7566	Df(3L)Exel6087	62A2;62A7
Bl 600	Df(3L)Aprt-1	62A10-B1;62D2-5
Bl 2400	Df(3L)R-G7	62B4-7;62D5-E5
Bl 6755	Df(3L)BSC23	62E8;63B5-6
Bl 3650	Df(3L)M21	62F;63D
Bl 3649	Df(3L)HR119	63C2;63F7
Bl 463	Df(3L)GN34	63E6-9;64A8-9
Bl 3096	Df(3L)ZN47	64C;65C
Bl 4393	Df(3L)XDI98	65A2;65E1
Bl 6867	Df(3L)BSC27	65D4-5;65E4-6
Bl 6964	Df(3L)BSC33	65E10-F1;65F2-6

Bl 1420	Df(3L)pbl-X1	65F3;66B10
Bl 5877	Df(3L)ZP1	66A17-20;66C1-5
Bl 1541	Df(3L)66C-G28	66B8-9;66C9-10
Bl 6460	Df(3L)BSC13	66B12-C1;66D2-4
Bl 3024	Df(3L)h-i22	66D10-11;66E1-2
Bl 4500	Df(3L)Scf-R6	66E1-6;66F1-6
Bl 7079	Df(3L)BSC35	66F1-2;67B2-3
Bl 997	Df(3L)AC1	67A2;67D11-13
Bl 6471	Df(3L)BSC14	67E3-7;68A2-6
Bl 2611	Df(3L)vin5	68A2-3;69A1-3
Bl 2612	Df(3L)vin7	68C8-11;69B4-5
Bl 5492	Df(3L)eyg[C1]	69A4-5;69D4-6
Bl 6456	Df(3L)BSC10	69D4-5;69F5-7
Bl 6457	Df(3L)BSC12	69F6-70A1;70A1-2
Bl 4366	In(3LR)C190[L]Ubx[42TR]	70A1-2;70C3-4
Bl 3124	Df(3L)fz-GF3b	70C1-2;70D4-5
Bl 3126	Df(3L)fz-M21	70D2-3;71E4-5
Bl 6551	Df(3L)XG5	71C2-3;72B1-C1
Bl 3640	Df(3L)brm11	71F1-4;72D1-10
Bl 2993	Df(3L)st-fl3	72C1-D1;73A3-4
Bl 2998	Df(3L)81k19	73A3;74F
Bl 6411	Df(3L)BSC8	74D3-75A1;75B2-5
Bl 2608	Df(3L)W10	75A6-7;75C1-2
Bl 2990	Df(3L)Cat	75B8;75F1
Bl 8082	Df(3L)ED4782	75F2;76A1
Bl 6754	Df(3L)fz2	75F10-11;76A1-5
Bl 6646	Df(3L)BSC20	76A7-B1;76B4-5
Bl 5126	Df(3L)XS533	76B4;77B
Bl 2052	Df(3L)rdgC-co2	77A1;77D1
Bl 3127	Df(3L)ri-79c	77B-C;77F-78A
Bl 5878	Df(3L)ri-XT1	77E2-4;78A2-4
Bl 4429	Df(3L)ME107	77F3;78C8-9
Bl 4430	Df(3L)Pc-2q	78C5-6;78E3-79A1
Bl 8101	Df(3L)ED4978	78D5;79A2
Bl 9700	Df(3L)BSC223	79A3;79B3
Bl 5951	Df(3L)HD1	79D3-E1;79F3-6
Bl 1518	Df(3R)ME15	81F3-6;82F5-7
Bl 4787	Df(3R)3-4	82F3-4;82F10-11
Bl 5694	Df(3R)e1025-14	82F8-10;83A1-3

Bl 7623	Df(3R)Exel6144	83A6;83B6
Bl 8103	Df(3R)ED5177	83B4;83B6
Bl 7443	Df(3R)BSC47	83B7-C1;83C6-D1
Bl 1990	Df(3R)Tpl10	83C1-2;84B1-2
Bl 2393	Df(3R)WIN11	83E1-2;84A5
Bl 1884	Df(3R)Scr	84A1-2;84B1-2
Bl 1842	Df(3R)Antp17	84A5;84D9
Bl 1968	Df(3R)p712	84D4-6;85B6
Bl 1962	Df(3R)p-XT103	85A2;85C1-2
Bl 6756	Df(3R)BSC24	85C4-9;85D12-14
Bl 1931	Df(3R)by10	85D8-12;85E7-F1
Bl 7080	Df(3R)BSC38	85F1-2;86C7-8
Bl 3128	Df(3R)M-Kx1	86C1;87B1-5
Bl 3003	Df(3R)T-32	86E2-4;87C6-7
Bl 3007	Df(3R)ry615	87B11-13;87E8-11
Bl 1534	Tp(3;Y)ry506-85C	87D1-2;88E5-6
Bl 383	Df(3R)ea	88E7-13;89A1
Bl 756	Df(3R)sbd105	88F9-89A1;89B9-10
Bl 1920	Df(3R)sbd104	89B5;89C2-7
Bl 1467	Df(3R)P115	89B7-8;89E7
Bl 4431	Df(3R)DG2	89E1-F4;91B1-B2
Bl 3011	Df(3R)Cha7	90F1-F4;91F5
Bl 3012	Df(3R)DI-BX12	91F1-2;92D3-6
Bl 4962	Df(3R)H-B79	92B3;92F13
Bl 7413	Df(3R)BSC43	92F7-93A1;93B3-6
Bl 2425	Df(3R)e-N19	93B;94
Bl 3340	Df(3R)e-R1	93B6-7;93D2
Bl 2586	Df(3R)23D1	94A3-4;94D1-4
Bl 8491	Df(3R)BSC55	94D2-10;94E1-6
Bl 8583	Df(3R)BSC56	94E1-2;94F1-2
Bl 4940	Df(3R)mbc-30	95A5-7;95C10-11
Bl 2585	Df(3R)mbc-R1	95A5-7;95D6-11
Bl 7992	Df(3R)Exel9014	95B1;95D1
Bl 7675	Df(3R)Exel6196	95C12;95D8
Bl 4432	Df(3R)crb-F89-4	95D7-D11;95F15
Bl 2363	Df(3R)crb87-5	95F7;96A17-18
Bl 3468	Df(3R)slo8	96A2-7;96D2-4
Bl 7681	Df(3R)Exel6202	96C9;96E2
Bl 7682	Df(3R)Exel6203	96E2;96E6

Bl 9500	Df(3R)BSC140	96F1;96F10
Bl 5601	Df(3R)Espl3	96F1;97B1
Bl 1910	Df(3R)TI-P	97A;98A1-2
Bl 823	Df(3R)D605	97E3;98A5
Bl 7412	Df(3R)BSC42	98B1-2;98B3-5
Bl 430	Df(3R)3450	98E3;99A6-8
Bl 669	Df(3R)Dr-rv1	99A1-2;99B6-11
Bl 3547	Df(3R)L127	99B5-6;99F1
Bl 3546	Df(3R)B81	99D3;3Rt
<b>Defizienzen-Sammlung des 4. Chromosoms („Deficiency Kit“ DK1):</b>		
Bl 1785	C(4)RM	101F1;102F8
Bl 7084	Df(4)O2	<102C02;102D02>
Bl 759	Df(4)G	102E2-7;102E-F2
<b>Defizienzen, die nicht in einer der oben aufgeführten Sammlungen enthalten sind:</b>		
Bl 7784	Df(2L)Exel7014	23C4;23D1
Bl 7785	Df(2L)Exel7015	23C5;23E3
Bl 7513	Df(2L)Exel6030	33A2;33B3
Bl 7514	Df(2L)Exel6031	33B3;33C2
Bl 7515	Df(2L)Exel6032	33C2; 33D4
Bl 7516	Df(2L)Exel6033	33E4;33F2
Bl 9296	Df(2R)BSC131	46A1;46B4
Bl 9411	Df(2R)BSC133	46B4;46C1
Bl 1719	Df(2R)X3	46C;46E1,2
Bl 7541	Df(2R)Exel6059	47C5;47D6
Bl 7542	Df(2R)Exel6060	47D7;47F8
Bl 6550	Df(3L)XG4	71C1-2;71D2-E1
Bl 6555	Df(3L)XG10	71C3-E5;71C3-E5
Bl 3640	Df(3L)brm11	71F1-4;72D1-10
Bl 6603	Df(3L)X-21.2	71F1;72A2
Bl 8078	Df(3L)ED4606	72D4;73C4
Bl 8079	Df(3L)ED223	73A1;73D5
Bl 7937	Df(3L)Exel9004	73D1;73D5
Bl 7938	Df(3L)Exel7253	73D5;73E4
Bl 7610	Df(3L)Exel6131	74A1;74A1
Bl 7611	Df(3L)Exel6132	74B2;74D2
Bl 8100	Df(3L)ED4710	74D1;75B11
Bl 7919	Df(3R)Exel7379	100B2;100B5-8

**Tab. 7.2. Im Screen eingesetzte Einzelgenmutanten des Bloomington *Drosophila* Stock Centers (Indiana University, USA).**

Stamnummer	Bezeichnung
B1 2749	<i>raw</i> <sup>1</sup>
B1 3099	<i>lin</i> <sup>2</sup>
B1 7093	<i>tll</i> <sup>149</sup>
B1 7094	<i>bowl</i> <sup>1</sup>

**Tab. 7.3. Weitere im Screen eingesetzte Einzelgenmutanten.**

Bezeichnung	Herkunft
<i>byn</i> <sup>5</sup>	Singer et al., 1996

## **8. Publikationen**

Teile der Arbeit wurden auf folgenden wissenschaftlichen Fachtagungen vorgestellt:

- 6. GfE School “Cell Polarity in development and Disease“, Günzburg, 2006
- 17. GfE Tagung “Developmental Biology“, Marburg, 2007
- 7. GfE School “Cell Communication in Development and Evolution“, Günzburg, 2008

## **9. Danksagung**

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Uwe Walldorf, der es mir ermöglicht hat, meine Dissertation in der Abteilung für Entwicklungsbiologie durchzuführen. Ich bedanke mich für die Überlassung des interessanten Arbeitsthemas sowie seine stetige Unterstützung.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Uli Müller von der Fachrichtung Zoologie / Physiologie der Universität des Saarlandes für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens.

Ein großes Dankeschön allen ehemaligen und gegenwärtigen Mitarbeitern der AG Walldorf für die gute Zusammenarbeit und die angenehme Arbeitsatmosphäre. Dabei danke ich besonders Denise Dewald für Ihre Hilfsbereitschaft und Unterstützung.

Ein weiterer Dank gilt der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Peter Lipp, deren konfokales Mikroskop ich für Aufnahmen im Rahmen dieser Arbeit benutzen durfte.

Ich danke allen Freunden und Verwandten, darunter auch meinem Patenkind Luca, für die Ablenkung vom Laboralltag.

Ich danke meinen Eltern, ohne deren Unterstützung mein Studium und meine Dissertation nicht möglich gewesen wären.

## 10. Lebenslauf

**Name:** Nicole Michaela Bach

**Geburtsdatum:** 30.11.1980

**Geburtsort:** Homburg

**Schulbildung:** 1987-1991:  
Grundschule Langenäcker, Homburg-Erbach  
1991-2000:  
Christian von Mannlich Gymnasium, Homburg

**Studium:** Oktober 2000 - November 2005:  
Studium der Biologie mit Schwerpunkt Human- und  
Molekularbiologie an der Universität des Saarlandes  
Vordiplom: 02.04.2003  
Diplom: 10.11.2005  
Prüfungsfächer:  
Entwicklungsbiologie, Humangenetik, Pharmakologie  
Thema der Diplomarbeit:  
Charakterisierung des Homöobox-Gens *orthopedia* der  
Fruchtfliege *Drosophila melanogaster*

**Promotion:** April 2006:  
Beginn der Doktorarbeit in der Arbeitsgruppe von Prof.  
Dr. Uwe Walldorf in der Abteilung für  
Entwicklungsbiologie, Universität des Saarlandes