

**Analyse der Expression und Regulation  
der neuronalen Transkriptionsfaktoren  
Orthopedia, *Drosophila* Retinal Homeobox, Homeobrain und Earmuff  
während der Nervensystementwicklung  
von *Drosophila melanogaster***

Dissertation

zur Erlangung des Grades

des Doktors der Naturwissenschaften

der Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät

der Universität des Saarlandes

von

**Kirsten Hildebrandt**

(M.Sc.)

Saarbrücken

2023

Tag des Kolloquiums: 17. Februar 2023

Dekan: Prof. Dr. Ludger Santen

Berichterstatter: Prof. Dr. Uwe Walldorf  
Prof. Dr. Martin Simon  
Prof. Dr. Anette Preiss

Akad. Mitglied: Dr. Nicole Ludwig

Vorsitz: Prof. Dr. Alexandra K. Kiemer

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>1</b>
1.1	Analyse der Expression und Regulation der neuronalen Transkriptionsfaktoren Orthopedia, <i>Drosophila</i> Retinal Homeobox, Homeobrain und Earmuff während der Nervensystementwicklung von <i>Drosophila melanogaster</i> .....	1
1.2	Analysis of expression and regulation of the neural transcription factors Orthopedia, <i>Drosophila</i> Retinal Homeobox, Homeobrain and Earmuff during nervous system development of <i>Drosophila melanogaster</i> .....	1
<b>2</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>3</b>
2.1	<i>Drosophila melanogaster</i> als Modellorganismus .....	3
2.2	Die Gehirnentwicklung von <i>Drosophila melanogaster</i> .....	7
2.3	Das Homeoboxgen <i>orthopedia (otp)</i> .....	16
2.4	Die Feinregulation der Genexpression durch microRNAs .....	19
2.5	Die neuronalen Transkriptionsfaktoren <i>Drosophila</i> Retinal Homeobox (DRx), Homeobrain (Hbn) und Earmuff (Erm) .....	23
2.6	Zielsetzung der Arbeit .....	27
<b>3</b>	<b>Material und Methoden</b> .....	<b>28</b>
3.1	Material .....	28
3.1.1	Bakterienstämme .....	28
3.1.2	DNA-Klone .....	28
3.1.3	Vektorkarten .....	29
3.1.4	Fliegenstämme .....	31
3.1.5	Antikörper .....	34
3.1.5.1	Primäre Antikörper .....	34
3.1.5.2	Sekundäre Antikörper .....	35
3.1.6	Restriktionsenzyme und Puffer .....	35
3.1.7	Oligonukleotide (Primer) .....	36
3.1.8	Geräte .....	37
3.1.9	Kits .....	39
3.1.10	Bezugsquellen .....	39
3.1.11	Lösungen und Puffer .....	40
3.1.12	Medien .....	42
3.2	Methoden .....	43
	<i>Arbeiten mit Nukleinsäuren</i> .....	43
3.2.1	Präparation genomischer DNA aus 15 Fliegen .....	43
3.2.2	Restriktionsverdau .....	43

3.2.3	Standard-Polymerasekettenreaktion (PCR) .....	43
3.2.4	Zwei-Schritt reverse Transkriptions- und quantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (RT-qPCR) .....	44
3.2.4.1	RNA-Isolation.....	45
3.2.4.2	cDNA-Synthese .....	45
3.2.4.3	qPCR-Durchführung.....	46
3.2.4.4	qPCR-Auswertung.....	47
3.2.5	Elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten in Agarosegelen .....	47
3.2.6	DNA-Isolation aus Agarosegelen .....	47
3.2.7	Fällung von restriktionsverdauten Vektoren.....	48
3.2.8	Dephosphorylierung von Vektoren mit rAPid Alkaline Phosphatase.....	48
3.2.9	Anfügen von A-Überhängen.....	48
3.2.10	Herstellung chemisch kompetenter Zellen (Rubidiumchlorid-Methode) .....	48
3.2.11	Testen der Transformationseffizienz chemisch kompetenter Zellen.....	49
3.2.12	Transformation von chemisch kompetenten DH5 $\alpha$ -Zellen mit Plasmid-DNA .....	49
3.2.13	Schnell-Transformation von chemisch kompetenten BL21-Zellen mit Plasmid-DNA ...	50
3.2.14	Kolonie-PCR .....	50
3.2.15	Isolation von Plasmid-DNA mittels Alkalischer Lyse (Minipräparation).....	50
3.2.16	Plasmid-Isolation mit Aufreinigungs-Kits .....	51
3.2.17	Klonierung von PCR-Produkten in den pCR <sup>®</sup> 2.1 TOPO <sup>®</sup> Vektor (ThermoFisher Scientific) .....	51
3.2.18	Klonierungsstrategie für die Reintegration der <i>homeobrain</i> Exons 2 und 3 in den <i>Genetargeting</i> -Stamm 34G10,35A03 <sup>GT</sup> mithilfe des Reintegrationsvektors RIV <sup>white</sup> .....	52
3.2.19	Klonierungsstrategie zur Herstellung von GST-Fusionsproteinen.....	53
<i>Arbeiten mit Proteinen</i> .....		54
3.2.20	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	54
3.2.21	Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen über Glutathion-Sepharose im Batch-Verfahren.....	55
3.2.21.1	Zellpräparation .....	55
3.2.21.2	Vorbereitung der Matrix.....	55
3.2.21.3	Proteinaufreinigung.....	55
<i>Arbeiten mit Drosophila melanogaster</i> .....		56
3.2.22	Fliegenzucht.....	56
3.2.23	Letalitätsanalyse .....	56
3.2.24	Absammeln von virginellen Weibchen (Jungfrauen) für Kreuzungen.....	56
3.2.25	Rekombination .....	57

3.2.26	Durchführung einer Keimbahntransformation .....	57
3.2.26.1	Injektionsmaterial.....	57
3.2.26.2	Absammeln, Dechorionieren und Aufreihen von Embryonen .....	57
3.2.26.3	Injektion.....	58
3.2.26.4	Behandlung injizierter Embryonen.....	58
3.2.26.5	Selektion von Transformanten .....	58
3.2.27	Balancierung transgener Fliegen .....	59
<i>Histologische Methoden</i> .....		59
3.2.28	Absammeln und Fixieren von Embryonen zur Immunfluoreszenzfärbung bzw. zur <i>in situ</i> Hybridisierung.....	59
3.2.29	Präparation und Fixierung von larvalen und adulten Geweben zur Immunfluoreszenzfärbung.....	60
3.2.30	Präadsorption von primären Antikörpern.....	60
3.2.31	Immunfluoreszenzfärbungen an <i>Drosophila</i> -Embryonen und -Gewebe .....	60
3.2.32	<i>In situ</i> Hybridisierung an <i>Drosophila</i> -Embryonen .....	61
<i>Mikroskopie</i> .....		62
3.2.33	Lichtmikroskopie .....	62
3.2.34	Fluoreszenzmikroskopie .....	62
3.2.35	Konfokale Mikroskopie.....	63
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>64</b>
4.1	Untersuchung der Expression des Homeoboxgens <i>orthopedia (otp)</i> .....	64
4.1.1	Analyse der wildtypischen Otp-Expression im embryonalen, larvalen und adulten Gehirn .....	65
4.1.2	Überprüfung verschiedener <i>otp</i> -Mutanten .....	68
4.1.3	Untersuchung der Transkriptvarianten von <i>otp</i> .....	71
4.2	Untersuchung der Regulation von <i>otp</i> .....	85
4.2.1	Untersuchung der Interaktion der microRNA miR-252 mit <i>otp</i> .....	85
4.2.2	Analyse der Auswirkung eines miR-252 <i>Knockouts</i> auf die Otp-Expression .....	90
4.3	Untersuchung der Expression und Regulation der Gene <i>Drosophila Retinal Homeobox (DRx)</i> , <i>homeobrain (hbn)</i> und <i>earmuff (erm)</i> .....	92
4.3.1	Herstellung und Untersuchung von <i>DRx</i> -, <i>hbn</i> - und <i>erm</i> -Gal4-Treiberstämmen .....	92
4.3.2	Analyse spezifischer <i>DRx</i> -, <i>hbn</i> - und <i>erm</i> -Enhancer.....	98
<b>5</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>106</b>
5.1	Die Expression von Orthopedia (Otp).....	106
5.2	Otp-exprimierende Zelllineages im Zusammenhang mit dem olfaktorischen System .....	109
5.3	Otp im Evo-Devo-Kontext.....	113

5.4	Verifizierung des <i>otp</i> -Punktmutationsstammes <i>otp</i> <sup>1024</sup> durch Sequenzierung.....	122
5.5	Die Expression der Transkriptvarianten <i>otp</i> -RC und <i>otp</i> -RE in Embryo, Larve und Fliege..	123
5.6	Interaktion der microRNA miR-252 mit <i>otp</i> .....	128
5.7	Die Expression und Regulation von <i>DRx</i> , <i>hbn</i> und <i>erm</i> .....	135
<b>6</b>	<b>Verzeichnisse</b> .....	<b>142</b>
6.1	Literaturverzeichnis .....	142
6.2	Abbildungsverzeichnis .....	171
6.3	Tabellenverzeichnis .....	173
6.4	Abkürzungsverzeichnis .....	174
<b>7</b>	<b>Publikationen</b> .....	<b>183</b>
<b>8</b>	<b>Danksagung</b> .....	<b>184</b>

# 1 Zusammenfassung

## 1.1 Analyse der Expression und Regulation der neuronalen Transkriptionsfaktoren Orthopedia, *Drosophila* Retinal Homeobox, Homeobrain und Earmuff während der Nervensystementwicklung von *Drosophila melanogaster*

Neben der essentiellen Funktion für die Entwicklung des Enddarms ist der Transkriptionsfaktor Orthopedia (Otp) auch an der Gehirnentwicklung von *Drosophila melanogaster* beteiligt. Das Homeoboxgen *otp* verfügt über zwei Transkriptvarianten, die im Embryo gewebespezifisch im Enddarm bzw. im Zentralnervensystem exprimiert werden. In dieser Arbeit wird die Otp-Expression im embryonalen, larvalen und adulten Gehirn beschrieben und definierten Zelllineages zugeordnet. Außerdem wird gezeigt, dass die kürzere Transkriptvariante auch in Larve und Fliege ortsspezifisch nur im Enddarm exprimiert wird, die längere Variante im larvalen und adulten Stadium aber sowohl im Gehirn als auch im Enddarm nachweisbar ist. Da Beobachtungen im Embryo darauf hinweisen, dass *otp* im Ventralnervensystem posttranskriptionell reguliert wird, wird die Interaktion der microRNA miR-252 mit der 3'UTR von *otp* verifiziert und ein miR-252 KO-Stamm auf Abweichungen in der Otp-Expression untersucht. Zusätzlich wird außerdem der EMS-induzierte Mutationsstamm *otp*<sup>1024</sup> mittels Sequenzierung als *otp*-Mutante verifiziert. Zur Untersuchung der neuronalen Transkriptionsfaktoren *Drosophila* Retinal Homeobox, Homeobrain und Earmuff werden außerdem je ein neuer, genspezifischer Gal4-Treiberstamm hergestellt und analysiert, der jeweils das gesamte Expressionsmuster des jeweiligen Gens repräsentiert, sowie unterschiedliche genspezifische Enhancer-Deletionsstämme auf ihre Effekte auf die Expression des jeweiligen Gens untersucht.

## 1.2 Analysis of expression and regulation of the neural transcription factors Orthopedia, *Drosophila* Retinal Homeobox, Homeobrain and Earmuff during nervous system development of *Drosophila melanogaster*

Besides being essential for the development of the hindgut, the transcription factor Orthopedia (Otp) is also involved in the brain development of *Drosophila melanogaster*. Two transcript versions of the homeoboxgene *otp* are known which are expressed tissue-specifically in the hindgut respectively in the central nervous system of the embryo. This work describes the Otp-expression in the embryonic, larval and adult brain and relates it to defined cell lineages. Furthermore, it shows that the shorter

transcript version is expressed tissue-specifically only in the larval and adult hindgut like in the embryo, while the longer transcript version is not only detectable in the central nervous system, but also in the hindgut of larva and fly. Since studies in the embryo indicate a posttranscriptional regulation of *otp* in the ventral nerve cord, a verification of interaction of the microRNA miR-252 with the *otp* 3'UTR is done and a miR-252 KO-strain is examined for deviations in the Otp expression pattern. In addition, the EMS-induced mutant fly strain *otp*<sup>1024</sup> is verified as *otp*-mutant by sequencing. To study the neural transcription factors *Drosophila* Retinal Homeobox, Homeobrain and Earmuff, a new gene-specific Gal4 strain for each of them is produced and analyzed, representing the overall expression pattern of the respective gene, and different gene-specific enhancer deletion strains are examined for their effects on the expression of the respective gene.



## 2 Einleitung

### 2.1 *Drosophila melanogaster* als Modellorganismus

Die Taufliege *Drosophila melanogaster* stellt einen wichtigen Modellorganismus mit großer Bedeutung für die Genetik und die Entwicklungsbiologie dar. Bereits im frühen 20. Jahrhundert wurde sie von Biologen wie William Ernest Castle oder Thomas Hunt Morgan für systematische und genetische Untersuchungen gezüchtet und weist eine Vielzahl von Vorteilen für die Forschung auf.

Aufgrund ihrer geringen Größe und der damit einhergehenden einfachen Kultivierung ist eine unkomplizierte, kostengünstige Haltung in großer Anzahl möglich. Ihre kurze Generationszeit von etwa 12 Tagen sowie die hohe Fertilität erlauben die Untersuchung vieler Nachkommen in einer geringen Zeitspanne. Die Entwicklung der bis zu 100 Eier pro Weibchen am Tag erfolgt außerhalb des Körpers der Mutter, was die Untersuchung der Embryonalentwicklung und die Mikromanipulation erleichtert. Zudem wurde das etwa 14.000 Gene codierende Genom bereits komplett sequenziert (Adams *et al.*, 2000). Es umfasst  $1,6 \times 10^5$  kb und besteht aus vier Chromosomenpaaren, die sich aus drei Autosomen- und einem Geschlechtschromosomenpaar zusammensetzen. Viele der Gene sind hochkonserviert und bilden Homologe zu etwa 75 % der bekannten menschlichen Krankheitsgene (Bier *et al.*, 2005). Dabei handelt es sich um Gene, die für Entwicklungsdefekte verantwortlich sind, die neurodegenerative Erkrankungen auslösen oder die an der Krebsentstehung beteiligt sind (Reiter *et al.*, 2001; Bier *et al.*, 2005). Damit eignet sich *Drosophila melanogaster* auch hervorragend als Modell für genetisch bedingte Krankheiten.

Die Embryonalentwicklung der Taufliege wird in 17 Stadien eingeteilt (Campos-Ortega und Hartenstein, 1997) und findet innerhalb von etwa 24 h statt. Zu Beginn tritt das Spermium am anterioren Ende des Eis durch die Mikropyle ein, was die Verschmelzung der Zellkerne und schnelle Kernteilungen zur Folge hat. Da sich aber hierbei das Zytoplasma nicht teilt, entsteht ein sogenanntes Synzytium. Im 4. Embryonalstadium bildet sich durch die Wanderung der Zellkerne in die Peripherie das synzytiale Blastoderm, wonach in Stadium 5 Membranen von der Oberflächenmembran um die Zellkerne eingezogen werden und sich ein zelluläres Blastoderm entwickelt. In Stadium 6 und 7 beginnt mit der Bildung der Keimblätter die Gastrulation und die Ventral- und die Kopffurche entstehen. Der Keimstreif bildet sich aus Mesoderm und Ektoderm und vollzieht während der folgenden Stadien die sogenannte Keimstreifausstreckung. Die Segmentierung beginnt in Stadium 10, bevor sich der Keimstreif in den Embryonalstadien 12 und 13 wieder zurückzieht. Die Kopfeinstülpung und der Dorsalschluss finden in Stadium 14 und 15 statt, und in Stadium 16 folgen

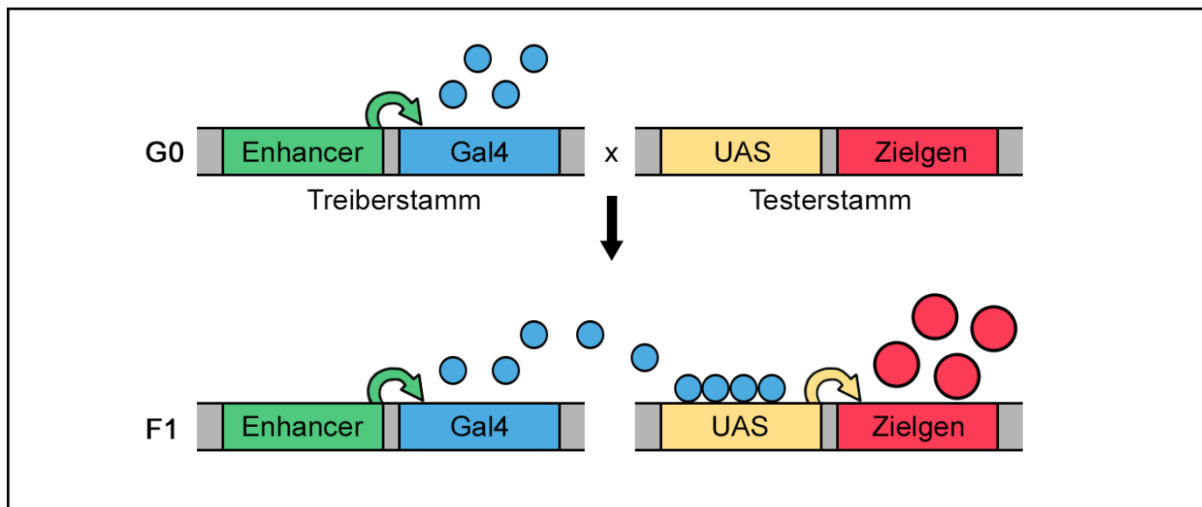
weitere Differenzierungen. Im letzten Embryonalstadium füllen sich die Tracheen mit Luft, bevor die Larve schlüpft.

Die Larve durchläuft drei Larvalstadien, wobei unter anderem die Proliferation der Imaginalscheiben einen wichtigen Teil der Entwicklung bildet. Die Imaginalscheiben sind bereits im Embryo angelegt und entwickeln sich während der späteren Verpuppung durch Ausstülpung zu den Körperteilen der adulten Tiere. Dabei bilden jeweils die Zentren der Augen-, Antennen-, Halteren-, Bein- und Flügel-Imaginalscheiben die anteriore Region der späteren Körperteile. Nach 5 bis 7 Tagen im Puppenstadium schlüpft die adulte Fliege.

Während der Etablierung von *Drosophila melanogaster* als Modellorganismus wurden zahlreiche Methoden zur Genmanipulation und -untersuchung entwickelt. Klassische Mutationen sowie genmanipulierte Fliegenstämme, die homozygot letale Genveränderungen tragen, können mithilfe von sogenannten Balancerchromosomen heterozygot stabil gehalten werden. Ein Balancerchromosom enthält optisch selektierbare Marker, Inversionen, um Rekombination zu verhindern, und rezessiv letale Mutationen, um Fliegen, die das Balancerchromosom homozygot tragen, auszuschließen. So wird gewährleistet, dass eine homozygot letale Genveränderung im betroffenen Fliegenstamm erhalten bleibt und untersucht werden kann.

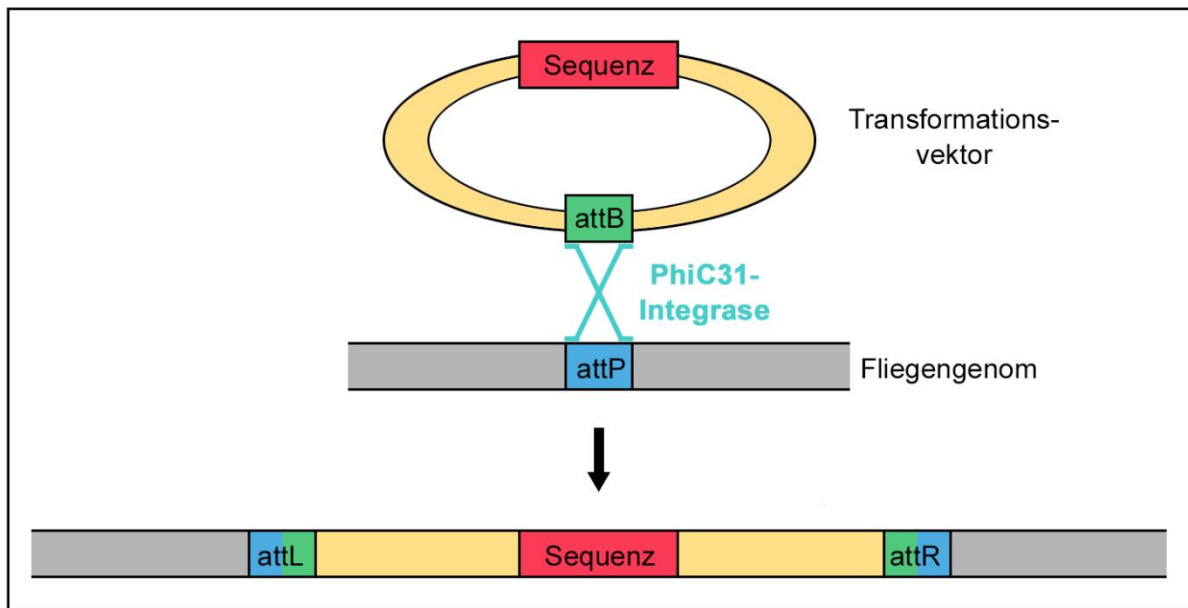
Eine Möglichkeit zur zeit- und ortsspezifischen, ektopischen Expression von Genen in *Drosophila melanogaster* bildet das UAS/Gal4-System (Abb. 2.1) (Brand und Perrimon, 1993; Duffy, 2002). Das Gal4-Gen stammt natürlicherweise aus dem Genom von Hefen und codiert für einen Transkriptionsfaktor, der Gene des Galaktosemetabolismus in Abhängigkeit von Glukose und Galaktose aktiviert. In der regulatorischen Region dieser Gene befinden sich die zugehörigen responsiven Elemente, die *Upstream Activating Sequence* (UAS)-Bindestellen, an die die Gal4-Transkriptionsfaktoren binden und so die Transkription der Gene induzieren. Sowohl das Gal4-Gen als auch UAS-Bindestellen können über Vektoren in das *Drosophila*-Genom integriert werden. Dazu wird das Gal4-Gen, das unter der Kontrolle eines Minimalpromotors steht, hinter ein ausgewähltes regulatorisches Element (Enhancer) kloniert, um in dessen Muster exprimiert zu werden. Gleichzeitig wird das zu exprimierende Gen hinter UAS-Bindestellen kloniert. So können dann der Gal4-enthaltende Treiberstamm und der UAS-enthaltende Testerstamm hergestellt werden, wobei weder die Gal4-Expression noch die UAS-Integration einen Effekt auf die jeweiligen Fliegen haben. Erst die Nachkommen aus Kreuzungen von Treiber- und Testerstamm exprimieren die Gal4-Transkriptionsfaktoren in dem zeit- und ortsspezifischen Muster, das der vorangeschaltete Enhancer vorgibt, und weisen außerdem das zu exprimierende Gen hinter UAS-Bindestellen auf. So wird gewährleistet, dass die Transkription des Gens durch die Bindung der Gal4-Transkriptionsfaktoren an

die UAS-Bindestellen aktiviert und das Gen in dem vorgegebenen Muster des gewählten Enhancers ekto­pisch exprimiert wird.



**Abbildung 2.1: Allgemeiner Mechanismus des UAS/Gal4-Systems zur ekto­pischen Expression eines Zielgens in *Drosophila melanogaster*.** Im Treiberstamm liegt das Gal4-Gen hinter einen bestimmten Enhancer kloniert und integriert im Genom vor, wo es nach dem spezifischen Muster, das durch den Enhancer vorgegeben wird, exprimiert wird. Der Testerstamm trägt das Zielgen hinter den UAS-Bindestellen. In den Nachkommen (F1) aus einer Kreuzung von Treiber- und Testerstamm liegen beide Komponenten des Systems vor, wodurch die Gal4-Transkriptionsfaktoren die UAS-Stellen binden und dadurch die ekto­pische Expression des Zielgens, die durch den Gal4-vorgeschalteten Enhancer festgelegt wird, aktivieren.

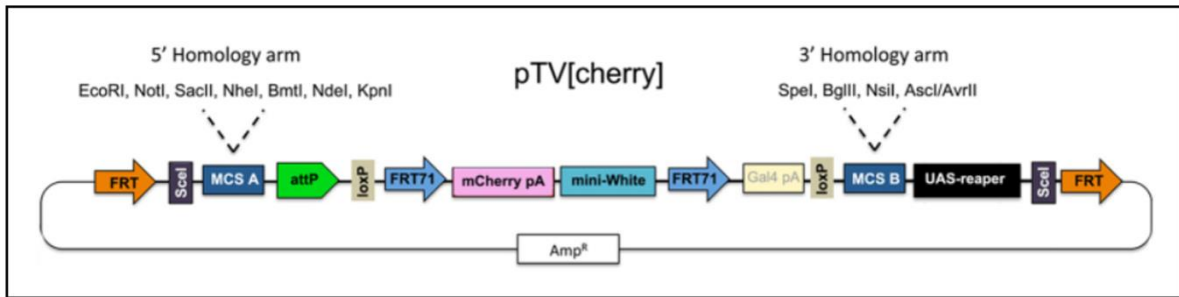
Um gewünschte DNA-Sequenzen, wie zum Beispiel Gal4-Gen- oder UAS-Sequenzen-enthaltende Vektoren, in das Genom der Fliege einzubringen, kann beispielsweise die PhiC31-vermittelte Keimbahntransformation verwendet werden (Abb. 2.2). Hierbei handelt es sich um eine gerichtete Transformation an genau definierten Stellen im Genom (Groth *et al.*, 2004). Das Enzym Integrase aus dem Bakteriophagen PhiC31 führt dabei eine stabile, effiziente und sequenzspezifische Rekombination zwischen einer Phagen-spezifischen *Attachment-Site* (attP) und einer bakteriellen *Attachment-Site* (attB) aus (Thorpe und Smith, 1998). Diese Rekombination erfolgt über eine nur 3 bp lange, gemeinsame Sequenz der beiden *Attachment-Sites* und ist irreversibel, da sich attP- und attB-*Site* währenddessen sequenziell vermischen und als attL- und attR-*Site* mit zwischenliegendem Plasmidkonstrukt mitsamt der gewünschten, einzubringenden Sequenz im Genom resultieren (Rausch und Lehmann, 1991). Zur PhiC31-vermittelten Keimbahntransformation stehen Fliegenstämme mit genau definierten attP-*Sites* und einer endogenen Integrasequelle zur Verfügung (Bischof *et al.*, 2007), es besteht aber auch die Möglichkeit, die Integrase in einen attP-*Site*-enthaltenden Stamm einzukreuzen.



**Abbildung 2.2: Mechanismus der PhiC31-vermittelten Transformation.** Die Integrase des Bakteriophagen PhiC31 rekombiniert irreversibel und sequenzspezifisch zwischen der Phagen-spezifischen attP-Site und der bakteriellen attB-Site, was dazu verwendet werden kann, gewünschte Sequenzen über attB-Site-tragende Transformationsvektoren ins Fliegen-genom einzubringen.

Um eine PhiC31-vermittelte Keimbahntransformation durchführen zu können, wird also ein Fliegenstamm benötigt, bei dem eine attP-Site genau definiert im Genom vorliegt. Eine solche Site kann beispielsweise mithilfe der P-Element-vermittelten Keimbahntransformation in das Genom der Fliege eingebracht werden (Rubin und Spradling, 1982). P-Elemente sind transposable Elemente, die für das Enzym Transposase codieren und terminal sogenannte *inverted repeats*, also entgegengesetzte Wiederholungssequenzen, besitzen, um transponieren zu können. Im Gegensatz zu dem UAS/Gal4-System und dem PhiC31-System stammen P-Elemente natürlicherweise aus *Drosophila*. Sie können leicht modifiziert als nicht-autonome P-Elemente und Teil eines Vektors zum *Genetargeting* verwendet werden, die zwar die *inverted repeats* zum Transponieren enthalten, aber nicht für die Transposase codieren. Deswegen müssen sie von einem sogenannten Helferplasmid mobilisiert werden, das über die Transposase-codierende Sequenz verfügt. Das Helferplasmid selbst kann nicht transponieren, da Teile des rechten *inverted repeats* fehlen, was als ‚wing clipped‘ bezeichnet wird (Laski *et al.*, 1986; Karess und Rubin, 1984).

Ein Beispiel für einen Vektor, der ein nicht-autonomes P-Element enthält, ist der Vektor pTV[cherry] (Abb. 2.3) (Baena-Lopez *et al.*, 2013). Nach zufälliger Integration in das Genom dient dieser dem *Genetargeting* durch zielgerichtete Deletion von DNA-Sequenzen mithilfe von homologer Rekombination.



**Abbildung 2.3:** Der zur P-Element-vermittelten Keimbahntransformation zu verwendende Targetingvektor pTV[cherry] (Baena-Lopez *et al.*, 2013). Enthalten sind zwei *Multiple Cloning Sites* (MCS) mit verschiedenen Restriktionsenzymstimmstellen zum Einbringen der Homologiesequenzen des gewünschten Gens, Homologiearme genannt, das Markergen *mini-White* zur Identifikation von transformierten Fliegen, FRT-, loxP- und I-SceI-Sequenzen zur Durchführung der homologen Rekombination, UAS-*reaper*-Sequenzen zur Eliminierung von falsch-positiven Fliegen, das Fluoreszenzreportergen *cherry*, eine *attP*-Site und das *Gal4*-Gen zur anschließenden weiteren Untersuchung des hergestellten Fliegenstammes (Quelle: Baena-Lopez *et al.*, 2013).

Hierzu enthält er zwei *Multiple Cloning Sites* (MCS) zum Einfügen von zwei sogenannten Homologiearmen. Diese bestehen aus Sequenzen, die der zu deletierenden Sequenz genau benachbart liegen und über die die homologe Rekombination stattfindet. Außerdem enthält der Vektor das Markergen *mini-White* zur Identifikation von transformierten Fliegen, FRT (*Flippase Recognition Target*)-, loxP- und I-SceI-Sequenzen zur Linearisierung des Konstrukts und zur Entfernung von nach der Transposition nicht mehr benötigten Komponenten. Die UAS-*reaper*-Sequenz dient der Eliminierung falsch-positiver Fliegen und weitere im Vektor enthaltene Faktoren, wie eine *attP*-Site oder das *mCherry*-Fluoreszenzreportergen, können sich bei der anschließenden Untersuchung erfolgreich rekombinierter Fliegen zunutze gemacht werden.

## 2.2 Die Gehirnentwicklung von *Drosophila melanogaster*

Die Entwicklung des *Drosophila*-Gehirns beginnt in Embryonalstadium 8 und erstreckt sich über alle folgenden embryonalen, larvalen und puppalen Entwicklungsstadien.

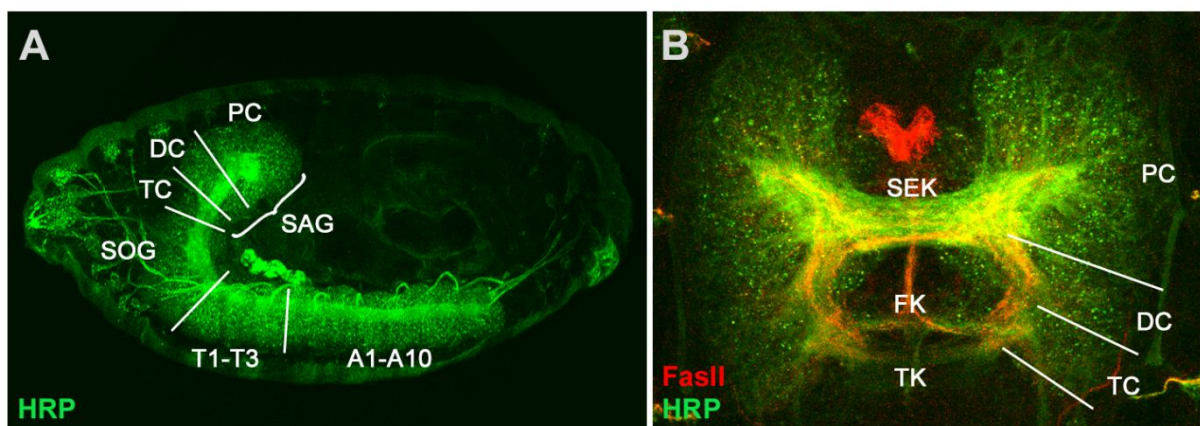
Das embryonale Nervensystem besteht aus dem Gehirn, dem Ventralnervensystem und dem peripheren Nervensystem (Abb. 2.4 A). Es bildet sich während der Gastrulation in Embryonalstadium 8 aus dem Neuroektoderm, einer neurogenen Region aus etwa 2000 Zellen, die symmetrisch zu beiden Seiten der Ventralfurche des Embryos lokalisiert sind. Dabei entsteht das Ventralnervensystem aus dem ventralen Neuroektoderm und das Gehirn aus dem procephalischen Neuroektoderm (Younossi-Hartenstein *et al.*, 1996; Urbach und Technau, 2003). Die Zellen des Neuroektoderms bilden proneurale Kompetenzgruppen aus jeweils fünf bis sechs Zellen, wobei sie alle durch die Aktivität proneuraler Gene, besonders der des Achaete-scute Komplexes, neurale Kompetenz erhalten und damit das Potential, neurales Schicksal einzuschlagen (Bate, 1976, Doe und

Goodman, 1985a). Die Auswahl und Ausgrenzung der jeweiligen neuralen Stammzelle, des sogenannten Neuroblasten, erfolgt innerhalb der proneuralen Kompetenzgruppen über den Prozess der Notch-vermittelten Lateralinhibition. Hierbei exprimieren alle Zellen der proneuralen Kompetenzgruppe zunächst den Notchrezeptor sowie den Notchliganden Delta im Gleichgewicht, was direkte Zell-Zell-Interaktionen ermöglicht (Doe und Goodman, 1985b). Ein Anstieg der Delta-Konzentration in einer der Zellen, dem späteren Neuroblasten, führt zur Aktivierung des Notch-Signalwegs in den umgebenden Zellen. Dort erfolgt die nukleare Translokation der intrazellulären Notch-Komponente, die den Transkriptionsfaktor Suppressor of Hairless (Su(H)) aktiviert. Su(H) aktiviert wiederum die Gene des Enhancer of Split Komplexes, wodurch die proneuralen Gene des Achaete-scute Komplexes reprimiert werden und so die Neurogenese in diesen Zellen inhibiert wird. Das führt zu einer Herunterregulation von Delta, sodass in diesen Zellen anschließend die epidermale Entwicklung eingeleitet wird und sie als Epidermoblasten die ventrale bzw. Kopfepidermis bilden (Skeath und Carroll, 1992). Im späteren Neuroblasten steigt dagegen die Aktivität der proneuralen Gene und somit auch die Delta-Expression durch einen positiven *Feedback-Loop* an, was dazu führt, dass die Notch-Signalkaskade in den benachbarten Zellen noch weiter hochreguliert wird, während die selektierte Zelle neurales Schicksal einschlägt (Singson *et al.*, 1994).

In der ausgegrenzten Neuroblasten-Vorläuferzelle führen die durch die proneuralen Gene exprimierten bHLH (*basic Helix-Loop-Helix*)-Transkriptionsfaktoren Lethal of Scute, Achaete, Scute und Asense zur Neuroblasten-Entwicklung. Lethal of Scute, Achaete und Scute werden bereits in allen Zellen der proneuralen Kompetenzgruppe exprimiert und führen zur Selektion der jeweiligen neuralen Vorläuferzelle. Bevor die Neuroblasten sich zu teilen beginnen, werden diese Transkriptionsfaktoren herunterreguliert (Cubas *et al.*, 1991; Skeath und Carroll, 1991). Asense wird dagegen erst nach der Selektion exprimiert und ist für die korrekte Differenzierung wichtig (Jarman *et al.*, 1993). Im procephalischen Neuroektoderm können auch mehrere Neuroblasten aus einer proneuralen Kompetenzgruppe entstehen (Younossi-Hartenstein *et al.*, 1996; Urbach *et al.*, 2003). In Embryonalstadium 9 beginnen die Neuroblasten zu wachsen, in mehreren Wellen aus dem Ektoderm zu delaminieren (Hartenstein und Campos-Ortega, 1984) und durchlaufen anschließend asymmetrische, selbstregenerative Teilungen, in denen jeder Neuroblast pro Teilung eine Ganglionmutterzelle (GMC), die die neuralen Vorläuferzellen darstellen, bildet (s. Abb. 2.6 A) (Bossing *et al.*, 1996; Schmidt *et al.*, 1997). Dabei befinden sich die genetischen Determinanten zur Festlegung der GMC-Identität im basalen Teil des Neuroblasten. Die GMCs teilen sich einmal, wobei zwei Neurone entstehen (Prokop und Technau, 1991; Technau *et al.*, 2006; Boone und Doe, 2008). So generiert ein Neuroblast seine embryonale Lineage, die die Abstammungslinie aller Zellen, die embryonal aus einem Neuroblasten entstehen, bezeichnet. Dadurch entstehen die zwei

Hemisphären des embryonalen Gehirns, die abschließend aus je etwa 1500 primären Neuronen bestehen. Die primären Axone verzweigen sich in den Embryonalstadien 16 und 17.

Letztendlich sind etwa 100 bilateral angeordnete Neuroblasten für die Bildung des embryonalen Gehirns verantwortlich (Goodman und Doe, 1993; Younossi-Hartenstein *et al.*, 1996; Urbach und Technau, 2003, Truman *et al.*, 2004). Es lässt sich in zwei Ganglien, das suboesophageale Ganglion (SOG) aus dem mandibularen, maxillaren und labialen Neuomer und das supraoesophageale Ganglion (SAG) aus dem protocerebralen, deutocerebralen und tritocerebralen Neuomer, einteilen (Abb. 2.4 A). Aufgrund dieser Einteilung entsteht auch die Unterteilung der Hemisphären in Protocerebrum (PC), Deutocerebrum (DC) und Tritocerebrum (TC), die durch die drei Kommissuren supraoesophageale (SEK), Frontal- (FK) und tritocerebrale (TK) Kommissur sowie zwei longitudinale Haupttrakte miteinander verknüpft sind (Abb. 2.4 B).



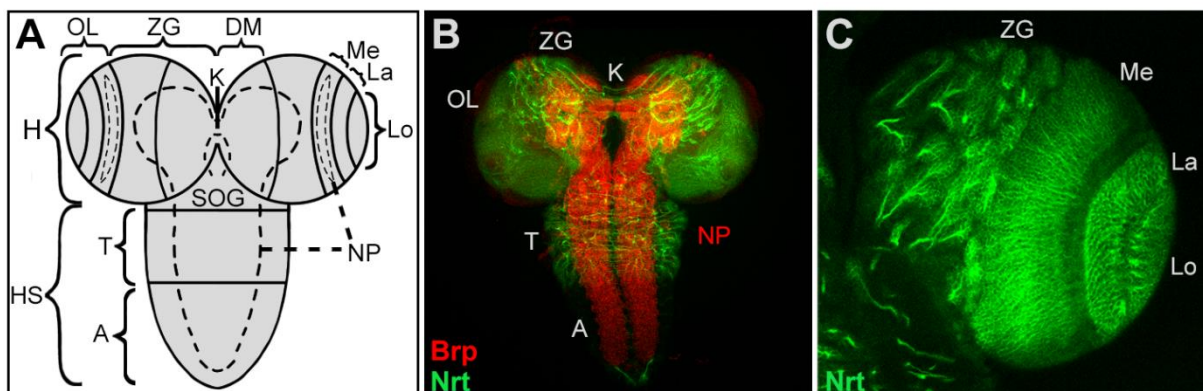
**Abbildung 2.4: Aufbau des embryonalen Nervensystems von *Drosophila melanogaster*.** (A) *Drosophila*-Embryo in Lateralansicht, anterior ist links, Embryonalstadium 16. Immunfluoreszenzfärbung mit Anti-HRP in Grün zur Verdeutlichung des embryonalen Nervensystems. (B) Embryonales Gehirn in Dorsalansicht, anterior ist unten, Embryonalstadium 16. Immunfluoreszenzfärbung mit Anti-HRP in Grün und Anti-FasII in Rot zur Darstellung der Gehirnstrukturen. A1–A10, Abdominalsegmente 1–10; DC, Deutocerebrum; FK, Frontalkommissur; PC, Protocerebrum; SAG, supraoesophageales Ganglion; SEK, supraoesophageale Kommissur; SOG, suboesophageales Ganglion; T1–T3, Thorakalsegmente 1–3; TC, Tritocerebrum; TK, tritocerebrale Kommissur.

Im ventralen Neuroektoderm delaminieren etwa 30 Neuroblasten pro Hemisegment in Wellen im Verlauf der Keimstreifenausstreckung, wobei sich die meisten als Typ I Neuroblast teilen (s. Abb. 2.6 A). Die neurale Differenzierung beginnt in Embryonalstadium 13, in dem sich Pioniertrakte an der dorsalen Oberfläche des Ventralnervensystems bilden, entlang welcher sich später Axone orientieren. So entstehen in jedem Segment des ventralen Nervensystems longitudinale Konnektive und transversale Kommissuren. In Embryonalstadium 14 beginnt das ventrale Nervensystem zu kondensieren.

Am Ende der embryonalen Gehirnentwicklung werden bis zu 40 % der Neurone durch Apoptose abgebaut, allerdings wird ihre Zellsubstanz durch Differenzierungszunahme der Synapsen ausgeglichen (Larsen *et al.*, 2009). Zurück bleiben die primären Neurone, die das funktionale, frühe

larvale Gehirn bilden. Ist die Embryonalentwicklung abgeschlossen, treten die meisten Neuroblasten in eine Ruhephase ein und werden erst im 2. Larvalstadium reaktiviert (Datta, 1995). Anschließend folgt die postembryonale Neuroblastenproliferation, die sich bis in die späten Pupalstadien erstreckt. Nur die vier Neuroblasten, die den *Mushroom Body* (MB) generieren, proliferieren auch im ersten Larvalstadium weiter, ohne in die Ruhephase einzutreten (Kunz *et al.*, 2012). Sie bilden im Verlauf der Entwicklung je etwa 200 adult-spezifische MB-Neurone, die Kenyonzellen genannt werden (Ito und Hotta, 1992).

Das larvale Gehirn besteht aus zwei Hemisphären (H), die in der dorsomedialen Region (DM) durch eine Kommissur (K) verbunden sind, und dem Hirnstamm (HS), wobei der Übergang zwischen Hemisphären und Hirnstamm durch das SOG gebildet wird (Abb. 2.5 A und B). Die Hemisphären bestehen aus dem Zentralgehirn (ZG) und den optischen Loben (OL), die in die optischen Areale Medulla (Me), Lamina (La) und Lobula (Lo) eingeteilt werden (Abb. 2.5 A und C). Diese bilden die Verarbeitungsareale der visuellen Informationen. Der Hirnstamm gliedert sich in thorakale (T) und abdominale Segmente (A) (Abb. 2.5 A und B).



**Abbildung 2.5: Aufbau des larvalen Gehirns von *Drosophila melanogaster*.** Larvalstadium 3, Dorsalansicht, anterior ist oben. (A) Schematische Darstellung des larvalen Gehirns. (B) Immunfluoreszenzfärbung mit Anti-Brp zur Darstellung des Neuropils und Anti-Nrt zur Veranschaulichung der postembryonalen Neurone und ihrer Axone. (C) Vergrößerte Ansicht der rechten Hemisphäre mit Nrt-Immuno-färbung. A, Abdominalsegmente des Hirnstammes; DM, Dorsomedialregion des Zentralgehirns; H, Hemisphäre; HS, Hirnstamm; La, Lamina; Lo, Lobula; Me, Medulla; NP, Neuropil; OL, optische Lobe; SOG, suboesophageales Ganglion; T, Thorakalsegmente des Hirnstammes; ZG, Zentralgehirn.

In Zentralgehirn und Hirnstamm befindet sich neben den Zelllineages das Neuropil (NP), wo die Axone, Dendriten und Gliazellfortsätze verzweigen und die jeweiligen Zellen untereinander verschaltet werden (Abb. 2.5 A und B). Das Neuropil der OL, in dem alle Axone der Zellen der OL münden, wird Plexus genannt und liegt im Bereich der Medulla (Abb. 2.5 A). Die sekundären Neurone, die später den Großteil des adulten Gehirns bilden, orientieren sich während ihrer Entwicklung an der Oberfläche des larvalen Gehirns und projizieren ihre Axone entlang der primären Axontrakte (PAT) der primären Neurone. Dabei bilden sie die sekundären Axontrakte (SAT) (Spindler und Hartenstein, 2010).



Die Typ I Lineages bilden den Großteil der Lineages und das Neuropil im Zentralgehirn und im Hirnstamm. Sie finden ihren Ursprung in Typ I Neuroblasten, die, wie bereits beim embryonalen Gehirn beschrieben, GMCs bilden, die sich wiederum in zwei Neurone teilen (Abb. 2.6 A). Acht Neuroblasten, die nach der dorsomedialen (DM) bzw. dorsolateralen (DL) Lage ihrer Lineages im larvalen Gehirn benannt sind (Izergina *et al.*, 2009), stellen sich dagegen als Typ II Neuroblasten dar. Sie bilden in einer asymmetrischen, selbstregenerierenden Teilung zunächst eine intermediäre neurale Vorläuferzelle (INP), die wiederum in mehrfachen asymmetrischen, selbstregenerierenden Teilungen GMCs hervorbringt (Abb. 2.6 B). Auf diese Weise entstehen viel mehr Neurone bzw. viel größere Lineages aus einem Typ II Neuroblasten als aus einem Typ I Neuroblasten (Bello *et al.*, 2008; Boone und Doe, 2008; Bowman *et al.*, 2008). Terminal ist in Typ II Lineages auch Gliazellbildung möglich (Abb. 2.6 B). Diese Neurogenese ist vergleichbar mit der Entwicklung des Säuger-Zentralnervensystems, wobei ebenfalls intermediäre Vorläuferzellen gebildet werden, um die zelluläre Nachkommenschaft zu amplifizieren (Sawamoto *et al.*, 2001; Gal *et al.*, 2006; Mizutani *et al.*, 2007).

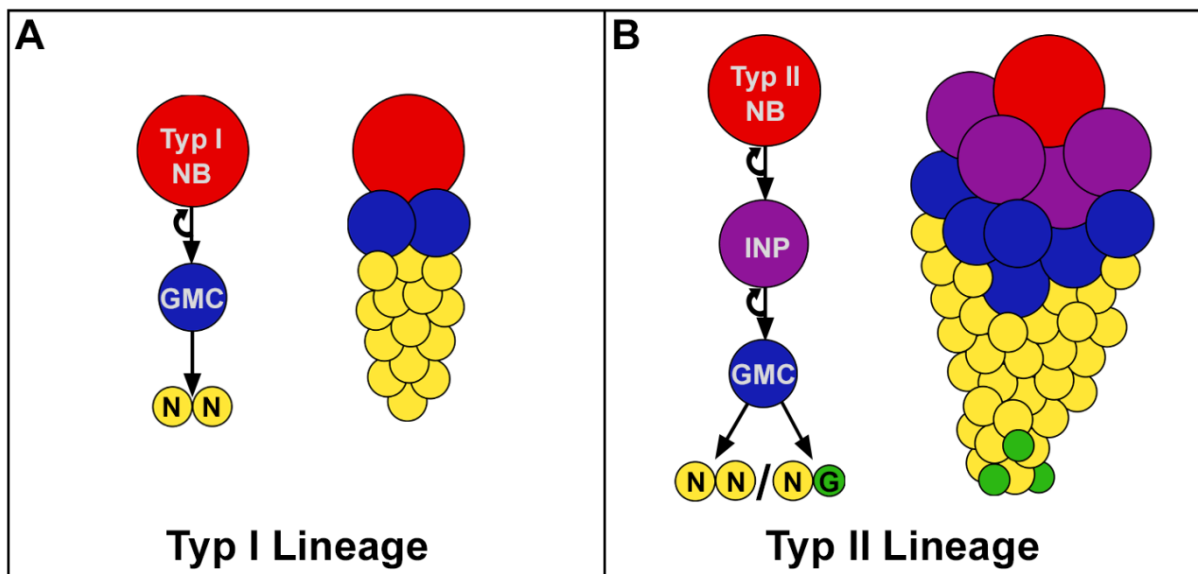


Abbildung 2.6: Grafische Darstellung des Teilungsschemas von Typ I und Typ II Neuroblasten sowie Typ I und Typ II Lineages. G, Gliazelle; GMC, Ganglionmutterzelle; INP, intermediäre neurale Vorläuferzelle; N, Neuron; NB, Neuroblast.

Mit Ausnahme der OL-Neuroblasten, die durch proneurale Induktion im larvalen OL-Neuroepithel entstehen, sind alle larvalen Neuroblasten embryonalen Ursprungs (Apitz *et al.*, 2015). Die Entstehung der Lineages findet zeit- und ortsspezifisch statt, wobei nach Vollenden der Lineages die Teilung der den Lineages zugrunde liegenden Neuroblasten durch Austritt aus dem Zellteilungszyklus oder Apoptose gestoppt wird (Bello *et al.*, 2003; Cenci und Gould, 2005; Maurange *et al.*, 2008; Homem *et al.*, 2014; Yang *et al.*, 2017). Die Typ I Neuroblasten der abdominalen Segmente des Hirnstammes treten bereits während der Larvalstadien in die Apoptose ein, die Typ II Neuroblasten und ihre INPs treten am Ende der Larvalentwicklung aus dem Zellteilungszyklus aus und die Typ I

Neuroblasten des Zentralgehirns und der thorakalen Segmente verlassen den Zellteilungszyklus während der Puppalentwicklung (Maurange *et al.*, 2008; Homem *et al.*, 2014; Weng und Cohen, 2015). Als letzte noch aktive Neuroblasten treten die vier MB-Neuroblasten während der Puppalentwicklung in die Apoptose ein (Siegrist *et al.*, 2010).

In der postembryonalen Phase entstehen die sekundären Neurone, die den Großteil der Masse des adulten Gehirns und Lineage-ähnliche Cluster unreifer Neurone bilden. Diese breiten Neuriten ins Neuropil aus, aber bilden erst nach der Metamorphose Synapsen und schließen so die finale Morphogenese ab (Dumstrei *et al.*, 2003; Truman *et al.*, 2004; Pereanu und Hartenstein, 2006; Zheng *et al.*, 2006). 90 % des adulten Gehirns bestehen aus sekundären Neuronen, die während der postembryonalen Entwicklung erzeugt werden (Sousa-Nunez *et al.*, 2010). Die Lineages, die im larvalen Gehirn entstehen, sind größer als die, deren Ursprung embryonal ist. Typ I Neuroblasten bilden etwa 100–120 Neurone pro Lineage und Typ II Neuroblasten etwa 450 Neurone pro Lineage (Bello *et al.*, 2008). Die sechs DM Neuroblasten generieren so über 5000 adult-spezifische Zellen (Bello *et al.*, 2008), die, gemessen an der Zellzahl, etwa ein Viertel der Gesamtmasse des adulten Gehirns bilden (Ito und Awasaki, 2008). Dabei handelt es sich um protocerebrale Neurone und Gliazellen, die vor allem an der Bildung des Zentralkomplexes des adulten Gehirns beteiligt sind (Izergina *et al.*, 2009). Aus den sekundären Lineages und ihren Ausläufern, die im larvalen Gehirn entstehen, bilden sich die Strukturen des reifen, adulten Gehirns.

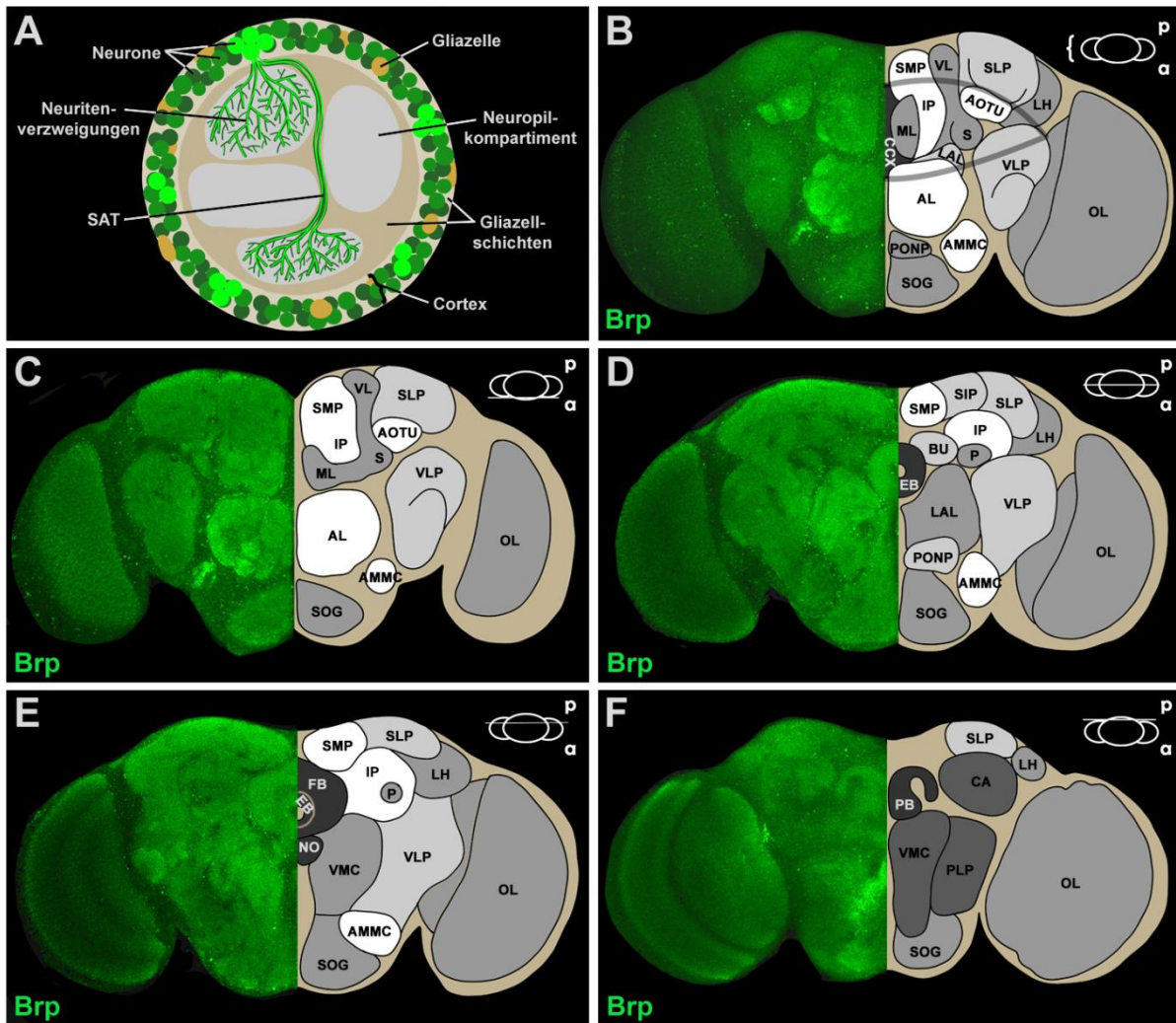
Das adulte Zentralgehirn besteht aus etwa 10.000 bis 15.000 Neuronen pro Hemisphäre, deren Zellkörper sich im äußeren Cortex des Gehirns befinden (Abb. 2.7 A) (Pereanu *et al.*, 2010). Dieser umrandet das Neuropil, das aus den Neuriten der Neurone besteht (Abb. 2.7 A). Das Gehirn kann in verschiedene Neuropil-Kompartimente eingeteilt werden, die reich an Synapsen und terminalen Neuritenverzweigungen sind (Abb. 2.7 B–F). In ihnen findet die Prozessierung aller neuronalen Signale statt. Zum Großteil können die Kompartimente durch Gliazellschichten und Bündel von langen Neuritfasern, den Gehirnfaszikeln, seltener auch durch eine alleinige Veränderung der Neuropil-Dichte voneinander abgegrenzt und definiert werden. Die meisten Gehirnfaszikel des adulten Gehirns werden während der Larvalentwicklung durch die sekundären Axontrakte (SAT) der Lineages gebildet (Abb. 2.7 A) (Pereanu und Hartenstein, 2006). Die SAT stellen auch die Verbindung von Kompartimenten untereinander dar und bilden während der Puppalentwicklung dendritische und axonale Auswüchse. Gemeinsam mit dem Einwachsen sensorischer und OL-Axone führt das zum Wachstum der Neuropilkompartimente, das zwischen larvalen und adultem Gehirn zu beobachten ist (Pereanu *et al.*, 2010).

Die Aufteilung des adulten Gehirns in drei Bereiche kann aufgrund der Lage von Zentralkomplex und *Mushroom Bodies* (MBs) erfolgen (Abb. 2.7 B rechts, durch graue Linien abgetrennte Bereiche) (Ito *et*

*al.*, 2014; Peraanu *et al.*, 2010). Auch in der anterior-posterioren Achse des Gehirns unterscheiden sich die Kompartimente je nach betrachteter Ebene (Abb. 2.7 C–F).

Im dorsalen Bereich des adulten Gehirns befinden sich die Kompartimente laterales Horn (LH), das eine Schlüsselrolle im angeborenen Verhalten spielt (Abb. 2.7 B, D–F), und *superior* Protocerebrum, das in mediales (SMP), intermediäres (SIP) und laterales (SLP) *superior* Protocerebrum eingeteilt wird (Abb. 2.7 B–F).

Der mittlere Bereich besteht aus den Kompartimenten Zentralkomplex (CCX), Lateralkomplex, *Mushroom Body* (MB), anteriores optisches *Tubercle* (AOTU) und *inferior* Protocerebrum (IP). Der Lateralkomplex beinhaltet unter anderem die Kompartimente laterale *Accessorylobe* (LAL) und *Bulb* (BU), die als Portalstellen für Input und Output der Signale in den und aus dem CCX dienen (Abb. 2.7 B, D). Die MBs erhalten massiven Input von den antennalen Loben (AL) und spielen eine Schlüsselrolle in olfaktorischem Lernen und Gedächtnis (Turner *et al.*, 2008). Im glomerular aufgebauten Calyx (CA) des MBs werden die eingehenden Signale verschaltet und prozessiert (Abb. 2.7 F). Weiter gehören *Sporn* (S) (Abb. 2.7 B, C), *Peduncle* (P) (Abb. 2.7 D, E) sowie die mediale (ML) und vertikale Lobe (VL) (Abb. 2.7 B, C) zum Aufbau eines MB. Das IP bildet das Zentrum jeder Hemisphäre und umrahmt das *Peduncle* des MB (Abb. 2.7 B–E). Das AOTU ist das primäre Eingangszentrum der Neuronenprojektionen der Medulla und somit eine wichtige Struktur zur Verarbeitung visuellen Inputs und Weiterleitung zum BU (Abb. 2.7 B, C) (Omoto *et al.*, 2017). Im Gegensatz zu allen anderen Kompartimenten, die in paariger Anordnung einmal pro Hemisphäre auftreten, befinden sich die Kompartimente des CCX in einfacher Ausführung in der Mitte des Gehirns. Zum CCX zählen die protocerebrale Brücke (PB) (Abb. 2.7 F), der *Fan-shaped Body* (FB) (Abb. 2.7 E), der *Ellipsoid Body* (EB) (Abb. 2.7 D, E) und das bilaterale Paar kleiner globulärer Noduli (NO) (Abb. 2.7 E) (Hanesch *et al.*, 1989). Der FB, der in den Prozess des visuellen Gedächtnisses involviert ist, und der EB, der am visuellen Lernen und räumlichen Gedächtnis beteiligt ist, bilden den Zentralkörper des CCX und sorgen für die Verbindung von AL und CA (Neuser *et al.*, 2008; Ofstad *et al.*, 2011). Die PB ist ein längliches Neuropil, das sich zwischen den CAs der MBs erstreckt. Der CCX ist mit vielen Arealen des umgebenden Protocerebrums und dem Lateralkomplex verbunden, aber nur indirekt mit sensorischen Regionen. Dennoch erhält er starken indirekten sensorischen Input und ist von großer Bedeutung für die Prozessierung einer Vielzahl von visuellen, mechanosensorischen und olfaktorischen Signalen und auch für das visuelle, olfaktorische und gustatorische Lernen (Loesel *et al.*, 2002; Ofstad *et al.*, 2011). Auch Schlüsselrollen in der lokomotorischen Kontrolle (Strauss und Heisenberg, 1993), der räumlichen Orientierung (Neuser *et al.*, 2008; Triphan *et al.*, 2010) und dem *Arousal*, was den allgemeinen Grad der Aktivierung des Zentralnervensystems beschreibt (Lebestky *et al.*, 2009; Kong *et al.*, 2010), werden dem Zentralkomplex zugesprochen.



**Abbildung 2.7: Aufbau des adulten *Drosophila*-Gehirns in anteriorer Ansicht. (A)** Schematische Darstellung des strukturellen Aufbaus des adulten Gehirns. Die Neurone bilden gemeinsam mit Gliazellen den äußeren Cortex des Gehirns. Die Neuriten führen in Neuropilkompartimente, die durch Gliazellschichten und Gehirnfazikel, zum größten Teil SATs (sekundäre Axontrakte), voneinander abgegrenzt werden und in denen die Neuritenverzweigung, Synapsenbildung und Signalprozessierung stattfindet. **(B–F)** Konfokalmikroskopische Aufnahme eines halben adulten Gehirns mit Brp-Immunfluoreszenzfärbung zur Darstellung der Neuropil-Kompartimente (links) und grafische Darstellung der anderen Gehirnhälfte (rechts) in verschiedenen Ebenen von anterior **(C)** nach posterior **(F)**. Die Position der jeweiligen Ebene durch das Gehirn ist in jedem Abbildungsteil grafisch dargestellt. **(B)** Darstellung des gesamten Gehirns. Die grauen Linien umranden den mittleren Bereich des adulten Gehirns, der sich an der Lage des Zentralkomplex (CCX) orientiert. AL, antennale Lobe; AMMC, antennales mechanosensorisches Motorzentrum; AOTU, anteriores optisches *Tubercle*; BU, *Bulb*; CA, Calyx des *Mushroom Body*; CCX, Zentralkomplex; EB, *Ellipsoid Body*; FB, *Fan-shaped Body*; IP, *inferior Protocerebrum*; LAL, laterale *Accessorylobe*; LH, laterales Horn; ML, mediale Lobe des *Mushroom Body*; NO, Noduli; OL, optische Lobe; P, *Peduncle*; PB, protocerebrale Brücke; PLP, posterolaterales Protocerebrum; PONP, periesophageales Ganglion; S, *Sporn*; SIP, intermediäres *superior Protocerebrum*; SLP, laterales *superior Protocerebrum*; SMP, mediales *superior Protocerebrum*; SOG, suboesophageales Ganglion; VL, vertikale Lobe des *Mushroom Body*; VLP, ventrolaterales Protocerebrum; VMC, ventromediales Cerebrum. Kompartimentbezeichnung nach Pereanu *et al.*, 2010.

Zum ventralen Bereich des adulten Gehirns zählen das ventro- und posterolaterale Protocerebrum (VLP und PLP), die antennale Lobe (AL), das ventromediale Cerebrum (VMC), das antennale mechanosensorische und Motorzentrum (AMMC), das periesophageale Ganglion (PONP) und das suboesophageale Ganglion (SOG). Die glomerular aufgebaute AL (Abb. 2.7 B, C) bildet die primäre olfaktorische Gehirnregion, in der die Signale der olfaktorischen Rezeptorneurone eingehen und die Verschaltung und Weiterleitung in die höher liegenden Gehirnregionen MB und LH stattfindet. Im

AMMC (Abb. 2.7 B–E) findet die Verarbeitung mechanosensorischer Reize statt, die über das Johnston-Organ der Antennen aufgenommen werden, wie Geräusche, Schwerkraft oder Wind (Kamikouchi *et al.*, 2009; Yorozu *et al.*, 2009; Matsuo *et al.*, 2014). Das PONP (Abb. 2.7 B, D) bildet einen der Gehirnbereiche, die zur Weiterleitung von Signalen aus dem Gehirn in die Thorax-Ganglien zuständig sind (Hsu und Bhandawat, 2016). Das SOG (Abb. 2.7 B–F) ist das primäre Geschmackszentrum, in dem gustatorische Neurone aus dem distalen Rüsselbereich eingehen und verschaltet und verarbeitet werden (Wang *et al.*, 2004).

Neben den Kompartimenten des Zentralgehirns zählen außerdem noch die Kompartimente der OL, Lamina, Medulla und Lobula, die die ersten Stationen der Verarbeitung visueller Informationen darstellen, zum adulten *Drosophila*-Gehirn.

Mithilfe der SAT, die sich während der Larvalentwicklung an den primären Axontrakten (PAT) entlangorientieren, die gegen Ende der Embryonalentwicklung gebildet werden und gemeinsam mit Gliazellen die Neuropil-Kompartimente des larvalen Gehirns bilden (Nassif *et al.*, 1998; 2003; Younossi-Hartenstein *et al.*, 2006), können alle Neuropil-Kompartimente, die im späten Embryo und frühen larvalen Gehirn zu sehen sind, über Larval- und Pupalentwicklung bis ins adulte Gehirn beobachtet werden (Younossi-Hartenstein *et al.*, 2006). So sind beispielsweise die AL und die LAL des adulten Gehirns in der Larve als basales anterior-antennales Kompartiment (BA) und basales zentrales Kompartiment (BC) zu sehen, die in beiden Entwicklungsstadien auch dieselbe Funktion haben (Stocker, 1994; Peraanu *et al.*, 2010). Das laterale und medial-ventrale IP sowie der CCX werden durch das zentrale postero-laterale (CPL), das zentrale postero-intermediäre (CIP) und das zentrale postero-mediale (CPM) Kompartiment der Larve aufgebaut, und der durch Neuriten der vier MB-Lineages gebildete CA gilt sowohl in Larve als auch adultem Tier als Eingangszentrum der BA- bzw. AL-Signale (Peraanu *et al.*, 2010). Das anteriore SMP des adulten Gehirns hat seinen Ursprung im dorsalen anterioren Kompartiment (DA) der Larve, das posteriore SMP im dorsalen posterioren Kompartiment (DP) (Peraanu *et al.*, 2010). Im Gegensatz dazu sind keine larvalen Vorläufer von LH sowie SLP und SIP in Kompartimentform zu finden, da diese Kompartimente aus einer dünnen Neuropilschicht des larvalen Gehirns, die CPLd (dorsaler Bereich des CPL) genannt wird, entstehen (Peraanu *et al.*, 2010).

## 2.3 Das Homeoboxgen *orthopedia (otp)*

Homeoboxgene codieren für Homeodomänenproteine, die eine Familie von Transkriptionsfaktoren darstellen. Transkriptionsfaktoren binden spezifisch DNA-Sequenzen, wodurch deren Transkription reguliert wird, und werden anhand der Struktur ihrer DNA-Bindedomäne unterschieden. Die DNA-Bindedomäne von Homeodomänenproteinen besteht aus 60 Aminosäuren und wird als Homeodomäne bezeichnet, die diese Region codierende DNA-Sequenz aus 180 bp wird Homeobox genannt. Im Bereich der Homeodomäne falten sich Homeodomänenproteine in drei Helices, wobei über eine Helix die spezifische DNA-Bindung erfolgt und zwei Helices ein Helix-Turn-Helix-Motiv bilden. Dieses ist charakteristisch für Transkriptionsfaktoren, die die große Furche der DNA-Doppelhelix binden (Otting *et al.*, 1990; Percival-Smith *et al.*, 1992).

Homeoboxgene können in zwei Hauptklassen unterschieden werden, die HOX-Gene und die *paired (prd)-like* Homeoboxgene. Die HOX-Gene sind mit dem Gen *Antennapedia* verwandt (Lewis, 1978). Wenn sie mutiert sind, rufen sie homeotische Transformationen hervor (McGinnis *et al.*, 1984), wobei eine bestimmte Struktur eines Körpersegments in ein anderes Körpersegment transformiert wird. In *Drosophila* gibt es zwei Komplexe homeotischer Gene, den aus fünf Genen bestehenden Antennapedia-Komplex und den drei Gene enthaltenden Bithorax-Komplex (Lewis, 1978; Kaufman *et al.*, 1980), die in der Reihenfolge ihrer Lokalisation auf dem Chromosom zeitlich und räumlich entlang der Längsachse des Embryos exprimiert werden (Carroll, 1995). Die *prd-like* Homeoboxgene, zu denen *otp* zählt, sind mit dem Gen *paired* verwandt und lassen sich in Q<sub>50</sub>, S<sub>50</sub> und K<sub>50</sub> *prd-like* Homeoboxgene untergliedern (Galliot *et al.*, 1999). Diese tragen einen Glutamin-, Serin- oder Lysinrest an der Aminosäureposition 50 innerhalb der Homeodomäne, der entscheidend für die spezifische DNA-Bindung ist (Treisman *et al.*, 1989; Pellizzari *et al.*, 1997). S<sub>50</sub> *prd-like* Homeoboxgene besitzen eine *prd*-Domäne als zweite, zusätzliche DNA-Bindedomäne, die bei den Q<sub>50</sub> und K<sub>50</sub> *prd-like* Homeoboxgenen fehlt (Bopp *et al.*, 1986; Frigerio *et al.*, 1986; Schneitz *et al.*, 1993).

*Otp* zählt zu den Q<sub>50</sub> *prd-like* Homeoboxgenen und wurde erstmalig von Simeone *et al.* in *Drosophila* und der Maus beschrieben (Simeone *et al.*, 1994). Es trägt am Carboxyterminus, wie etwa die Hälfte der *prd-like* Homeoboxgene, eine OAR (Otp, Aristaless, Rx)-Domäne, die zuerst bei den Genen *otp*, *aristaless* und *Rx* entdeckt wurde und das Protein in seiner Transaktivatorfunktion unterstützt (Furukawa *et al.*, 1997; Eggert *et al.*, 1998). *Otp* ist evolutiv vor allem in der Homeodomäne hoch konserviert. Die Expression unterscheidet sich je nach Organismus, findet aber immer in Geweben ektodermaler Herkunft statt. In Invertebraten ist *otp* in unterschiedlichen Geweben und an verschiedenen Musterbildungsprozessen beteiligt. So dient es beispielsweise im Seeigel *Paracentrotus lividus* als Schlüsselregulator der Morphogenese des embryonalen Skelettsystems

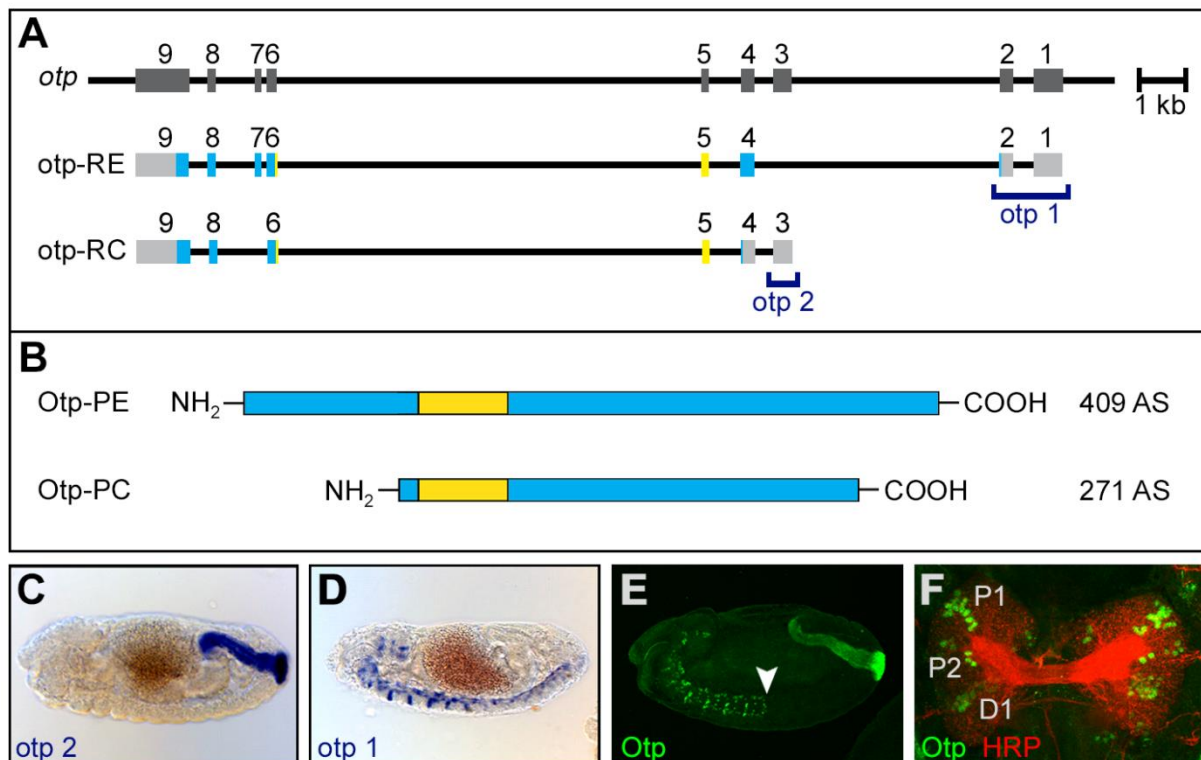
(Di Bernardo *et al.*, 1999; 2000; Cavalieri *et al.*, 2003) und in der Napfschnecke *Patella vulgata* der Entwicklung des apikalen sensorischen Organs (Nederbragt *et al.*, 2002). Innerhalb der Vertebraten stellt sich die Homeodomäne in allen untersuchten Organismen als komplett identisch dar (Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information (NCBI), Protein-Datenbank, Stand 09.2022). Die Expression erfolgt in neuralen Geweben, wobei *otp* eine essentielle Funktion für die richtige Determinierung von Zelllinien im neuroendokrinen Hypothalamus zugeschrieben wird (Wang und Lufkin, 2000; Acampora *et al.*, 1999). Im Zebrafisch *Danio rerio* wird *otp* in spezifischen Zellen des Diencephalon, der preoptischen Region und in catecholaminergen Neuronen im Rückenmark exprimiert (Del Giacco *et al.*, 2006; Blechman *et al.*, 2007), in der Maus im Diencephalon, Rhombencephalon sowie im Rückenmark und trägt zur essentiellen Entwicklung des Hypothalamus bei (Simeone *et al.*, 1994; Acampora *et al.*, 1999; 2000). Im Huhn findet die Expression ebenfalls in spezifischen Regionen des Hypothalamus statt (Caqueret *et al.*, 2005). Im Menschen wird *otp* im distinkten Bereich des Vorderhirns, im Hypothalamus und im *Corpus amygdaloideum* exprimiert und wirkt bei der emotionalen und der neuroendokrinen Hirnfunktion mit (Lin *et al.*, 1999). Die menschliche *otp*-Sequenz ist zu 99 % identisch mit der Aminosäure-Sequenz der Maus. Die Sequenz der Homeodomäne von *otp* ist zwischen dem Menschen und *Drosophila* zu 93 % identisch.

In *Drosophila* ist *otp* zusammen mit den Homeoboxgenen *Drosophila Retinal Homeobox (DRx)* (Eggert *et al.*, 1998; Davis *et al.*, 2003) und *homeobrain (hbn)* (Walldorf *et al.*, 2000) in der 57B-Region auf dem rechten Arm des 2. Chromosoms lokalisiert (s. Abb. 2.11). Im Zusammenhang mit diesen beiden Genen wird es zu den Gehirn-Transkriptionsfaktoren gezählt, die sich für die Proliferation der Neuroblasten im anterioren Bereich des Nervensystems, und damit für die Gehirnentwicklung, förderlich zeigen (Curt *et al.*, 2019). Auch das Zinkfingerprotein Earmuff (Erm) ist hierfür von Bedeutung (s. Abb. 2.11). *Otp* zeigt in der Homeodomäne eine hohe Sequenzhomologie zu den Genen *orthodenticle* und *Antennapedia*, woraus die Benennung resultiert.

Mithilfe von cDNA-Analysen konnten bislang neun Transkripte von *otp* ermittelt werden (Flybase FB2022\_04; Thurmond *et al.*, 2019), die sich anhand ihrer Expressionsdaten und ihrer Exonbeschaffenheit am 5'-Ende in zwei verschiedene Varianten-Klassen einteilen lassen. Die 2,3 kb langen Transkriptvarianten *otp-RC*, *otp-RF*, *otp-RG* und *otp-RH* mit Translationsstart in Exon 4 beginnen mit Exon 3 und werden zu Exon 4 gespliced, während die 2,9 kb langen Transkriptvarianten *otp-RE*, *otp-RI*, *otp-RJ*, *otp-RK* und *otp-RL* mit Translationsstart in Exon 2 die Exons 1 und 2 besitzen und zu Exon 4 gespliced werden (Abb. 2.8 A). Unabhängig von den beiden Varianten-Klassen enthalten die Transkripte *otp-RE*, *otp-RF*, *otp-RH* und *otp-RK* Exon 7, während bei den anderen Transkripten darüber hinweggespliced wird. Neben dem Unterschied in der Transkriptlänge weichen

die beiden Transkriptvarianten auch im frühesten Zeitpunkt ihrer Expression voneinander ab, wobei die 2,3 kb langen Transkriptvarianten bereits in 3 bis 6 Stunden alten Embryonen detektiert werden können, während die 2,9 kb langen Transkriptvarianten erst in 9 bis 12 Stunden alten Embryonen nachweisbar sind. Anschließend wird die Expression beider Varianten-Klassen über alle folgenden Entwicklungsstadien aufrechterhalten (Flybase FB2022\_04; Thurmond *et al.*, 2019).

Den Transkriptvarianten-Klassen identisch sind auch zwei verschiedene Proteinvarianten-Klassen zu beobachten, wobei beispielsweise das 2,9 kb Transkript otp-RE in einem 409 AS Protein Otp-PE resultiert, während aus dem 2,3 kb Transkript otp-RC ein 271 AS Protein Otp-PC translatiert wird (Abb. 2.8 B). Die Homeobox erstreckt sich von Exon 5 in Exon 6 und findet sich entsprechend als Homeodomäne in den Proteinvarianten wieder (Abb. 2.8 A und B, gelbe Markierungen).



**Abbildung 2.8: Übersicht über das Homeoboxgen *orthopedia* (*otp*) in *Drosophila melanogaster*.** (A) Genomische Region von *otp* mit dem Transkript otp-RE als Beispiel für die 2,9 kb Transkriptvariante und dem Transkript otp-RC als Beispiel für die 2,3 kb Transkriptvariante. Exons sind als Kästchen dargestellt, translatierte Bereiche in Hellblau. Gelb zeigt die Homeobox, Dunkelblau die Lage der transkriptspezifischen *in situ*-Sonden otp 1 und otp 2. (B) Grafische Darstellung der aus den Transkripten otp-RE und otp-RC resultierenden Proteine Otp-PE und Otp-PC. Gelb zeigt die Homeodomäne. (C+D) *In situ* Hybridisierung an wildtypischen *Drosophila*-Embryonen mit der Sonde otp 2 (C) bzw. otp 1 (D). Embryonalstadium 14, Lateralansicht, anterior ist links. (E) Otp-Immunfluoreszenzfärbung an wildtypischem *Drosophila*-Embryo, Embryonalstadium 14, Lateralansicht, anterior ist links. Der weiße Pfeil zeigt auf die Expressionsgrenze von Otp im ventralen Nervensystem zwischen den Segmenten A2 und A3. (F) Otp-Immunfluoreszenzfärbung in Grün auf ein wildtypisches, embryonales *Drosophila*-Gehirn. Immunfluoreszenzfärbung mit Anti-HRP in Rot zur Verdeutlichung der Gehirnstrukturen. Embryonalstadium 16, Dorsalansicht, anterior ist unten. P1+P2 = Otp-Expressionsdomänen 1 und 2 im Protocerebrum, D1 = Otp-Expressionsdomäne im Deutocerebrum (nach Hildebrandt *et al.*, 2020).

Im Embryo werden die beiden Transkriptvarianten gewebespezifisch exprimiert, wobei das kürzere Transkript im Enddarmprimordium, im embryonalen Enddarm und in den Analplatten exprimiert



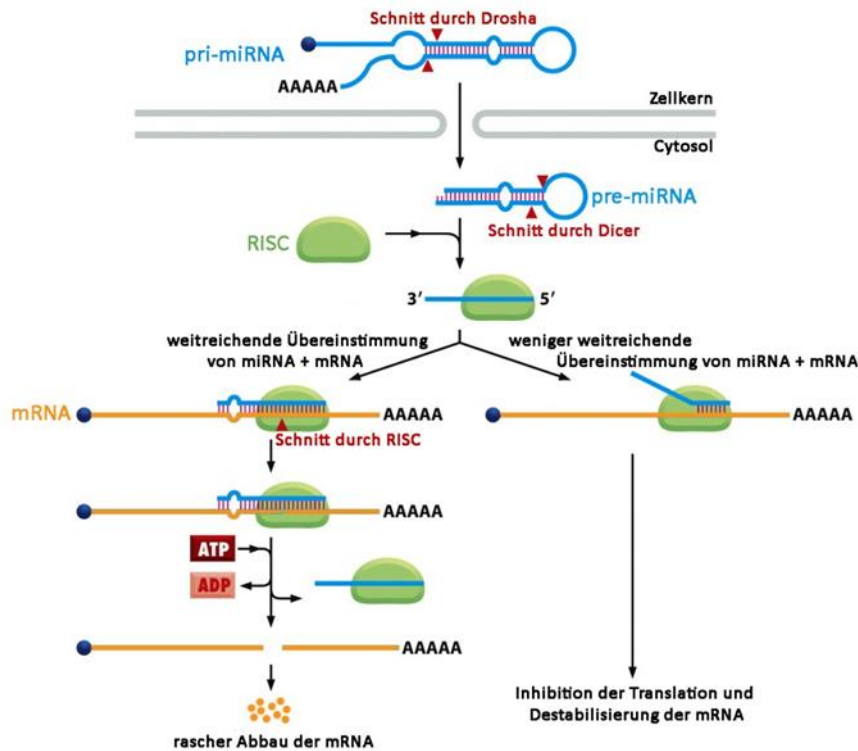
wird (Abb. 2.8 C) und das längere Transkript im ventralen Nervensystem und im Gehirn (Abb. 2.8 D) (Hildebrandt *et al.*, 2020). Im Enddarm wird *otp* von dem T-Box-Gen *brachyenteron* (*byn*) über multiple Bindestellen, die in einem regulatorischen Element von *otp* liegen, aktiviert (Kusch *et al.*, 2002) und stellt sich als essentiell für die Entwicklung des Enddarms dar, da *otp*-Mutanten embryonal letal sind. Sie weisen einen stark reduzierten Enddarm, hervorgerufen durch Apoptose im Enddarmprimordium und dem sich entwickelnden Enddarm, auf (Hildebrandt *et al.*, 2020). Auch im larvalen und adulten Enddarm ist Otp-Expression nachweisbar (Hildebrandt *et al.*, 2020). Die Proteinexpression beginnt in Stadium 10 und erfolgt ebenfalls im embryonalen Enddarm, den Analplatten, dem Gehirn und dem ventralen Nervensystem, wobei hier ein Unterschied zur Transkriptexpression festzustellen ist (Abb. 2.8 E). Während das Transkript in allen Segmenten des ventralen Nervensystems exprimiert wird, ist das Protein lediglich in den fünf anterioren Segmenten T1 bis T3 sowie A1 und A2 zu detektieren (Abb. 2.8 E, weißer Pfeil) (Hildebrandt *et al.*, 2020). Somit muss hier eine posttranskriptionelle Regulation von *otp* stattfinden. Das embryonale Gehirn weist *otp*-Expression in drei Domänen Otp-positiver Zellen auf, von denen sich zwei im Protocerebrum (P1 und P2) befinden und eine im Deutocerebrum (D1) (Abb. 2.8 F) (Hildebrandt *et al.*, 2020).

Aufgrund der Wichtigkeit von *otp* während der Entwicklung des Nervensystems höherer Organismen stellt es sich als sehr interessant dar, die Otp-Funktion im embryonalen, larvalen und adulten Gehirn von *Drosophila* zu untersuchen.

## 2.4 Die Feinregulation der Genexpression durch microRNAs

MicroRNAs (miRNAs) sind 21 bis 24 nt lange RNAs, die eine essentielle Rolle innerhalb der posttranskriptionellen Feinregulation der Genexpression einnehmen (Ambros, 2004). Die Prozessierung der miRNA erfolgt in einem zweistufigen Vorgang, bevor die reife miRNA funktionell aktiv werden kann (Abb. 2.9). Die pri-miRNA stellt das primäre Transkript der miRNA dar und wird durch die RNA Polymerasen II oder III transkribiert (Lee *et al.*, 2004; Borchert *et al.*, 2006). Noch im Zellkern wird die pri-miRNA durch das RNA-bindende Protein Pasha und die RNase III Drosha geschnitten, wonach die dadurch entstehende, *hairpin*-Strukturen enthaltende pre-miRNA ins Cytoplasma transportiert und dort durch die RNase III Dicer erkannt und weiter prozessiert wird (Krol *et al.*, 2010). Die resultierende dsRNA trägt an den 3'-Enden einen Überhang aus zwei Nukleotiden und an den 5'-Enden Phosphatgruppen (Zhang *et al.*, 2002; 2004). Einer der beiden dsRNA-Stränge wird durch den Argonautenproteinkomplex RISC (*RNA-induced silencing complex*) gebunden (Hammond *et al.*, 2000), und diese reife miRNA führt den RISC dann zu einer ihr komplementären mRNA, deren Translation durch die Bindung verhindert wird. Bei einer weitreichenden

Komplementarität der miRNA- und der mRNA-Sequenzen wird die mRNA daraufhin abgebaut, bei einer weniger weitreichenden Komplementarität von miRNA und mRNA wird die mRNA lediglich destabilisiert (Bagga *et al.*, 2005; Lim *et al.*, 2005; Wu und Belasco, 2008).



**Abbildung 2.9: Mechanismus der Feinregulation der Genexpression durch microRNAs.** Die pri-miRNA wird durch die RNA Polymerasen II oder III transkribiert und anschließend durch das RNA-bindende Protein Pasha und die RNase III Drosha geschnitten. Die dadurch entstehende pre-miRNA enthält *hairpin*-Strukturen und wird im Cytoplasma durch die RNase III Dicer weiter prozessiert. Ein Strang der resultierenden dsRNA wird durch den Argonautenproteinkomplex RISC (RNA-induced silencing complex) gebunden, den die reife miRNA dann zu einer ihrer komplementären mRNA führt. Die Translation der mRNA wird durch die Bindung des miRNA/RISC-Komplexes inhibiert, woraufhin die mRNA je nach Sequenzkomplementarität von miRNA und mRNA entweder destabilisiert oder abgebaut wird (Quelle: Figure 7-112 leicht abgeändert aus Molecular Biology of the Cell (© Garland Science 2008)).

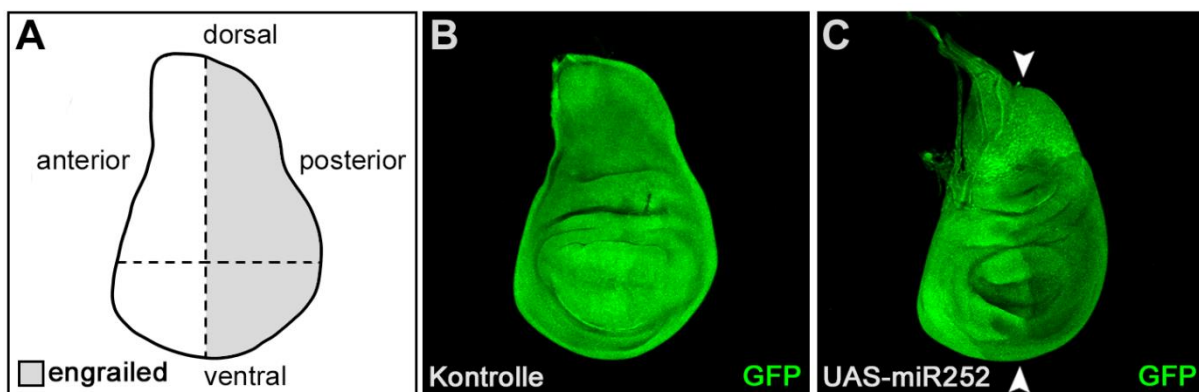
Einzelne miRNAs können direkt oder indirekt die Translation von hunderten von Genen beeinflussen (Selbach *et al.*, 2008) und haben verschiedenste Funktionen in unterschiedlichen Organismen. Anhand einer 2 bis 8 nt langen Sequenz am 5'-Ende der miRNAs werden miRNA-Familien definiert. Diese Sequenz wird *seed*-Sequenz genannt und spielt eine bedeutende Rolle bei der mRNA-Targeterkennung (Brennecke *et al.*, 2005). Die erste Entdeckung von miRNAs erfolgte in *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) mit der Identifikation der miRNA lin-4, die maßgeblich an der Steuerung der zeitlichen Regulation von frühen larvalen Entwicklungsschritten beteiligt ist (Lee *et al.*, 1993; Wightman *et al.*, 1993). Eine weitere miRNA, let-7, übernimmt diese Steuerungsfunktion in den späten larvalen Entwicklungsschritten von *C. elegans* (Reinhart *et al.*, 2000; Slack *et al.*, 2000; Abrahamte *et al.*, 2003; Lin *et al.*, 2003). In Pflanzen spielen miRNAs beispielsweise eine Rolle bei der Initiation des axialen Meristems und der Blattentwicklung (Rhoades *et al.*, 2002; Emery *et al.*, 2003; Palatnik *et al.*, 2003; Tang *et al.*, 2003), der zeitlichen Kontrolle der Blütenentwicklung (Park *et al.*,

2002; Aukerman und Sakai, 2003; Chen, 2004; Kasschau *et al.*, 2003) sowie der Stresstoleranz (He *et al.*, 2014). In Säugetieren haben miRNAs vor allem einen großen Einfluss auf die Zelldifferenzierung und die Zellproliferation (Suh *et al.*, 2004; Lu *et al.*, 2007). Generell haben miRNAs eine große Bedeutung für die biomedizinische Forschung, da ihnen Funktionen beim Tumorwachstum (Frampton *et al.*, 2015), im Glukosemetabolismus (Tattikota *et al.*, 2015) und in mesenchymalen Stammzellen (Zhu *et al.*, 2015) zugesprochen werden und mithilfe der miRNA-Forschung neue Behandlungsmöglichkeiten entstehen könnten.

*Drosophila melanogaster* weist einen eher kleinen miRNA-Pool auf, wobei von mehr als 80 % dieser miRNAs Homologe im Menschen identifiziert wurden (Ibáñez-Ventoso *et al.*, 2008). Bei der Erforschung der miRNAs in *Drosophila* sind kontrollierte Fehlexpressionen den Analysen von *Loss-of-function* Mutationen vorzuziehen, da Ausfälle einer einzelnen miRNA vermutlich durch die in miRNA-Familien auftretende Redundanz ausgeglichen werden und sich somit nur selten phänotypische Konsequenzen bei *Loss-of-function* Mutationen zeigen (Alvarez-Saavedra und Horvitz, 2010). Zur kontrollierten Fehlexpression von miRNAs mithilfe des UAS/Gal4-Systems stehen zahlreiche UAS-tragende Fliegenstämme mit ausgewählten miRNA-Sequenzen zur Verfügung (Bejarano *et al.*, 2012; Schertel *et al.*, 2012).

Die bekannteste miRNA in Insekten und somit auch in *Drosophila* ist *bantam*, die ein breites Spektrum an Funktionen aufweist. Durch Stimulation der Zellproliferation und das Entgegenwirken von Apoptose spielt sie eine wichtige Rolle bei der Regulation des Flügelwachstums (Brennecke *et al.*, 2005), eine Mitwirkung im Hippo- (Thompson und Cohen, 2006) und im TGF $\beta$ -Signalweg (Oh und Irvine, 2011) ist nachgewiesen, und sie ist essentiell für die Proliferation intestinaler Stammzellen als Reaktion auf den Hippo-Signalweg (Huang *et al.*, 2014). Des Weiteren fördert *bantam* das Überleben von Keimbahnstammzellen bei genotoxischem Stress (Xing *et al.*, 2015) und spielt eine Rolle in der Blutzellhomöostase (Lam *et al.*, 2014). Auch in der Entwicklung des Zentralnervensystems wird *bantam* benötigt. Eine verfrühte Differenzierung von Neuroblasten wird durch die miRNA inhibiert (Weng und Cohen, 2015), das Dendritennetzwerk wird reguliert (Parrish *et al.*, 2009), und die Entwicklung der optischen Loben sowie die Proliferation von Gliazellen wird beeinflusst (Li und Padgett, 2012). Diese Aufzählung zeigt, wie vielfältig die Funktionen von einzelnen miRNAs sein können. Weitere Funktionen von miRNAs in *Drosophila* stellen sich beispielsweise während der Keimbahnentwicklung (Iovino *et al.*, 2009; Yu *et al.*, 2009), beim Übergang von der maternalen zur zygotischen genetischen Kontrolle der Embryonalentwicklung (Rödel *et al.*, 2013), im Gewebewachstum (Aparicio *et al.*, 2015) und auch in der Endokrinologie (Suh *et al.*, 2015) dar. Einige miRNAs werden auch innerhalb von Stressreaktionen oder der Infektionsabwehr aktiv (Li *et al.*, 2021; Mukherjee *et al.*, 2021).

Viele miRNAs sind in *Drosophila* an der Entwicklung des Nervensystems beteiligt, wie beispielsweise auch die miRNA-252 (miR-252). MiR-252 ist die am stärksten exprimierte miRNA in der adulten Fliege (Marrone *et al.*, 2012). Ihr werden 206 mögliche Zielsequenzen zugeschrieben, wodurch sie eine breite Auswirkung auf den Organismus hat und unterschiedliche Funktionen beeinflusst (Marrone *et al.*, 2012). Im embryonalen und larvalen Gehirn konnte miR-252 bereits in der optischen Lobe und im Zentralgehirn nachgewiesen werden, ebenso in den Augen-Imaginalscheiben und dem larvalen Ventralnervensystem (Marrone *et al.*, 2012). Nachdem das miR-252-Level während der Entwicklung stetig ansteigt, findet die stärkste Expression im Kopf der adulten Fliege statt, wo sie unter anderem eine Rolle in der Entwicklung des Nervensystems einnimmt. MiR-252 interagiert als einzige von sechs potentiell interagierenden miRNAs mit der 3'UTR von *otp*, was durch die kontrollierte Fehlexpression von miR-252 in Kombination mit einem ubiquitär exprimierten Sensorkonstrukt mit GFP und der 3'UTR von *otp* bereits untersucht wurde (Hildebrandt, 2015). Mithilfe des Treiberstammes *engrailed* (*en*)-Gal4 wurde miR-252 im posterioren Teil der Flügelscheibe fehlexprimiert, woraufhin in diesem Bereich eine Herunterregulation der ubiquitären Sensor-GFP-Expression beobachtet werden konnte (Abb. 2.10), was auf ein Binden der miRNA an die im Sensorkonstrukt ebenfalls enthaltene *otp* 3'UTR und die darauf folgende Herunterregulation von GFP zurückzuführen ist.



**Abbildung 2.10: Untersuchung der Interaktion von miR-252 mit der 3'UTR von *otp* durch kontrollierte Fehlexpression der miRNA mithilfe des UAS/Gal4-Systems in Kombination mit einem ubiquitär exprimierten Sensorkonstrukt mit GFP und der *otp* 3'UTR.** L3-Flügelimaginalscheiben in Lateralanlage, dorsal ist oben, anterior links. **(A)** Grafische Darstellung des Expressionsmusters von *engrailed* (*en*) im posterioren Teil der Flügelscheibe. **(B)** Flügelscheibe ohne miRNA-Fehlexpression. **(C)** Fehlexpression von miR-252 gemeinsam mit dem Sensorkonstrukt im *en*-Expressionsmuster. Die Expression von miR-252 führt zu einer Inhibition der ubiquitär exprimierten Sensor-GFP-mRNA im posterioren Teil der Flügel-Imaginalscheibe. Die Pfeile deuten auf die anterior-posteriore Imaginalscheibengrenze.

Zur genaueren Analyse und zur Verifizierung der potentiellen Bindestelle von miR-252 wurden drei UAS-Sensor Konstrukte mit *enhanced GFP* (eGFP) sowie der 3'UTR von *otp* in verschiedenen Varianten kloniert und transgene Fliegenstämme hergestellt (Hildebrandt, 2017), die für diese Arbeit zur Verfügung standen, wie auch ein miR-252 *Knockout* (KO)-Stamm (Chen *et al.*, 2014). Aufgrund der Interaktion von miR-252 mit der 3'UTR von *otp* und der offensichtlichen posttranskriptionellen Regulation von *otp* liegt die Vermutung nahe, dass miR-252 ursächlich für die fehlende *Otp*-Expression im posterioren Teil des embryonalen Ventralnervensystems sein könnte.

## 2.5 Die neuronalen Transkriptionsfaktoren *Drosophila* Retinal Homeobox (DRx), Homeobrain (Hbn) und Earmuff (Erm)

Die Homeodomäne-enthaltenden Transkriptionsfaktoren *Otp* (Simeone *et al.*, 1994; Hildebrandt *et al.*, 2020), *DRx* (Eggert *et al.*, 1998; Davis *et al.*, 2003) und *Hbn* (Walldorf *et al.*, 2000; Kolb *et al.*, 2021) werden nebeneinander in der 57B-Region auf dem zweiten Chromosom von *Drosophila* codiert (Abb. 2.11 A) (Walldorf *et al.*, 2000). Sie werden in Typ II Neuroblasten exprimiert und sind für die Zellproliferation von großer Bedeutung, die dazu führt, dass das Gehirn im Vergleich zum Ventralnervensystem während der Entwicklung deutlich mehr an Zellmasse zunimmt (Curt *et al.*, 2019). Ein weiterer Transkriptionsfaktor, der hierfür wichtig ist, ist das Zinkfingerprotein *Erm*, das auf dem linken Arm des zweiten Chromosoms von *Drosophila* in der 22B6-8-Region lokalisiert ist (Abb. 2.11 B) und zur *FezF* (*forebrain embryonic* Zinkfinger)-Genfamilie gehört (Weng *et al.*, 2010).

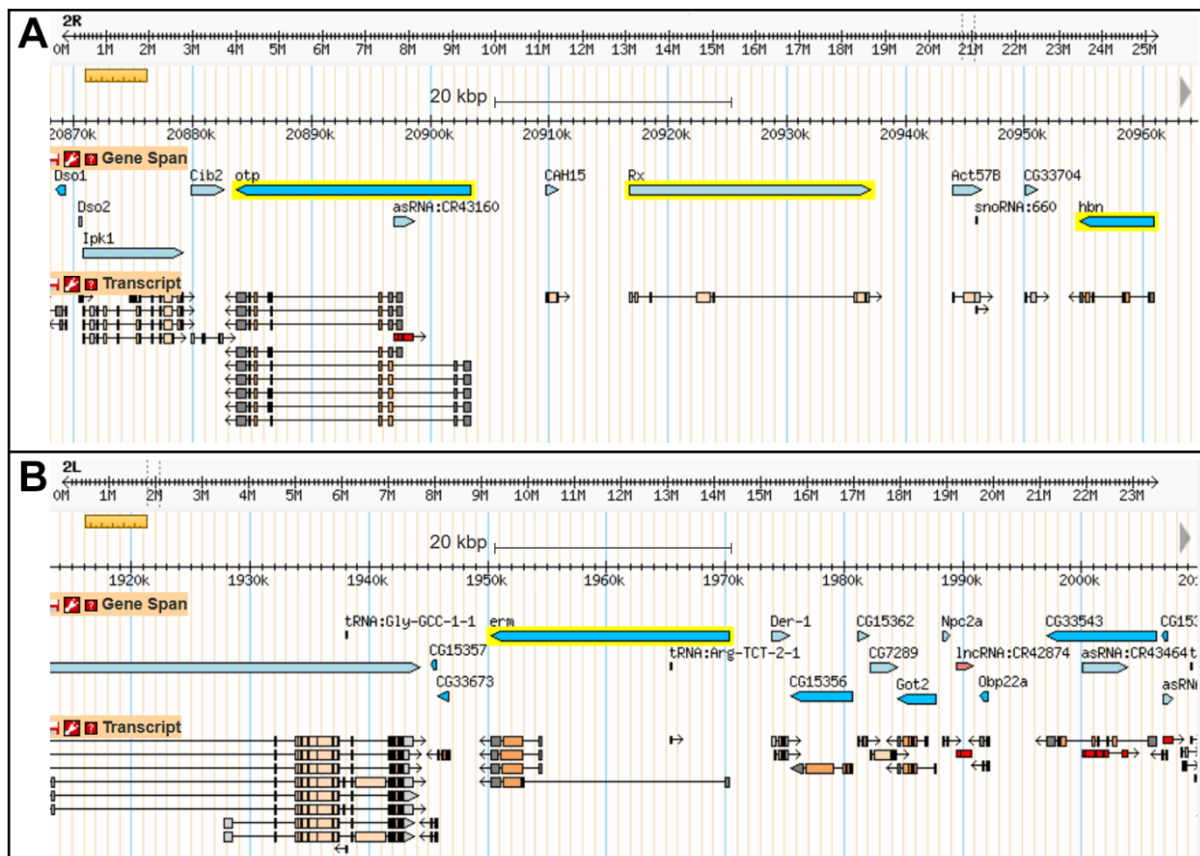


Abbildung 2.11: Lokalisation der Gene *orthopedia* (*otp*), *Drosophila* Retinal Homeobox (*DRx*) und *homeobrain* (*hbn*) in der 57B-Region auf dem rechten Arm des zweiten Chromosoms von *Drosophila* (A) sowie *earmuff* (*erm*) in der 22B6-8-Region auf dem linken Arm des zweiten Chromosoms von *Drosophila* (B). Dargestellt sind die Genbereiche in Blau oder Hellblau sowie die Transkriptvarianten, die auch die Exon (Kästchen)-Intron (Striche)-Beschaffenheit zeigen. Die entsprechenden Gene sind gelb unterlegt. Quelle: Flybase FB2022\_04.

Mutanten dieser vier Faktoren alleine oder in Kombination zeigen eine Reduktion der Neuroblasten sowie eine Reduktion der Proliferation ihrer Tochterzellen (Curt *et al.*, 2019). Durch gezielte Fehlexpression können die Transkriptionsfaktoren eine Proliferation innerhalb des

Ventralnervensystems hervorrufen und Zellen der Flügel-Imaginalscheibe in neurale Gehirnvorläuferzellen umprogrammieren (Curt *et al.*, 2019).

*Retinal Homeobox (Rx)* gehört einer konservierten Genfamilie für Transkriptionsfaktoren mit einer *prd-like* Homeodomäne an (Bürglin und Affolter, 2016). Das Gen wurde zunächst in *Xenopus* (Casarosa *et al.*, 1997) und der Maus (Mathers *et al.*, 1997; Furukava *et al.*, 1997) identifiziert und gilt als essentieller Regulator für die Augenentwicklung der Vertebraten, da eine augen- und gehirnspezifische Expression auch in Hühnern, Fischen und im Menschen nachgewiesen werden konnte (Bailey *et al.*, 2004). Erstaunlicherweise konnte dem homologen *Drosophila*-Gen *DRx* bislang keine Funktion innerhalb der Augenentwicklung nachgewiesen werden, aber eine Expression im Gehirn sowie im Clypeolabrum und Clypeus vom Embryonal- bis ins Adultstadium (Eggert *et al.*, 1998; Davis *et al.*, 2003). In frühen Embryonalstadien wird *DRx* in zwei Plakoden im Gehirn exprimiert, die benachbart zu den beiden Plakoden, aus denen die Zellen des neuroendokrinen Systems von *Drosophila* entstehen, liegen (de Velasco *et al.*, 2007). In den späteren Embryonalstadien bildet sich aus diesen *DRx*-positiven Plakoden der Teil des Protocerebrums, der die als *Pars intercerebralis* (PI) und *Pars lateralis* (PL) bezeichneten Ansammlungen neurosekretorischer Zellen umrandet (de Velasco *et al.*, 2007). Des Weiteren wird *DRx* im embryonalen Gehirn in den vier MB-Neuroblasten exprimiert (Kunz *et al.*, 2012; Kraft *et al.*, 2016), wo es für Zellwachstum, Zellproliferation und das Überleben der MB-Neuroblasten von Bedeutung ist (Kraft *et al.*, 2016). Weitere *DRx*-positive Zellen sind im Bereich der DAM (dorso anterior medialen) Domäne medial benachbart zur supraoesophagealen Gehirnkommisur zu beobachten, innerhalb der DAL (dorso-anterior lateralen) Domäne in der lateralen Region des embryonalen Gehirns sowie in der DPM (dorso-posterior medialen) Domäne, der DPLc (dorso-posterior lateral zentralen) Domäne und der BLD (basal lateral dorsalen) Domäne (Klöppel *et al.*, 2021). Im larvalen Gehirn ist die *DRx*-Expression in der Medulla und der Lobula der optischen Loben zu beobachten (Erclik *et al.*, 2017; Klöppel *et al.*, 2021), die die Prozessionszentren der visuellen Information darstellen (Fischbach und Dittrich, 1998), sowie im dorsalen inneren Proliferationszentrum (dIPC) (Klöppel *et al.*, 2021), das die meisten Zellen der Lobula hervorbringt (Meinertzhagen und Hanson, 1993). Außerdem findet eine prominente *DRx*-Expression in allen Typ II Lineages und in einigen Typ I Lineages im ventralen Bereich des Zentralgehirns statt (Klöppel *et al.*, 2021). In den DM- und DL-Typ II Lineages wird *DRx* in einigen INPs, in GMCs und Neuronen, aber nicht in Gliazellen exprimiert (Klöppel *et al.*, 2021). Auch in den MB-Neuroblasten und in einem der vier Neuroblasten der AL ist eine *DRx*-Expression im larvalen Gehirn zu beobachten (Yang *et al.*, 2016). Im adulten Gehirn wird *DRx* zentral im Bereich des PI sowie in Bereichen ventral von AOTU und LH, dorsal des VLP und PLP und benachbart zur OL exprimiert (Klöppel *et al.*, 2021). Des Weiteren tritt eine *DRx*-Expression im EB, einem Teil des CCX, auf (Davis *et al.*, 2003). Der EB kontrolliert spezifisch lokomotorische Prozesse wie Laufen und Fliegen (Ilius *et al.*,

2007; Martin *et al.*, 2001; Renn *et al.*, 1999), aber auch Orientierung und Drehungsabläufe (Guo *et al.*, 2014; Xie *et al.*, 2017; Omoto *et al.*, 2018; Kottler *et al.*, 2019; Bridi *et al.*, 2019; Buhl *et al.*, 2021).

Auch der Homeodomäne-enthaltende Transkriptionsfaktor Hbn wird vom embryonalen bis ins adulte Gehirn exprimiert (Graveley *et al.*, 2011; Hildebrandt *et al.*, 2022b). Im Embryo findet die neurale Hbn-Expression in vielen Typ I und einigen Typ II Neuroblasten (Curt *et al.*, 2019) sowie in GMCs und Neuronen, die vor allem im Protocerebrum lokalisiert sind (Kolb *et al.*, 2021), statt. In Hbn-Mutanten fehlen große Teile des Protocerebrums, unter anderem auch die MBs, was durch Apoptose hervorgerufen wird, und die SEK, die die beiden Gehirnhemisphären verbindet (Kolb *et al.*, 2021). Des Weiteren wird Hbn in späten Embryonalstadien zusätzlich im Mitteldarm exprimiert (Walldorf *et al.*, 2000) und übernimmt als transkriptioneller Repressor für die Hormone Allatostatin A und diuretisches Hormon 31 eine endokrine Funktion (Guo *et al.*, 2019). Im larvalen Gehirn gehört Hbn einer Reihe von Transkriptionsfaktoren an, die im Laufe der Entwicklung in den DM Lineages und der Medulla exprimiert werden, wodurch die jeweiligen Zellen ihre spezifische zeitliche Identität erhalten (Bayraktar und Doe, 2013; Li *et al.*, 2013; Suzuki *et al.*, 2013). Hierbei wird Hbn in einem überlappenden Muster mit Eyeless (Ey) und zeitlich direkt vor Sloppy paired (Slp) exprimiert (Grossniklaus *et al.*, 1992). Mit beiden dieser Transkriptionsfaktoren interagiert Hbn aktivierend und reprimierend (Konstantinides *et al.*, 2022). In den Typ II Lineages wird Hbn in INPs, GMCs und Neuronen, aber nicht in Gliazellen exprimiert, und in der Medulla, der Lobula, im dLPC und in einigen Typ I Lineages (Hildebrandt *et al.*, 2022b). Im adulten Gehirn ist die Hbn-Expression in einem Bereich zwischen VLP und SLP sowie in der Medulla zu beobachten (Hildebrandt *et al.*, 2022b).

Erm codiert für einen Zinkfinger-Transkriptionsfaktor homolog zu den FezF Proteinen (Hashimoto *et al.*, 2000; Matsuo-Takasaki *et al.*, 2000), weshalb *erm* zur Erm/FezF-Genfamilie zugeordnet wird (Weng *et al.*, 2010). Die Erm-Expression beginnt im frühen Embryo mit einem anterioren Expressionsmuster, das einem Kopfhörer (engl. *earmuff*) ähnelt, woraus die Benennung des Gens resultiert (Pfeiffer *et al.*, 2008). In späteren Embryonalstadien ist eine gehirnspezifische Expression von Erm zu beobachten, die bis ins Adultstadium auch gehirnspezifisch bleibt (Hildebrandt *et al.*, 2021). Im larvalen Gehirn wird Erm in unreifen INPs von Typ II Lineages exprimiert, wo es als transkriptioneller Repressor agiert und ein Gleichgewicht zwischen neuronaler Differenzierung und Stammzellerhaltung herstellt (Weng *et al.*, 2010). In Mutanten ohne funktionelles Erm-Protein differenzieren die INPs zurück in Neuroblasten, sodass eine dramatische Zunahme von Neuroblasten und Lineages zu beobachten ist, was sich in stark vergrößerten Gehirnhemisphären ausprägt (Weng *et al.*, 2010). Erm stellt eines der ersten Gene dar, das innerhalb von Enhancer-Analysen im Detail betrachtet wurde (Pfeiffer *et al.*, 2008).

Das komplexe Expressionsmuster von Genen wird durch regulatorische Elemente hervorgerufen und geregelt, zu denen auch Enhancer gehören, die teilweise über weite Distanzen agieren. Um solche Elemente zu identifizieren, werden in der Regel transgene Reporterstudien durchgeführt, in denen meist lacZ oder GFP als Reporter verwendet werden (Kvon, 2015). Der erste Enhancer, der in *Drosophila* mithilfe dieser Methode identifiziert werden konnte, war ein *fushi tarazu* (*ftz*) Enhancer, der als klassisches Beispiel dient (Hiromi *et al.*, 1985) und auf den die Identifikation unzähliger weiterer Enhancer folgte. Während des *Drosophila* Genomprojekts wurden weitere Untersuchungen durchgeführt, um Enhancer von Genen, deren Expressionsmuster oder Funktion bekannt waren, mithilfe von Reportertransgenen in Kombination mit dem UAS/Gal4-System zu identifizieren (Pfeiffer *et al.*, 2008). Hierzu wurden DNA-Bereiche, die 3 kb *upstream*, *downstream* oder in Introns von 925 Genen liegen, vor ein Gal4-Gen kloniert, wonach mehr als 5000 transgene Fliegenstämme generiert und in verschiedenen Entwicklungsstadien untersucht wurden (Jenett *et al.*, 2012; Jory *et al.*, 2012; Manning *et al.*, 2012). Um Positionseffekte zu vermeiden und die Enhanceraktivitäten somit direkt miteinander vergleichen zu können, wurden alle Konstrukte in die gleiche chromosomale Lokalisation integriert. Auch *DRx*-, *hbn*- und *erm*-assoziierte DNA-Bereiche wurden innerhalb dieses Projekts kloniert und transgene Fliegenstämme generiert, die über das Bloomington *Drosophila* Stock Center erworben werden können. Innerhalb einer weiteren Untersuchung zur Identifikation von Enhancern wurden zusätzliche Fliegenstämme hergestellt (Kvon *et al.*, 2014), die über das Vienna *Drosophila* Research Center bezogen werden können. Die Analyse der entsprechenden *DRx*-, *hbn*- und *erm*-assoziierten transgenen Fliegenstämme führte zu einer genauen Lokalisation der jeweiligen Enhancer-Aktivität innerhalb des jeweiligen Expressionsstadiums und -musters (Klöppel *et al.*, 2021; Hildebrandt *et al.*, 2022b; Hildebrandt *et al.*, 2021) und somit zu einem vollständigeren Verständnis der Genexpression.



## 2.6 Zielsetzung der Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit bestand darin, die Expression und die Regulation des Homeodomäne-enthaltenden Transkriptionsfaktors Orthopedia (Otp) während der Entwicklung des Nervensystems von *Drosophila melanogaster* zu untersuchen.

Zunächst sollten die EMS-induzierten Mutantenstämme *otp*<sup>1024</sup> und *otp*<sup>13064</sup>, die aufgrund ihres Phänotypes und von Defizienzkreuzungen als *otp*-Mutanten eingeordnet wurden (Bach, 2011), auf molekularer Ebene durch Sequenzierung verifiziert werden.

Anschließend sollte die wildtypische Otp-Expression mithilfe von Immunfluoreszenzfärbungen im embryonalen, larvalen und adulten Gehirn beschrieben und spezifischen Zelllineages zugeordnet werden.

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die beiden *otp*-Transkriptvarianten im Embryogewebespezifisch im Enddarm bzw. im Zentralnervensystem exprimiert werden (Hildebrandt *et al.*, 2020), war nun zu untersuchen, ob die gewebespezifische Expression der Transkripte *otp*-RC und *otp*-RE auch im Larval- und Adultstadium beibehalten wird. Hierzu sollten larvale und adulte Gehirne sowie larvale und adulte Enddärme mittels qPCR auf die *otp*-RE- bzw. *otp*-RC-Expression untersucht werden. Um die Expression von *otp*-RE zu veranschaulichen, sollten ein *otp*-RE-spezifischer Antikörper und ein *otp*-RE-spezifischer Gal4-Stamm hergestellt werden.

Aufgrund von *in situ* Hybridisierungen und Immunfluoreszenzfärbungen konnte gezeigt werden, dass *otp* in jedem Segment des embryonalen Ventralnervensystems transkribiert, aber nur in den anterioren Segmenten T1 bis A2 translatiert wird (Hildebrandt *et al.*, 2020), was eine posttranskriptionelle Regulation vermuten lässt. Um eine posttranskriptionelle Regulation von *otp* durch die microRNA miR-252 zu untersuchen, sollten unter Zuhilfenahme verschiedener *otp*-Sensorstrukturen qPCR-Experimente durchgeführt und Mikroskopaufnahmen angefertigt werden. Außerdem sollte die Otp-Expression im Gehirn und Ventralnervensystem von Embryonen sowie in Gehirnen von Larven und Fliegen eines miR-252 *Knockout* (KO)-Stammes mittels Immunfluoreszenzfärbung untersucht werden.

Um Untersuchungen der Expression und Regulation der neuronalen Transkriptionsfaktoren *Drosophila* Retinal Homeobox (DRx), Homeobrain (Hbn) und Earmuff (Erm) zu vervollständigen, sollte jeweils ein spezifischer Gal4-Treiberstamm hergestellt werden, mit dessen Hilfe sich das gesamte Expressionsmuster des jeweiligen Gens darstellen lässt. Außerdem sollten einige genspezifische Enhancer-Deletionsstämme mittels Immunfluoreszenzfärbung auf die Auswirkung des jeweiligen, fehlenden Enhancers auf das Expressionsmuster des jeweiligen Gens untersucht werden.

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Material

#### 3.1.1 Bakterienstämme

Die verwendeten Bakterienstämme bilden Derivate von *E. coli* K-12.

BL21 (DE3): (*hsdS gal (lclts857 ind1 Sam7 nin5 lac UV5-T7 gene 1)*) (Sambrook und Russell, 2001)

BL21 (DE3)-Zellen wurden zur Expression von GST-Fusionsproteinen verwendet.

DH5 $\alpha$ : (*supE44  $\Delta$ lac U169 ( $\phi$ 80lacZ)  $\Delta$ M15 hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1*)

DH5 $\alpha$ -Zellen wurden zur Transformation von Plasmidvektoren eingesetzt.

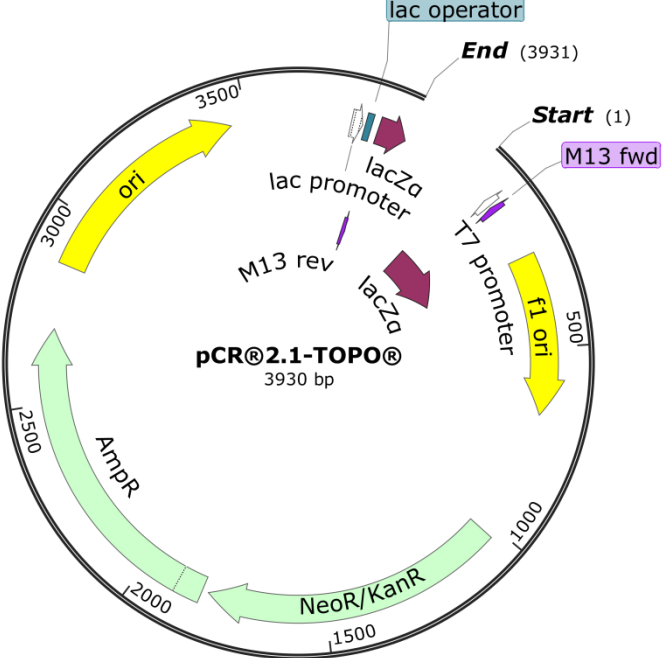
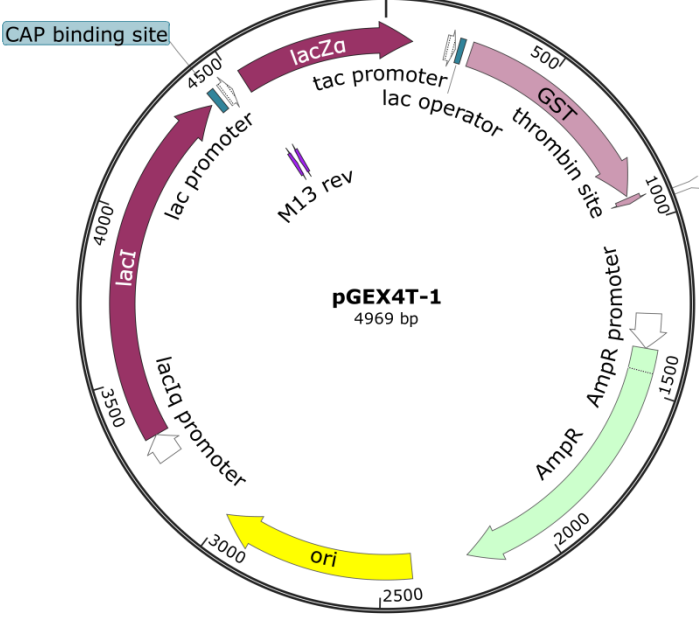
#### 3.1.2 DNA-Klone

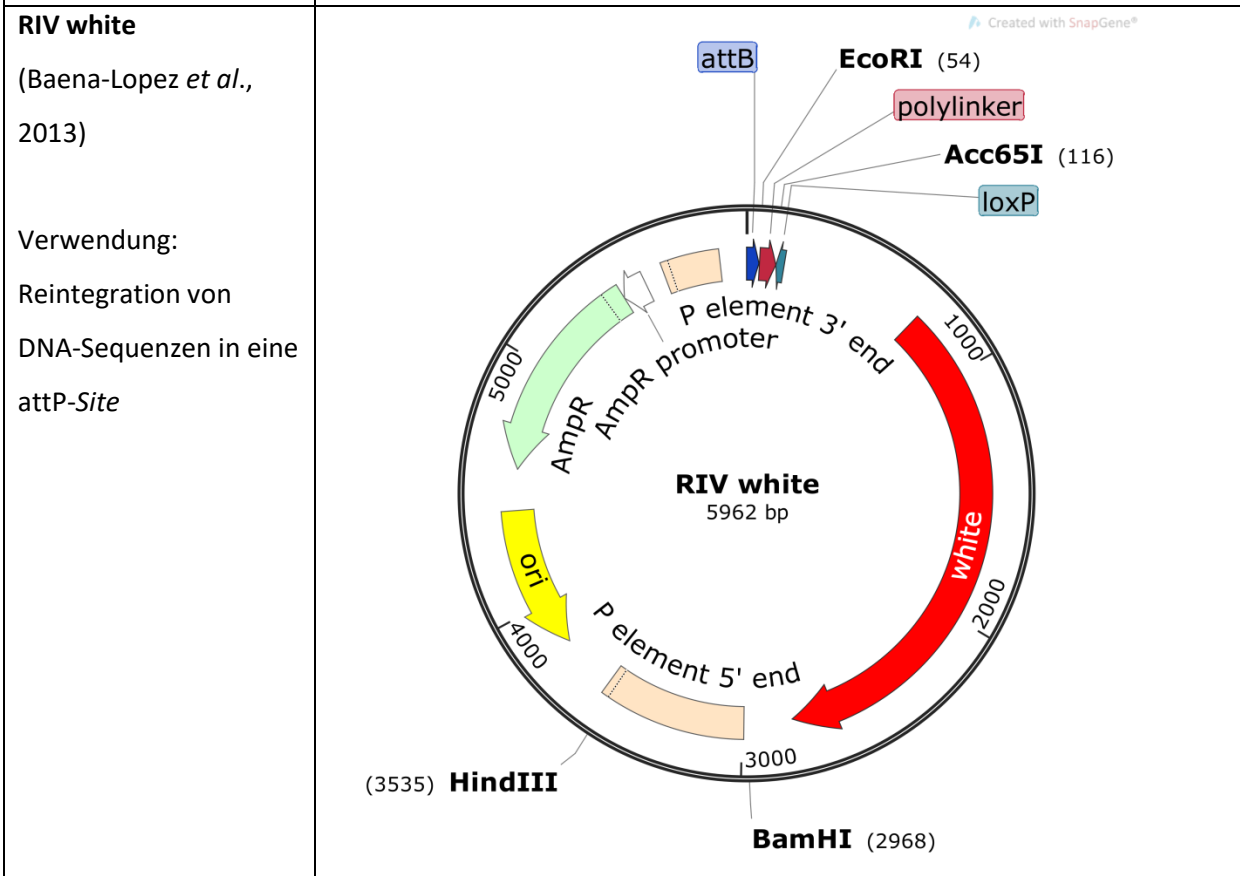
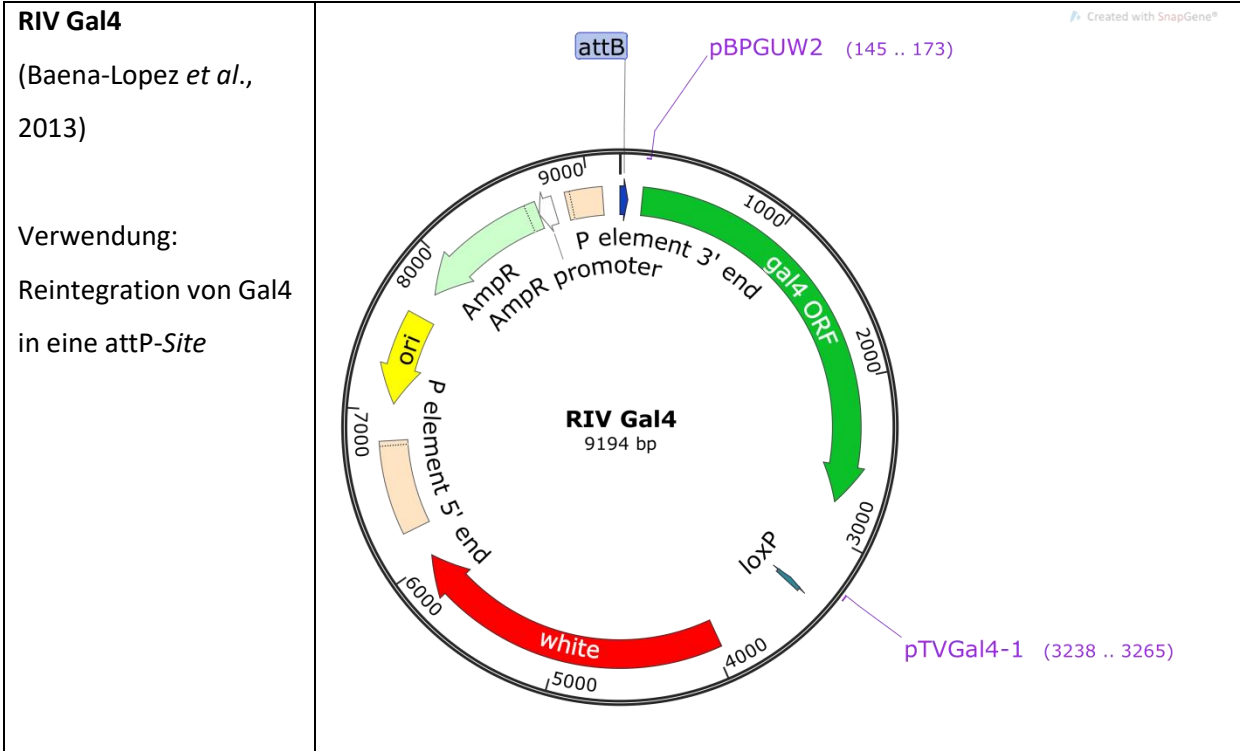
Tabelle 3.1: Verwendete DNA-Klone.

Klon	Genregion	Größe des Plasmids	Bezugsquelle
BACR10P11 (genomische DNA)	21.036.140–20.872.106 (2. Chromosom)	164 kb	BACPac Resources Center (Hoskins et al., 2000)
cW26/1 (cDNA)	<i>otp</i> -cDNA, 1,5 kb <i>EcoRI</i> - Fragment	4,5 kb	Uwe Walldorf
cW26/2 (cDNA)	<i>otp</i> -cDNA, 1,7 kb <i>EcoRI</i> -Fragment	4,7 kb	Uwe Walldorf

### 3.1.3 Vektorkarten

Tabelle 3.2: Vektorkarten der verwendeten Vektoren.

Bezeichnung	Vektorkarte
<p><b>pCR® 2.1 TOPO®</b></p> <p>linearisiert (Invitrogen)</p> <p>Verwendung: TA-Klonierung von PCR-Produkten, unabhängig von Schnittstellen</p>	 <p>Created with SnapGene®</p> <p><b>pCR®2.1-TOPO®</b> 3930 bp</p> <p>lac operator End (3931) Start (1) M13 fwd lacZa lac promoter M13 rev T7 promoter F1 ori AmpR NeoR/KanR</p>
<p><b>pGEX4T-1</b></p> <p>(Amersham Biosciences)</p> <p>Verwendung: Herstellung von GST-Fusionsproteinen zur heterologen Expression</p>	 <p>Created with SnapGene®</p> <p><b>pGEX4T-1</b> 4969 bp</p> <p>CAP binding site lacZa tac promoter lac operator GST thrombin site EcoRI (939) XhoI (954) AmpR promoter AmpR ori</p>



### 3.1.4 Fliegenstämme

Tabelle 3.3: Verwendete Fliegenstämme.

Stamm	Herkunft
<i>Genetargeting-Stämme</i>	
DRx <sup>GT</sup> Deletion der Region um das ATG von <i>DRx</i>	AG Walldorf
erm <sup>KO</sup> Deletion der Region um die ATGs beider Transkriptvarianten von <i>erm</i>	AG Walldorf (Masterarbeit M. Minet)
hbn <sup>KO</sup> Deletion der Region um das ATG von <i>hbn</i>	AG Walldorf (Bachelorarbeit O. Hartwig)
otp <sup>GT</sup> Deletion in Exon 4 und 5 von <i>otp</i>	AG Walldorf (Dissertation N. Bach)
otp <sup>REGT</sup> Deletion in Exon 2 von <i>otp</i>	K. Hildebrandt (Bachelorarbeit)
<i>Enhancer-Genetargeting-Stämme</i>	
77F11 <sup>KO</sup> Deletion des <i>DRx</i> -Enhancers 77F11	AG Walldorf (Bachelorarbeit N. Fürst)
77F06 <sup>KO</sup> Deletion des <i>DRx</i> -Enhancers 77F06	AG Walldorf (Bachelorarbeit N. Fürst)
77F09 <sup>KO</sup> Deletion des <i>DRx</i> -Enhancers 77F09	AG Walldorf (Bachelorarbeit I. Bley)
35D05 <sup>KO</sup> Deletion des <i>hbn</i> -Enhancers 35D05	AG Walldorf (Bachelorarbeit I. Findji)
34G10 <sup>KO</sup> Deletion des <i>hbn</i> -Enhancers 34G10	AG Walldorf (Bachelorarbeit F. Wittling)
35A03 <sup>KO</sup> Deletion des <i>hbn</i> -Enhancers 35A03	AG Walldorf (Bachelorarbeit F. Wittling)
34G10,35A03 <sup>GT</sup> Deletion der <i>hbn</i> -Enhancer 34G10 und 35A03 sowie der beiden dazwischenliegenden Exons 2 und 3 von <i>hbn</i>	AG Walldorf (Bachelorarbeit I. Findji)
34G10,35A03 <sup>KO</sup> gleichzeitige Deletion der zwei <i>hbn</i> -Enhancer nach Reintegration der zwischenliegenden Exons 2 und 3 von <i>hbn</i>	Diese Arbeit

hbn <sup>3</sup> <sup>KO</sup> Deletion des 3'-liegenden <i>hbn</i> -Enhancers	AG Walldorf (Bachelorarbeit J. Federspiel)
R9D08 <sup>KO</sup> Deletion des <i>erm</i> -Enhancers R9D08	AG Walldorf (Bachelorarbeit S. Kübel)
R9D10 <sup>KO</sup> Deletion des <i>erm</i> -Enhancers R9D10	AG Walldorf (Bachelorarbeit S. Kübel)
R9D11 <sup>KO</sup> Deletion des <i>erm</i> -Enhancers R9D11	AG Walldorf
R9D11S <sup>KO</sup> Deletion des verkürzten <i>erm</i> -Enhancers R9D11	AG Walldorf
<b>Treiberstämme</b>	
<i>dpn</i> -Gal4 (BL47859) w[1118]; P{y[+t7.7] w[+mC]=GMR13C02-GAL4}attP2	Bloomington Stock Center
<i>en</i> -Gal4 (BL6356) y[1] w[*]; P{w[+mW.hs]=en2.4-GAL4}e16E P{w[+mC]=UAS-FLP.D}JD1	Bloomington Stock Center
DRx <sup>Gal4</sup> Gal4-Gen innerhalb der Deletion des <i>Genetargeting</i> -Stammes DRx <sup>GT</sup>	Diese Arbeit
erm <sup>KOGal4</sup> Gal4-Gen innerhalb der Deletion des <i>Genetargeting</i> -Stammes erm <sup>KO</sup>	Diese Arbeit
hbn <sup>KOGal4</sup> Gal4-Gen innerhalb der Deletion des <i>Genetargeting</i> -Stammes hbn <sup>KO</sup>	Diese Arbeit
otp <sup>REGal4</sup> Gal4-Gen innerhalb der Deletion des <i>Genetargeting</i> -Stammes otp <sup>REGT</sup>	K. Hildebrandt (Masterarbeit)
<b>Testerstämme</b>	
otp Sensor Del Sensorbaustein aus UAS-Stellen, hsp70 Minimalpromotor, eGFP und <i>otp</i> 3'UTR (mit Deletion im miR-252-Bindebereich)	K. Hildebrandt (Masterarbeit)
otp Sensor Mut Sensorbaustein aus UAS-Stellen, hsp70 Minimalpromotor, eGFP und <i>otp</i> 3'UTR (mit Mutation im miR-252-Bindebereich)	K. Hildebrandt (Masterarbeit)
otp Sensor WT Sensorbaustein aus UAS-Stellen, hsp70 Minimalpromotor, eGFP und wildtypischer <i>otp</i> 3'UTR	K. Hildebrandt (Masterarbeit)

UAS mCD8 GFP, UAS H2B mRFP1 zur Reporterproteinexpression, membrangebundenes GFP und zellkernlokalisiertes mRFP1	Egger <i>et al.</i> , 2010
UAS mCD8 GFP zur Reporterproteinexpression, membrangebundenes GFP	Aus UAS mCD8 GFP, UAS H2B mRFP1, Egger <i>et al.</i> , 2010
UAS H2B mRFP1 zur Reporterproteinexpression, zellkernlokalisiertes mRFP1	Aus UAS mCD8 GFP, UAS H2B mRFP1, Egger <i>et al.</i> , 2010
UAS miR252 M{UAS-mir-252.S}ZH-86Fb	FlyORF
<i>otp<sup>REGal4</sup>-Kombinationsstamm</i>	
<i>otp<sup>REGal4</sup>/CyO</i> ; UAS H2B mRFP1/TM3 Gal4-Gen innerhalb der Deletion von <i>otp<sup>REGT</sup></i> , kombiniert mit UAS H2B mRFP1	Diese Arbeit
<i>otp-Sensor-Rekombinationsstämme</i>	
<i>otp</i> Sensor Del - UAS miR252	K. Hildebrandt (Masterarbeit)
<i>otp</i> Sensor Mut - UAS miR252	Diese Arbeit
<i>otp</i> Sensor WT - UAS miR252	K. Hildebrandt (Masterarbeit)
<i>EMS-induzierte otp-Mutanten</i>	
<i>otp<sup>1024</sup></i>	AG Walldorf
<i>otp<sup>13064</sup></i>	AG Walldorf
<i>Weitere Fliegenstämme</i>	
Wildtyp (WT) <i>yw<sup>67c23</sup></i>	AG Walldorf
Balancer-Stamm (2. Chromosom) <i>yw<sup>1118</sup>; Sco/CyO; +/+</i>	AG Walldorf
Balancer-Stamm (3. Chromosom) <i>w<sup>1118</sup>; +/+; TM6B Tb/TM3 Sb</i>	AG Walldorf
Doppel-Balancer-Stamm (2. + 3. Chromosom) (BL7198) <i>w[*]; Kr[If-1]/CyO; D[1]/TM3, Ser[1]</i>	Bloomington Stock Center

miR-252 KO (miRNA 252 <i>Knockout</i> -Stamm) w[*]; Tl{TI}mir-252[KO]/TM3, P{w[+mC]=GAL4-twi.G}2.3, P{UAS-2xEGFP}AH2.3, Sb[1] Ser[1]	Y. W. Chen
Stamm zum Einkreuzen einer Integrase-Quelle zur PhiC31-vermittelten Transformation (BL34770) y[1] w[*] P{y[+t7.7]=nos-phiC31\int.NLS}X; sna[ScO]/CyO	Bloomington Stock Center

### 3.1.5 Antikörper

#### 3.1.5.1 Primäre Antikörper

Tabelle 3.4: Verwendete primäre Antikörper.

Antigen	Spezies und Isotyp	Verdünnung	Bezugsquelle
Bruchpilot (Brp), nc82	Maus IgG, monoklonal	1:25	DSHB
Crumbs (Crb), cq4	Maus IgG, monoklonal	1:5	DSHB
Digoxigenin (Dig), AP-gekoppelt	Schaf Fab-Fragment, polyklonal	1:2000	Roche
<i>Drosophila</i> Retinal Homeobox (DRx)	Kaninchen IgG, polyklonal	1:1000	AG Walldorf
Homeobrain (Hbn)	Kaninchen IgG, polyklonal	1:200	AG Walldorf
Horse Radish Peroxidase (HRP), FITC-gekoppelt	Ziege IgG, polyklonal	1:200	MP Biomedicals
Neurotactin (Nrt), BP106	Maus IgG, monoklonal	1:25	DSHB
Orthopedia-PE (Otp-PE)	Kaninchen IgG, polyklonal	1:200	Diese Arbeit
Orthopedia (Otp)	Meerschweinchen IgG, polyklonal	1:2000 (Gehirne) 1:500 (Embryonen)	AG Walldorf



### 3.1.5.2 Sekundäre Antikörper

Die sekundären Antikörper wurden in einer Verdünnung von 1:1000 eingesetzt.

**Tabelle 3.5: Verwendete sekundäre Antikörper.**

Antigen	Spezies und Isotyp	Konjugation	Bezugsquelle
Kaninchen IgG	Ziege IgG	Alexa Fluor® 488	Molecular Probes
Kaninchen IgG	Ziege IgG	Alexa Fluor® 568	Molecular Probes
Maus IgG	Ziege IgG	Alexa Fluor® 488	Molecular Probes
Maus IgG	Ziege IgG	Alexa Fluor® 568	Molecular Probes
Maus IgG	Ziege IgG	Alexa Fluor® 647	Molecular Probes
Meerschweinchen IgG	Ziege IgG	Alexa Fluor® 488	Molecular Probes
Meerschweinchen IgG	Ziege IgG	Alexa Fluor® 568	Molecular Probes

### 3.1.6 Restriktionsenzyme und Puffer

Die Restriktionsenzyme (10 U/μl) und Puffer (10x) wurden von der Firma ThermoFisher Scientific bezogen.

**Tabelle 3.6: Verwendete Restriktionsenzyme.**

Restriktionsenzym(e)	Verwendeter Puffer	Verwendung
<i>EcoRI</i> + <i>XhoI</i>	2x Puffer Tango	Klonierung von Teilen der <i>otp</i> -cDNA in pGEX4T-1
<i>EcoRI</i>	1x Puffer <i>EcoRI</i>	Kontrolle der Zwischenklonierung pCR® 2.1 TOPO® + <i>hbn</i> Exons
<i>BbsI</i> (10 U/μl; NEB) + <i>HindIII</i>	1x Puffer 2.1 (10x; NEB)	Kontrolle der Zwischenklonierung pCR® 2.1 TOPO® + <i>hbn</i> Exons
<i>EcoRI</i> + <i>Acc65I</i>	1x Puffer O	Klonierung und Kontrolle der Klonierung RIV <sup>white</sup> + <i>hbn</i> Exons

### 3.1.7 Oligonukleotide (Primer)

Alle Primer wurden von Sigma Aldrich/Merck (Darmstadt) synthetisiert. Die qPCR-Primer wurden mit H<sub>2</sub>O<sub>deion.</sub> auf eine Endkonzentration von 100 µM verdünnt, alle anderen Primer auf eine Endkonzentration von 50 µM. Sie wurden bei -20 °C gelagert. Unterstrichene Sequenzen wurden dem jeweiligen Primer zur Klonierung durch Restriktionsenzyme angefügt.

Tabelle 3.7: Verwendete Oligonukleotide (Primer).

Bezeichnung	Sequenz (5'→3')	T <sub>m</sub> (°C)
<i>Primer zur Klonierung von pGEX4T-1 + otp-PE</i>		
otp-PE for	<u>TATAGAATT</u> CATGCTGAACAATCTTGGGGCCAATG	64
otp-PE rev	TACTCTCGAGCATGCTGTTGTTGTTGTTGCCGTTG	67
pGEX3	CCGGGAGCTGCATGTGTCAGAGG	66
pGEX5	GGGCTGGCAAGCCACGTTTGGTG	66
<i>Primer zur Überprüfung der otp-Mutantenstämme otp<sup>1024</sup> und otp<sup>13064</sup></i>		
1024-1	CTGTGATAGACGAGTATACGAGCAGG	61
1024-2	CGTCTCAATTATAGGCCATTTAGCAG	57
1024-3	GATTAATGATAAATTCAATGATAAGTGCATC	56
1024-4	CCTAATAGTCTATTGGAATTAATACTCTGATGC	57
1024-5	CTACCTTTAAATCTGTGGGTTTTGATGC	58
1024-6	CATGCCAGGCGAAAAAGTGTC	60
1024-7	CTGATTCACTTACAACACCGAATACAAAATTC	59
1024-8	CAGCCTCGCAATTTGAATTCC	57
<i>Primer zur Klonierung von RIV<sup>white</sup> + hbn Exons</i>		
34G10GT3	<u>ACTAGT</u> GAGGATATAACTACTTCAGCCACAATTG	61
35A03GT2	<u>GGTACC</u> ATTAGCGGACACTGCGATGGC	67
M13	GTAAAACGACGGCCAG	55
<i>Primer zur Überprüfung der Gal4-Integration</i>		
Rxseq5	GTTCAAGCAGCTTGTTATTTAGCCC	60
Rxseq6	CTCAACTGTGATCAATCATATCATTGC	56
34G10-7	GTTTACGCCTGCCATAGCTATTC	59
35A03GT7	GCGTGCTCAACAAATATTGTGAC	57
ermseq5	CGACTGATCCAGGCTGATCACC	61
ermseq6	CTGTGCTGAACGCGTCCTGTTCTC	65
pBPGUW2	ATGCTTGTTTCGATAGAAGACAGTAGCTTC	60

pTVGal4-1	CGTTTTTATTGTCAGGGAGTGAGTTTGC	61
<i>qPCR Primer</i>		
otp-RC for	GCTCTTTTGCGGCGCAC	60
otp-RC rev	GCCGGAGGATCCACCACC	61
ForGFP	GCAACTACAAGACCCGC	54
ForTubulin	TGTCGCGTGTGAAACACTTC	61
otp-RE for	GAACTCTGACCCCAGCCATAAC	62
otp-RE rev	GGGAATCGATATCGACTGGTGG	59
RevGFP	GTCGGCCATGATATAGACG	56
RevTubulin	AGCAGGCGTTTCCAATCTG	61

### 3.1.8 Geräte

Table 3.8: Verwendete Geräte.

Bezeichnung	Bezugsquelle
Adventurer™Pro Waage	Ohaus Corporation (Parsippany, USA)
Binokular Stemi 2000	Zeiss (Oberkochen)
Bio-Rad Mini-Protean®	Bio-Rad (München)
Bio-Rad My cycler™ Thermal Cycler	Bio-Rad (München)
Bio-Rad Photometer SmartSpec™ 3000	Bio-Rad (München)
Bio-Rad Power Supply PowerPAC™ 300	Bio-Rad (München)
Brutschrank	Memmert (Schwabach)
CP 64 (Feinwaage)	Sartorius AG (Göttingen)
Eppendorf Concentrator 5301	Eppendorf (Hamburg)
Eppendorf Mastercycler Personal	Eppendorf (Hamburg)
Eppendorf miniSpin plus Tischzentrifuge	Eppendorf (Hamburg)
Eppendorf Zentrifuge 5702	Eppendorf (Hamburg)
Eppendorf FemtoJet	Eppendorf (Hamburg)
Fluoreszenz-Binokular SZX12	Olympus (Hamburg)
Fluoreszenzmikroskop BX 61	Olympus (Hamburg)
Gel-Elektrophorese-System PerfectBlue™	Peqlab (Erlangen)
Gyro Mini Nutating Mixer	Labnet International Inc. (Oakham, UK)
Heizrührer MR 3001K	Heidolph Instruments (Kelheim)

InoLab (pH-Meter)	Xylem Analytica Germany Sales GmbH & Co. KG (Weilheim)
Kamera U-CMAD3 (CC-12 soft imaging system)	Olympus (Hamburg)
Kaltlichtquelle KL 1500 LCD	Zeiss (Oberkochen)
Konfokalmikroskop SP5	Leica (Wetzlar)
KühlThermoMixer HLC MHR 11	DITABIS – Digital Biomedical Imaging Systems AG (Pforzheim)
Lambda Bio+ Spektrophotometer	Perkin Elmer (Waltham, USA)
Mikromanipulator	Leitz (Wetzlar)
MikroOne (Pipette 10 µl)	Starlab International GmbH (Hamburg)
Mikroskop Axiovert 25	Zeiss (Oberkochen)
Mikrowelle mikromaxx®	Medion AG (Essen)
Minilys Arbeitsplatz-Homogenisator	Peqlab (Erlangen)
Mini-Zentrifuge ROTILABO® mit Butterfly-Rotor	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)
Multi-Shaker Rotator RS-24	Peqlab (Erlangen)
NanoDrop 1000	Peqlab (Erlangen)
PC-10 (Glaskapillar-Nadelzieher)	Narishige Group (Tokyo, Japan)
Pipetman (Pipette 20 µl, 200 µl, 1000 µl)	Gilson Inc (Middleton, USA)
RiOs™ (Wasserfilteranlage)	Merck KGaA (Darmstadt)
Schüttelinkubator Unitron	INFORS (Einsbach)
Scotsman AF 100	Scotsman Ice Machines (Illinois, USA)
Sleeper®	Inject + Matic (Geneva, Schweiz)
Sonifier® Cell Disruptor B-12	Branson Sonic Power Company (Danbury, USA)
Sorvall® Evolution RC-Kühlzentrifuge	Sorvall (Langenselbold)
StepOnePlus Real-Time PCR System	ThermoFisher Scientific (Waltham, USA)
SUB Aqua Pro	Grant Instruments (Cambridge, UK)
UV-Gel-Dokumentationssystem Intas Gel Jet Imager	Intas (Göttingen)
Vortex-Genie2	Scientific Industries, Inc. (USA)

### 3.1.9 Kits

Tabelle 3.9: Verwendete Kits.

Bezeichnung	Bezugsquelle
GeneJET™ Gel Extraction Kit	ThermoFisher Scientific (Waltham, USA)
GeneJET™ Plasmid Midiprep Kit	ThermoFisher Scientific (Waltham, USA)
GenepHlow™ Gel/PCR Kit	Geneaid Biotech Ltd. (New Taipei City, Taiwan)
ISOLATE II RNA Micro Kit	Bioline (London, UK)
ISOLATE II RNA Mini Kit	Bioline (London, UK)
peqGOLD Plasmid Miniprep Kit II	Peqlab (Erlangen)
Precellys® Lysing Kit (1,4 mm)	Peqlab (Erlangen)
QuantiTect Reverse Transcription Kit	Qiagen (Hilden)
QuantiTect SYBR® Green PCR Kit	Qiagen (Hilden)
TOPO™ TA Cloning™ Kit	ThermoFisher Scientific (Waltham, USA)

### 3.1.10 Bezugsquellen

Chemikalien: Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe), Beckton & Dickinson and Co. (Heidelberg), Sigma Aldrich GmbH (Seelze)

Enzyme und Feinchemikalien: Axon Labortechnik GmbH (Kaiserslautern), Biozol Diagnostica Vertrieb GmbH (Eching), Fermentas GmbH (St. Leon-Rot), Geneaid Biotech Ltd. (New Taipei City, Taiwan), GenScript (Piscataway, New Jersey), Invitrogen GmbH (Darmstadt), Jena Bioscience (Jena), Merck KGaA (Darmstadt), New England BioLabs Inc. (Frankfurt am Main), PeqLab Biotechnologies GmbH (Erlangen), Qiagen GmbH (Hilden), Roche Applied Science (Mannheim), ThermoFisher Scientific (Waltham, USA), VectorLabs Inc. (Burlingame, CA)

Gebrauchs- und Verbrauchsmaterialien: Axon Labortechnik GmbH (Kaiserslautern), Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe), Eppendorf AG (Hamburg), Greiner Bio-One GmbH (Frickenhäusen), Sarstedt AG & Co. KG (Nümbrecht), ThermoFisher Scientific (Waltham, USA)

### 3.1.11 Lösungen und Puffer

Als Lösungsmittel für Lösungen und Puffer wurde, falls nicht anders angegeben, H<sub>2</sub>O<sub>deion.</sub> verwendet. Lösungen und Puffer, die mit \* markiert sind, wurden vor Gebrauch autoklaviert. Sofern nicht anders angegeben, wurden die Lösungen bei Raumtemperatur (RT) gelagert.

**Canadabalsam-Gemisch:** 2 Teile Canadabalsam, 1 Teil Methylsalicylat

**Coomassie-Lösung:** 0,2 % (w/v) Brilliant Blue R250, 0,01 % (w/v) Brilliant Blue G250, 50 % Methanol, 10 % Essigsäure, 40 % H<sub>2</sub>O<sub>deion.</sub>

**Elutionspuffer<sub>Protein</sub>:** 50 mM Tris (pH 8,0)\*, 10 mM Glutathion

**Embryonenwaschpuffer:** 0,7 % (w/v) NaCl, 0,03 % (v/v) TritonX-100

**Entfärbelösung:** 10 % Eisessig, 20 % Methanol, 70 % H<sub>2</sub>O<sub>deion.</sub>

**Ethidiumbromid-Stammlösung:** 10 mg/ml in H<sub>2</sub>O (Lagerung lichtgeschützt bei 4 °C)

**Färbepuffer<sub>insitu</sub>:** 0,1 M NaCl, 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1 mM Tris (pH 9,5), 1 mM Levamisol, 0,1 % (v/v) Tween20

**Fixativ<sub>insitu</sub>:** 1x PBS<sub>insitu</sub>, 10 % Formaldehyd, 50 mM EGTA

**GTE Lösung\*:** 50 mM Glucose, 25 mM Tris (pH 8,0), 10 mM EDTA

**Horseserum:** 85 % 1x PBS<sub>AK</sub>, 10 % PBX, 5 % reines Horseserum, Lagerung bei 4 °C

**HybMix (Hybridisierungslösung):** 50 % (v/v) deionisiertes Formamid, 5x SSC, 100 µg/ml sonifizierte und gekochte Lachssperma-DNA, 100 µg/ml tRNA *E.coli*, 50 µg/ml Heparin, 0,1 % (v/v) Tween20

**Hypochlorit-Lösung:** 1,4 % (w/v) Natriumhypochlorit in H<sub>2</sub>O

**KAc-Lösung\* (5 M):** 29,5 ml Eisessig, etwas H<sub>2</sub>O<sub>deion.</sub> zugeben, mit KOH auf pH 4,8 einstellen, ad 100 ml

**Laemmli Puffer (2x):** 4 % SDS, 20 % Glycerol, 10 % β-Mercaptoethanol, 0,4 % Bromphenolblau, 0,125 M Tris (pH 6,8)

**LiCl/KAc-Lösung:** 1 Teil 5 M KAc, 2,5 Teile 6 M LiCl

**Lysepuffer<sub>GenomischeDNA</sub>:** 0,1 M Tris (pH 7,5), 0,1 M EDTA, 0,1 M NaCl, 0,5 % SDS

**Lysepuffer<sub>Protein</sub>:** 1x PBS<sub>Protein</sub>, 1 mg/ml Lysozym, Zugabe von 1 Tablette ‚cComplete™ Protease Inhibitor‘ ohne EDTA (Roche) pro 20 ml

**Natrium-Phosphat-Puffer (0,1 M):** 0,1 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>(H<sub>2</sub>O) mit 0,1 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>(2H<sub>2</sub>O) mischen, bis pH 7,4

**PBL (sterilfiltriert):** 0,1 M Lysin-HCl, 50 mM Natrium-Phosphat-Puffer, pH 7,4, Lagerung bei 4 °C

**PBS<sub>AK</sub> (10x)\*:** 1,75 M NaCl, 18,6 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>(H<sub>2</sub>O), 84,1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>(2H<sub>2</sub>O), pH 7,4

**PBS<sub>insitu</sub> (10x)\*:** 1,3 M NaCl, 30 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>(H<sub>2</sub>O), 70 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>(2H<sub>2</sub>O), pH 7,4

**PBS<sub>Protein</sub> (10x)\*:** 1,54 M NaCl, 23 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>(H<sub>2</sub>O), 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>(2H<sub>2</sub>O), pH 7,3

**PBT<sub>AK</sub>:** 1x PBS<sub>AK</sub>, 0,2 % Tween20

**PBT<sub>insitu</sub>:** 1x PBS<sub>insitu</sub>, 0,1 % (v/v) Tween20

**PBX:** 1x PBS<sub>AK</sub>, 0,2 % (v/v) TritonX-100

**PEM\*:** 0,1 M PIPES, 1 mM EGTA, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 7,1

**PFA:** 8 % (w/v) Paraformaldehyd, 0,7 % (v/v) 1 M NaOH, Lagerung in 300 µl Aliquots bei -20 °C

**Puffer 1 (sterilfiltriert):** 100 mM RbCl, 30 mM KAc, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 50 mM MnCl<sub>2</sub> (Zugabe erst nach Einstellen des pH-Wertes), 15 % (v/v) Glycerin (Zugabe erst nach Einstellen des pH-Wertes), pH 5,8 (mit Essigsäure einstellen)

**Puffer 2 (sterilfiltriert):** 10 mM MOPS, 75 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM RbCl, 15 % (v/v) Glycerin (Zugabe erst nach Einstellen des pH-Wertes), pH 6,5 (mit KOH einstellen)

**SDS Elektrophorese-Puffer (10x):** 250 mM Tris, 1,9 M Glycin, 1 % (w/v) SDS, pH 8,8

**Tabelle 3.10: Rezept für 4 SDS-Gele.**

SDS-Gele:

Lösung	Trenngel (12 %)	Sammelgel (5 %)
H <sub>2</sub> O <sub>deion.</sub>	9,9 ml	4,1 ml
Rotiphorese Gel30	12 ml	1 ml
1,5 M Tris pH 8,8	7,5 ml	-
1 M Tris pH 6,8	-	0,75 ml
10 % SDS	0,3 ml	60 µl
10 % APS	0,3 ml	60 µl
TEMED	12 µl	6 µl

**SDS/NaOH Lösung:** 0,2 M NaOH, 1 % (w/v) SDS

**SSC (20x)\*:** 3 M NaCl, 0,3 M Natriumcitrat, pH 7,0

**TAE (10x):** 0,4 M Tris (pH 7,4), 0,2 M Natriumacetat, 10 mM EDTA

**TE-Puffer\*:** 10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8,0

**TNB (Tris-NaCl-Blockingpuffer):** 0,1 M Tris (pH 7,5), 0,15 M NaCl, 0,5 % (w/v) Blocking-Reagenz, Lagerung in 500 µl Aliquots bei -20 °C

### 3.1.12 Medien

Alle mit \* markierten Medien wurden autoklaviert. Lösungsmittel ist, wenn nicht anders angegeben, H<sub>2</sub>O<sub>deion.</sub>

**Antibiotikastammlösung Ampicillin:** 100 mg/ml Ampicillin-Natriumsalz in H<sub>2</sub>O<sub>deion.</sub>, Konzentration in LB<sub>Amp</sub>-Platten und LB<sub>Amp</sub>-Flüssigmedium: 100 µg/ml

**Apfelsaftagarplatten\*:** 8 g Agar-Agar in 250 ml H<sub>2</sub>O lösen und autoklavieren. 8 g Zucker in 80 ml Apfelsaft aufkochen und in den flüssigen, heißen Agar geben, einrühren und Platten gießen. Die Lagerung erfolgt bei 4 °C.

**Drosophila-Standard-Futtermedium:** 64 g Fadenagar in 5 l aufgekochtem H<sub>2</sub>O lösen und anschließend 176 g Rübensirup und 640 g Malzextrakt zugeben. 144 g Trockenhefe mit 80 g Sojamehl und 640 g Maismehl in 3 l H<sub>2</sub>O vermischen, zugeben und aufkochen. Die Masse auf 60 °C abkühlen lassen, 50 ml Propionsäure und 24 g Nipagin (4-Hydroxy-benzoesäuremethylester) zugeben und das Futter in Futterröhrchen abfüllen. Die Lagerung erfolgt bei 18 °C.

**LB-Medium\*:** 1 % (w/v) NaCl, 1 % (w/v) Trypton, 0,5 % (w/v) Hefeextrakt

**LB-Agarplatten\*:** 1,5 % (w/v) Bacto-Agar in LB-Medium

**SOC-Medium\*:** 2 % (w/v) Trypton, 0,5 % (w/v) Hefeextrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM MgSO<sub>4</sub>, 20 mM Glucose (nach Autoklavieren zugeben)



## 3.2 Methoden

### *Arbeiten mit Nukleinsäuren*

Zentrifugationen fanden, sofern nicht anders angegeben, bei Raumtemperatur und 13.000 rpm statt.

#### **3.2.1 Präparation genomischer DNA aus 15 Fliegen**

Zur Präparation genomischer DNA wurden 15 Fliegen in einem Reaktionsgefäß gesammelt, 15 min bei -20 °C inkubiert und anschließend mithilfe eines Pistills in 200 µl Lysepuffer<sub>GenomischeDNA</sub> homogenisiert. Dieses Gemisch wurde 30 min bei 65 °C inkubiert, 400 µl LiCl/KAc-Lösung wurden hinzugegeben und 10 min auf Eis inkubiert. Es folgte eine 15-minütige Zentrifugation, wonach der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt, 300 µl 100 % kaltes Isopropanol hinzugegeben und erneut 15 min zentrifugiert wurde. Das resultierende Pellet wurde 5 min in 70 % Ethanol zentrifugiert, luftgetrocknet und anschließend in 50 µl TE-Puffer gelöst. Über kurze Zeit wurde die genomische DNA bei 4 °C gelagert, über lange Zeit bei -20 °C.

#### **3.2.2 Restriktionsverdau**

Für die Restriktionsverdau wurden Enzyme (s. 3.1.6) der Firma ThermoFisher Scientific verwendet, die spezifische Reaktionszusammensetzungen und Puffer (s. 3.1.6) erfordern, sodass jeder Reaktionsansatz neu auf das jeweilige Enzym eingestellt werden musste. Präparative Restriktionsverdau wurden meistens in 20 µl, selten in 50 µl, und analytische Restriktionsverdau in 10 µl Endvolumen angesetzt. Die Restriktionsverdau wurden 1 h bei 37 °C inkubiert.

#### **3.2.3 Standard-Polymerasekettenreaktion (PCR)**

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) dient der Amplifikation von DNA-Sequenzen. Hierbei wird ein gewünschter DNA-Abschnitt mithilfe von spezifischen Oligonukleotiden in wiederholten Zyklen vervielfältigt.

Der Standard-PCR-Ansatz zur analytischen Untersuchung bestand aus 100–500 ng *Template*-DNA, 0,5 µl dNTP-Mix (10 mM), je 0,5 µl *forward*- bzw. *reverse*-Primer (je 50 pMol/µl), 0,5 µl Polymerase und 2,5 µl 10x Polymerase-Puffer inklusive MgCl<sub>2</sub> ad 25 ml H<sub>2</sub>O<sub>deion.</sub>. Der präparative PCR-Ansatz fand in einem Endvolumen von 100 µl statt, wozu alle Reagenzien in vierfacher Menge im Vergleich zu dem analytischen PCR-Ansatz eingesetzt wurden. In der Regel wurde die Standard-PCR mit der Taq-

DNA-Polymerase (5 U/ $\mu$ l) durchgeführt, in Ausnahmefällen mit der Q5 High Fidelity DNA-Polymerase (2 U/ $\mu$ l), die eine *Proofreading*-Aktivität und somit eine geringere Fehlerrate als die Taq-DNA-Polymerase aufweist.

Die PCR-Bedingungen waren wie folgt:

Denaturierung	5 min	→ 95 °C	} 30 Zyklen
Denaturierung	1 min	→ 95 °C	
Annealing	1 min	→ X °C	
Elongation	1 min/1000 bp	→ 72 °C	
Finale Elongation	10 min	→ 72 °C	
Lagerung	$\infty$	→ 4 °C	

Zur Überprüfung genomischer DNA wurde folgendes Kurz-Programm durchgeführt:

Denaturierung	2 min	→ 95 °C	} 30 Zyklen
Denaturierung	15 s	→ 95 °C	
Annealing	15 s	→ X °C	
Elongation	30 s/1000 bp	→ 72 °C	
Finale Elongation	2 min	→ 72 °C	
Lagerung	$\infty$	→ 4 °C	

Die Annealingtemperatur X ist abhängig von den verwendeten Primern (s. Tabelle 3.7), in der Regel wurde aber eine Annealingtemperatur von 60 °C verwendet.

Sollten die PCR-Produkte anschließend sequenziert werden, wurden sie mit dem GenepHlow™ Gel/PCR Kit der Firma Geneaid Biotech Ltd. nach Protokoll des Kits aufgereinigt und zur Sequenzierung an die Firma StarSeq (Mainz) geschickt.

### 3.2.4 Zwei-Schritt reverse Transkriptions- und quantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (RT-qPCR)

Die zwei-Schritt reverse Transkriptions- und quantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (RT-qPCR) dient dazu, die mRNA-Expression zu quantifizieren. Hierzu wurde RNA zunächst mittels reverser Transkription in cDNA umgeschrieben, bevor diese dann zur qPCR eingesetzt wurde (= zwei-Schritt). Alle Arbeitsschritte mit RNA bzw. zur qPCR wurden mit gestopften Pipettenspitzen sowie RNase-freiem H<sub>2</sub>O<sub>deion.</sub> durchgeführt.

#### 3.2.4.1 RNA-Isolation

Die RNA-Isolation aus Gewebe wurde mithilfe des ‚ISOLATE II RNA Micro Kits‘ (Bioline) durchgeführt, die RNA-Isolation aus ganzen Larven mit dem ‚ISOLATE II RNA Mini Kit‘ (Bioline). Hierfür wurden 50 Gehirne bzw. 50 Enddärme oder 20 Larven pro Isolation eingesetzt. Die larvalen und adulten Gehirne sowie die larvalen und adulten Enddärme wurden in 1xPBS<sub>AK</sub> freipräpariert und auf Eis in einem mit 1xPBS<sub>AK</sub> befüllten Reaktionsgefäß gesammelt. Hierbei wurden von jeder Larve bzw. jeder Fliege sowohl das Gehirn als auch der Enddarm präpariert, um zu gewährleisten, dass die Ergebnisse der qPCR miteinander verglichen werden können, da die Gehirne und die Enddärme *in vivo* denselben Bedingungen ausgesetzt waren. Die Larven für die RNA-Isolation aus ganzen Larven wurden über mehrere Tage gesammelt, und auch hier waren die unterschiedlichen Stämme und Kreuzungen genau den gleichen Bedingungen ausgesetzt. So stellten die Gewebe (je 50) und die Larven (je 20) bereits einen repräsentativen Querschnitt für das Experiment dar. Die Larven wurden in 1xPBS<sub>AK</sub> auf Eis gesammelt. Anschließend wurde das 1xPBS<sub>AK</sub> vorsichtig abgenommen, die Gewebe und Larven in Flüssigstickstoff schockgefroren und bis zur RNA-Isolation bei -80 °C aufbewahrt. Zur RNA-Isolation wurden die ganzen Larven mit dem Lysepuffer des ‚ISOLATE II RNA Mini Kits‘ (Bioline) und  $\beta$ -Mercaptoethanol in Precellys® Lysing Reaktionsgefäße mit 1,4 mm Keramikbeads (peqLab) gegeben und mithilfe des Minilys Arbeitsplatz-Homogenisators (peqLab) homogenisiert. Zur Homogenisierung der Gewebe genügte es, diese im Lysepuffer und der TCEP-Lösung des ‚ISOLATE II RNA Micro Kits‘ (Bioline) zu vortexen. Die RNA-Isolation erfolgte stets nach Anleitung des jeweiligen Kits. Die RNA-Konzentration wurde am Spektrophotometer gemessen und die RNA wurde über kürzere Zeit bei -20 °C gelagert, über längere Zeit bei -80 °C.

#### 3.2.4.2 cDNA-Synthese

Zur cDNA-Synthese wurde das ‚QuantiTect Reverse Transcription Kit‘ der Firma Qiagen verwendet. Hierbei wurden zunächst mögliche Verunreinigungen der RNA in Form von genomischer DNA mithilfe eines DNase-enthaltenden Puffers eliminiert, wonach die cDNA-Synthese von allen Regionen der RNA-Transkripte anhand eines Gemisches aus oligo-dT- und Randomhexamer-Primern in einer reversen Transkription stattfand. Zur cDNA-Synthese wurden je 200 ng RNA aus Geweben bzw. je 1000 ng RNA aus ganzen Larven eingesetzt. Die cDNA-Synthese erfolgte stets nach Anleitung des Kits. Für jede RNA wurde eine weitere Reaktion ohne Reverse Transkriptase (noRT) angesetzt, die bei der qPCR als Kontrolle für DNA-Kontaminationen dienen sollte. Die cDNA wurde anschließend mit H<sub>2</sub>O<sub>deion.</sub> auf 5 ng/ $\mu$ l (Gewebe) bzw. 10 ng/ $\mu$ l (ganze Larven) verdünnt und bei -20 °C gelagert.

### 3.2.4.3 qPCR-Durchführung

Die qPCR wurde mithilfe des ‚QuantiTect SYBR® Green PCR Kits‘ (Qiagen) nach Anleitung des Herstellers durchgeführt. Hierbei erfolgte die Quantifizierung der Transkripte mittels SYBR Green, eines Fluoreszenzfarbstoffs, der sich an doppelsträngige DNA anlagert. Es wurden pro qPCR-Reaktion 10 ng Gewebe-cDNA bzw. 20 ng Larven-cDNA eingesetzt. Der qPCR-Ansatz bestand aus 10 µl ‚QuantiTect SYBR® Green PCR Mastermix‘ (Qiagen), je 1 µl *forward*- bzw. *reverse*-Primer (je 10 pMol/µl) ad 18 µl H<sub>2</sub>O<sub>deion.</sub>, wozu dann 2 µl der passend verdünnten cDNA bzw. noRT-Kontrolle oder H<sub>2</sub>O<sub>deion.</sub> für die *noTemplate*-Kontrolle gegeben wurden. Als Referenzgen sowohl für die Gewebe- als auch die Gesamtlarvenuntersuchung diente *α-Tubulin* (vgl. Ponton *et al.*, 2011), das sich in einer Voruntersuchung im Rahmen dieser Arbeit im Vergleich zu drei weiteren gängigen, getesteten Referenzgenen als besonders geeignet für das spezifische Experiment darstellte. Das Referenzgen wird bei der Auswertung zur Normierung der Ergebnisse verwendet, da sich die Expression dieses Gens in den verschiedenen, zu untersuchenden Proben nicht unterscheidet. Deshalb ist es auch von großer Wichtigkeit, das für das jeweilige Experiment ideale Referenzgen in einer Voruntersuchung zu ermitteln. Die qPCR-Reaktionen fanden in 96-Well-Platten statt und wurden mithilfe des StepOnePlus-Cyclers (ThermoFisher Scientific) und der gleichnamigen Software durchgeführt. Hierbei wurden die cDNA-Reaktionen jeweils in technischen Triplikaten angesetzt, die noRT-Kontrollen in technischen Duplikaten und die *noTemplate*-Kontrollen einmal pro Primerpaar. Die qPCR-Bedingungen waren wie folgt:

Denaturierung	10 min	→ 95 °C	} 40 Zyklen
Denaturierung	15 s	→ 95 °C	
Annealing	30 s	→ 60 °C	
Elongation	30 s	→ 70 °C	
Denaturierung	15 s	→ 95 °C	
Annealing	1 min	→ 60 °C	
Denaturierung	15 s	→ 95 °C	
Lagerung	∞	→ 4 °C	

Die Fluoreszenzmessung während der 40 qPCR-Zyklen fand jeweils während der Elongation statt. Anschließend folgte ein abschließender Zyklus für den Erhalt der Dissoziationskurve, in dem die Fluoreszenzmessung zwischen 60 °C und 95 °C in 0,3 °C-Schritten erfolgte. Die Dissoziationskurve zeigt, wie spezifisch die Primer binden und ist somit eine Kontrolle dafür, dass nur das spezifische, gewünschte PCR-Produkt quantifiziert wird. Dennoch wurden alle qPCR-Produkte anschließend zusätzlich gelelektrophoretisch im zweiprozentigen Agarosegel aufgetrennt (s. 3.2.5), um die Primerspezifität auch anhand des Bandenmusters im Agarosegel zu kontrollieren.

#### 3.2.4.4 qPCR-Auswertung

Die Auswertung der qPCR-Ergebnisse wurde anhand der  $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode durchgeführt. Hierbei werden die während der qPCR gemessenen Ct-Werte verrechnet, die jeweils den Zyklus (*Cycle* = C) bezeichnen, bei dem die Fluoreszenz erstmals den vorher festgelegten Schwellenwert (*threshold* = t) überschreitet. Das bedeutet, je niedriger der gemessene Ct-Wert ist, desto höher liegt die jeweilige Transkript-Anzahl in der Ausgangs-RNA vor. Unter Anwendung der  $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode kann mithilfe der Ct-Werte einer gewählten Kontrolle sowie der Ct-Werte des Referenzgens der relative Expressionsunterschied (RQ) zwischen dem Kontroll-Transkript und den übrigen Transkripten errechnet werden. Als Kontrolle wurde für das Gesamtlarvenexperiment jeweils die Probe gewählt, die das Sensorkonstrukt mit wildtypischer *otp* 3'UTR enthält, für die *otp*-Transkriptuntersuchung in den Geweben wurde für die L3-Gewebe das Transkript *otp*-RE im larvalen Gehirn gewählt und für die adulten Gewebe das Transkript *otp*-RE im adulten Gehirn.

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

Zur elektrophoretischen Auftrennung von DNA-Fragmenten wurden in der Regel einprozentige Agarosegele verwendet, bei besonders kleinen Fragmenten zweiprozentige. Die Agarose wurde in 1xTAE-Puffer aufgeköcht und in der Gelkammer auspolymerisiert. Der 1xTAE-Puffer diente ebenso als Laufpuffer. Die DNA-Proben wurden 5:1 mit 6x Gelladepuffer (Carl Roth GmbH + Co. KG) gemischt und aufgetragen, wobei als Marker der ‚GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder‘ für einprozentige und der ‚GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder‘ für zweiprozentige Agarosegele verwendet wurden (beide von ThermoFisher Scientific). Die Stromspannung lag je nach Gelgröße zwischen 80 V und 150 V. Die Agarosegele wurden anschließend für 15–20 min in einem Ethidiumbromid-Bad gefärbt (0,1 % Ethidiumbromid-Stammlösung in 1xTAE-Puffer) und mit einem Intas-Geldokumentationssystem auf einem UV-Tisch fotografiert.

#### 3.2.6 DNA-Isolation aus Agarosegelen

Zur DNA-Isolation aus Agarosegelen wurde die entsprechende Bande unter 70 % UV-Licht mithilfe eines Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten. Die DNA-Isolation erfolgte mit dem ‚GeneJET™ Gel Extraction Kit‘ (ThermoFisher Scientific) stets nach dem Herstellerprotokoll.

### **3.2.7 Fällung von restriktionsverdauten Vektoren**

Zur Fällung von mit Restriktionsenzymen geschnittenen Vektoren (1,5–2 µg) wurde 4 M LiCl in einem 1:5-Verhältnis zu dem Vektor-Volumen gegeben und anschließend mit 1:1 Volumen kaltem 100 % Isopropanol gemischt. Dieser Ansatz wurde 10 min bei -20 °C inkubiert, dann für 15 min bei 4 °C zentrifugiert, das Pellet anschließend in 80 % Ethanol 10 min bei 4 °C zentrifugiert und dann bei Raumtemperatur getrocknet, bevor es in 20 µl 10 mM Tris (pH 8,4) gelöst wurde.

### **3.2.8 Dephosphorylierung von Vektoren mit rAPid Alkaline Phosphatase**

Zur Dephosphorylierung von mit Restriktionsenzymen geschnittenen, gefällten Vektoren wurden 1,5–2 µg Vektor mit 10x rAPid Alkaline Phosphatase Puffer und 1 µl rAPid Alkaline Phosphatase in 20 µl Reaktionsvolumen für 30 min bei 37 °C im Thermocycler inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion durch dreiminütige Inkubation bei 75 °C abgestoppt. Der dephosphorylierte Vektor wurde direkt zur Ligation verwendet.

### **3.2.9 Anfügen von A-Überhängen**

DNA-Fragmente, die als Insert zur TA-Klonierung (s. 3.2.17) verwendet werden sollen und in einer PCR mit der Q5 High Fidelity DNA-Polymerase amplifiziert wurden, besitzen aufgrund der Eigenschaften dieser Polymerase keine A-Überhänge an den 3'-Enden. Um die Fragmente trotzdem in einen Vektor mit T-Überhängen klonieren zu können, wurden 20,5 µl der aufgereinigten PCR-Produkte mit 1 µl dATPs (10 mM), 2,5 µl 10x Taq-Polymerase-Puffer inklusive MgCl<sub>2</sub> und 1 µl Taq-DNA-Polymerase (5U/µl) für 10 min bei 72 °C im Thermocycler inkubiert. Während dieses Prozesses fügt die Taq-DNA-Polymerase die A-Überhänge an, ohne dass die DNA-Fragmente durch Denaturierung verändert werden könnten. Das Anfügen der A-Überhänge fand immer unmittelbar vor der Ligation statt.

### **3.2.10 Herstellung chemisch kompetenter Zellen (Rubidiumchlorid-Methode)**

Zur Herstellung chemisch kompetenter Zellen wurden 10 ml LB-Flüssigmedium mit einer entsprechenden *E.coli*-Kolonie angeimpft und über Nacht (ü. N.) bei 37 °C und 220 rpm inkubiert. Anschließend wurden 250 ml LB-Flüssigmedium mit 2,5 ml der Übernachtskultur angeimpft und so lange bei 37 °C und 220 rpm inkubiert, bis die OD<sub>600</sub> 0,5–0,7 betrug. Diese Kultur wurde dann in vorgekühlte Zentrifugenbecher überführt und 5–10 min auf Eis inkubiert, bevor sie 5 min bei 6000 rpm und 4 °C zentrifugiert wurde. Das resultierende Pellet wurde in 80 ml gekühltem Puffer 1

resuspendiert, 5–10 min auf Eis inkubiert und erneut 5 min bei 6000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet in 8 ml gekühltem Puffer 2 resuspendiert, zu 200 µl in vorgekühlte Reaktionsgefäße aliquotiert und direkt in Flüssigstickstoff schockgefroren. Die so hergestellten Zellen wurden bei -80 °C gelagert.

### **3.2.11 Testen der Transformationseffizienz chemisch kompetenter Zellen**

Zum Testen der Transformationseffizienz der chemisch kompetenten Zellen wurde Plasmid-DNA mit TE-Puffer auf eine Konzentration von 2 pg/µl verdünnt, wobei 5 µl dieser Verdünnung für die Transformation eingesetzt wurden. 100 µl der langsam auf Eis aufgetauten Zellen wurden mit der verdünnten Plasmid-DNA versetzt und 30 min auf Eis inkubiert, bevor ein Hitzeschock für 90 s bei 42 °C erfolgte. Anschließend wurden die Zellen erneut 5 min auf Eis inkubiert, wonach 1 ml LB-Flüssigmedium hinzugegeben wurde. Diese Suspension wurde 45 min bei 37 °C und 220 rpm im Schüttler inkubiert und dann 5 min bei 3000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde bis auf etwa 50 µl abgenommen, das Pellet vorsichtig im restlichen Überstand resuspendiert und alles auf einer LB<sub>Amp</sub>-Platte ausplattiert. Außerdem wurden 50 µl der aufgetauten Zellen ohne Plasmid auf eine LB<sub>Amp</sub>-Platte ausplattiert, die die Negativkontrolle darstellte. Die Platten wurden ü. N. bei 37 °C inkubiert, wonach die gewachsenen Kolonien ausgezählt wurden. Hierbei stehen 100 Kolonien für eine Transformationseffizienz von  $1 \times 10^7$  Kolonien/µg DNA.

### **3.2.12 Transformation von chemisch kompetenten DH5α-Zellen mit Plasmid-DNA**

Die Transformation erfolgte mit 150 ng Plasmid-DNA bzw. 5–15 µl Ligationsgemisch in 100 µl kompetente DH5α-Zellen. Diese wurden auf Eis aufgetaut, die DNA wurde hinzugegeben und der Ansatz 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend folgte ein Hitzeschock für 90 s bei 42 °C, wonach die Zellen wieder 1 min auf Eis inkubiert wurden. Daraufhin wurden 250 µl SOC-Medium hinzugegeben und der Ansatz 1 h bei 37 °C und 220 rpm horizontal geschüttelt. Danach wurden einmal 100 µl und einmal 250 µl auf je einer LB-Platte mit Ampicillin (LB<sub>Amp</sub>) ausplattiert. Die LB<sub>Amp</sub>-Platten wurden ü. N. bei 37 °C inkubiert.

### 3.2.13 Schnell-Transformation von chemisch kompetenten BL21-Zellen mit Plasmid-DNA

Die Transformation erfolgte mit 150 ng Plasmid-DNA in 10  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}_{\text{deion.}}$  in 100  $\mu\text{l}$  kompetenten BL21-Zellen. Dieser Ansatz wurde 15 min auf Eis inkubiert, wonach ein Hitzeschock für 90 s bei 42 °C erfolgte. Anschließend wurde der Ansatz erneut 15 min auf Eis inkubiert und dann auf eine  $\text{LB}_{\text{Amp}}$ -Platte ausplattiert, die ü. N. bei 37 °C inkubiert wurde.

### 3.2.14 Kolonie-PCR

Zur Überprüfung von auf  $\text{LB}_{\text{Amp}}$ -Platten gewachsenen Kolonien auf die gewünschte Plasmid-DNA wurden einige Kolonien einzeln mit einem sterilen Zahnstocher von der Platte gepickt, kurz auf einer neuen  $\text{LB}_{\text{Amp}}$ -Platte (100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) abgestrichen und einzeln in je ein PCR-Reaktionsgefäß in 3  $\mu\text{l}$  20 mM NaOH eingerührt. Dieses Gemisch wurde dann 10 min bei 99 °C im Thermocycler inkubiert und konnte anschließend als *Template* für eine PCR-Reaktion mit einem Endvolumen von 25  $\mu\text{l}$  verwendet werden. Die  $\text{LB}_{\text{Amp}}$ -Platte mit den neu abgestrichenen Kolonien wurde ü. N. bei 37 °C inkubiert, sodass mit positiv getesteten Kolonien am nächsten Tag eine Flüssigkultur angeimpft werden konnte.

### 3.2.15 Isolation von Plasmid-DNA mittels Alkalischer Lyse (Minipräparation)

Nach der Transformation von chemisch kompetenten Zellen wurden gewachsene Kolonien einzeln gepickt und damit 3 ml  $\text{LB}_{\text{Amp}}$ -Flüssigmedium angeimpft. Dieses wurde ü. N. bei 37 °C und 220 rpm im Schüttler inkubiert, bevor am nächsten Tag die Isolation von Plasmid-DNA stattfinden konnte. Hierzu wurden je 2 ml der Übernachtskulturen in neue Reaktionsgefäße überführt und diese 1 min zentrifugiert. Das Pellet wurde in 100  $\mu\text{l}$  GTE-Lösung durch Vortexen gelöst, anschließend wurden 200  $\mu\text{l}$  SDS/NaOH-Lösung hinzugegeben. Das Gemisch wurde invertiert und 5 min bei RT inkubiert. Nach der folgenden Zugabe von 150  $\mu\text{l}$  KAc wurde die Mischung erneut invertiert und 5 min auf Eis inkubiert. Anschließend folgte eine 10-minütige Zentrifugation. Der Überstand wurde in einem neuen Reaktionsgefäß mit 800  $\mu\text{l}$  kaltem 100 % Ethanol versetzt und 2 min auf Eis inkubiert. Nach einer erneuten 10-minütigen Zentrifugation wurde das entstandene Pellet 2 min in 70 % Ethanol zentrifugiert, anschließend getrocknet und in 20  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}_{\text{deion.}}$  gelöst. Die isolierte Plasmid-DNA wurde bei -20 °C gelagert.



### 3.2.16 Plasmid-Isolation mit Aufreinigungs-Kits

Um reine Plasmid-DNA in hoher Konzentration zu erhalten, wurde LB<sub>Amp</sub>-Flüssigmedium mit einer positiv getesteten DH5 $\alpha$ -Kolonie oder -Kultur angeimpft und ü. N. bei 37 °C und 220 rpm im Schüttler inkubiert. Je nach benötigter Menge wurde das ‚peqGOLD Plasmid Miniprep Kit II‘ der Firma PeqLab Biotechnologie oder das ‚GeneJET™ Plasmid Midi Prep Kit‘ der Firma ThermoFisher Scientific verwendet. Die Plasmid-Isolation erfolgte stets nach Anleitung des jeweiligen Kits. Die isolierte Plasmid-DNA wurde bei -20 °C gelagert.

### 3.2.17 Klonierung von PCR-Produkten in den pCR® 2.1 TOPO® Vektor (ThermoFisher Scientific)

Mithilfe des ‚TOPO™ TA Cloning™ Kits‘ (ThermoFisher Scientific) wurden PCR-Produkte mittels TA-Klonierung in den pCR® 2.1 TOPO® Vektor kloniert, was dazu diente, Inserts für die Weiterklonierung in einen anderen Vektor stabil zu halten sowie vervielfältigen und bei Bedarf sequenziell überprüfen zu können. Außerdem wurde eine solche Klonierung dazu verwendet, Sequenzen aus heterozygoten Fliegenstämmen in reiner Form sequenzieren zu können. Hierzu wurden PCR-Produkte, die auf einem heterozygot vorliegenden, genomischen DNA-*Template* basierten, zur Klonierung eingesetzt, woraus ein theoretisches 50:50 Verhältnis von Klonen resultierte, die entweder den einen, wildtypischen oder den anderen, mutierten DNA-Strang enthielten. Der Ligationsansatz bestand aus 50 ng des linearisierten pCR® 2.1 TOPO® Vektors in einem 1:2 Verhältnis zu dem A-Überhänge-enthaltenden PCR-Produkt, 1  $\mu$ l 10x T4 Ligase-Puffer und 1  $\mu$ l T4 Ligase *ad* 10  $\mu$ l H<sub>2</sub>O<sub>deion.</sub>. Die Ligation erfolgte für 4 h bei 14 °C, wonach 5  $\mu$ l des Ligationsansatzes zur Transformation von DH5 $\alpha$ -Zellen (s. 3.2.12) eingesetzt wurden. Um positive Klone schneller identifizieren zu können, wurde eine Blau-Weiß-Selektion durchgeführt, die auf der enzymatischen Aktivität des Enzyms  $\beta$ -Galaktosidase basiert. Hierzu wurde der Bakterienstamm DH5 $\alpha$  hinzugezogen, der eine Mutation im  $\beta$ -Galaktosidase-Gen *lacZ* trägt, was darin resultiert, dass kein funktionsfähiges Enzym exprimiert wird. Gleichzeitig beinhaltet der verwendete Vektor pCR® 2.1 TOPO® eine Sequenz für das sogenannte  $\alpha$ -Peptid der  $\beta$ -Galaktosidase, das die defekte Form des Proteins zu einer funktionsfähigen Form vervollständigen kann. Die LB<sub>Amp</sub>-Platten, die nach der Transformation zum Ausplattieren benutzt werden sollten, wurden mit IPTG (100 mM, 40  $\mu$ l/Platte) und X-Gal (40 mg/ml in DMSO, 40  $\mu$ l/Platte) bestrichen, Substrate, die durch die  $\beta$ -Galaktosidase in blaue Farbprodukte umgesetzt werden. Da die *Multiple Cloning Site* (MCS) des Vektors innerhalb der Sequenz des  $\alpha$ -Peptids liegt, können nur Klone, die ein Plasmid ohne Insert tragen, eine funktionsfähige  $\beta$ -Galaktosidase bilden, IPTG und X-Gal umsetzen und dadurch blau erscheinen. Klone, die das Insert tragen, werden im Umkehrschluss als weiße Kolonien sichtbar, da die Sequenz des  $\alpha$ -Peptids durch das Insert unterbrochen wird und somit keine

aktive Form der  $\beta$ -Galaktosidase gebildet werden kann. Weiße Kolonien wurden mittels Kolonie-PCR (s. 3.2.14) überprüft und mit Klonen, die das Insert tragen, wurden Übernachtskulturen zur Plasmid-Präparation mit dem ‚peqGOLD Plasmid Miniprep Kit II‘ der Firma PeqLab Biotechnologie angeimpft. Sollte das Insert sequenziell überprüft werden, wurden nach der Präparation der Plasmid-DNA 10  $\mu$ l (100 ng/ $\mu$ l) (s. 3.2.16) zur Sequenzierung an die Firma StarSeq (Mainz) geschickt.

### **3.2.18 Klonierungsstrategie für die Reintegration der *homeobrain* Exons 2 und 3 in den *Genetargeting*-Stamm 34G10,35A03<sup>GT</sup> mithilfe des Reintegrationsvektors RIV<sup>white</sup>**

Zur Amplifikation des die *homeobrain* (*hbn*) Exons 2 und 3 enthaltenden Inserts wurde eine PCR mit der Q5 High Fidelity DNA-Polymerase (2 U/ $\mu$ l), den Primern 34G10GT3 und 35A03GT2 und dem Klon BACR10P11 als *Template*, der unter anderem die genomische DNA von *hbn* enthält, durchgeführt. Das PCR-Produkt wurde durch die gelelektrophoretische Auftrennung (s. 3.2.5) von 1  $\mu$ l auf seine Reinheit überprüft und anschließend zur Zwischenklonierung in den pCR<sup>®</sup> 2.1 TOPO<sup>®</sup> Vektor (ThermoFisher Scientific) eingesetzt. Hierzu wurden dem PCR-Produkt zunächst A-Überhänge angefügt (s. 3.2.9), bevor die Klonierung stattfand (s. 3.2.17). Die mit dem ‚peqGOLD Plasmid Miniprep Kit II‘ (PeqLab Biotechnologie) aufgereinigte Plasmid-DNA (s. 3.2.16) aus mittels Kolonie-PCR (s. 3.2.14) positiv getesteten Klonen wurde jeweils einem *EcoRI*-Restriktionsverdau unterzogen (s. 3.2.2). Dieses Enzym schneidet das Insert aufgrund der Lage der Schnittstellen im pCR<sup>®</sup> 2.1 TOPO<sup>®</sup> Vektor wieder aus dem Vektor heraus, wodurch die Integration eines Inserts über eine gelelektrophoretische Auftrennung (s. 3.2.5) überprüft werden kann. Gleichzeitig wurde ein Restriktionsverdau mit den Enzymen *BbsI* und *HindIII* angesetzt (s. 3.2.2), um die Orientierung des Inserts zu überprüfen. *BbsI* schneidet hier spezifisch im 3'-Bereich des Inserts, sodass bei gleichzeitiger Restriktion durch *HindIII*, welches im Vektor schneidet, je nach Orientierung des Inserts unterschiedliche Fragmentgrößen entstehen. Für diese Klonierung ist es von großer Bedeutung, dass das Insert in der korrekten Orientierung im pCR<sup>®</sup> 2.1 TOPO<sup>®</sup> Vektor vorliegt, da es codierende Bereiche enthält, die im resultierenden transgenen Fliegenstamm funktionell vorliegen müssen. Alle Restriktionsverdau wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt (s. 3.2.5) und geeignete Klone zur Sequenzierung an die Firma StarSeq (Mainz) geschickt (je 10  $\mu$ l, 100 ng/ $\mu$ l, Primer M13). Daraufhin wurde ein sequenziell einwandfreier Klon zur Weiterklonierung verwendet.

Die Klonierung in den Reintegrationsvektor RIV<sup>white</sup> (Baena-Lopez et al., 2013) erfolgte über Restriktionsschnittstellen. Hierzu wurde das Insert mithilfe der Enzyme *EcoRI* und *Acc65I* aus dem pCR<sup>®</sup> 2.1 TOPO<sup>®</sup> Vektor ausgeschnitten (s. 3.2.2), wobei 1  $\mu$ g DNA eingesetzt wurde. Analog dazu wurde der Reintegrationsvektor RIV<sup>white</sup> (2  $\mu$ g) ebenfalls einem Restriktionsverdau mit *EcoRI* und *Acc65I* unterzogen (s. 3.2.2). Der Restriktionsverdau des Inserts wurde gelelektrophoretisch

aufgetrennt (s. 3.2.5), die entsprechende Insert-Bande aus dem Agarosegel ausgeschnitten und das Insert mithilfe des ‚GeneJET™ Gel Extraction Kit‘ (ThermoFisher Scientific) aus dem Agarosegel isoliert (s. 3.2.6). Die durch den Restriktionsverdau linearisierte Vektor-DNA wurde gefällt (s. 3.2.7) und dephosphoryliert (s. 3.2.8), bevor 100 ng zur Ligation eingesetzt wurden. Die Ligation fand in einem 1:2-Verhältnis von Vektor und Insert in einem Gesamtvolumen von 15 µl mit 1,5 µl 10x T4 Ligase-Puffer sowie 1,5 µl T4 Ligase für 2,5 h bei 16 °C statt. Anschließend wurde der komplette Ligationsansatz zur Transformation von DH5α-Zellen eingesetzt (s. 3.2.12). Positive Klone wurden mittels Kolonie-PCR (s. 3.2.14) und gelelektrophoretischer Auftrennung (s. 3.2.5) identifiziert, wonach mit zwei positiven Klonen Übernachtskulturen zur Präparation der Plasmid-DNA mittels ‚peqGOLD Plasmid Miniprep Kit II‘ (PeqLab Biotechnologie) (s. 3.2.16) angeimpft wurden. Nach der Plasmid-Isolation wurden einige Kontroll-Restriktionsverdau (s. 3.2.2) mit verschiedenen Enzymen durchgeführt, um die Klone auf das Insert zu überprüfen. Im Anschluss wurde die überprüfte DNA zur Injektion (s. 3.2.26) verwendet.

### **3.2.19 Klonierungsstrategie zur Herstellung von GST-Fusionsproteinen**

Zur Herstellung eines Otp-PE-spezifischen Antikörpers wurden die Exon-Sequenzen zwischen Translationsstart des Transkripts otp-RE und Translationsstart des Transkripts otp-RC in den Vektor pGEX4T-1 inkloniert. Dieser enthält zum einen einen an die MCS des Vektors angrenzenden Glutathion-S-Transferase (GST)-Tag, der es später ermöglicht, das Protein aufzureinigen. Zum anderen ist ein lac-Operon enthalten, sodass die Expression des GST-Fusionsproteins mit dem Lactose-Analogen IPTG induziert werden kann. Zur Herstellung des Inserts wurde eine PCR mit dem die cDNA des Transkripts otp-RE enthaltenden Klon cW26/2 als *Template*, den Primern otp-PE for und otp-PE rev und der Taq-DNA-Polymerase durchgeführt (s. 3.2.3). Das gesamte PCR-Produkt wurde gelelektrophoretisch aufgetrennt (s. 3.2.5) und mithilfe des ‚GeneJET™ Gel Extraction Kits‘ (ThermoFisher Scientific) aus dem Agarosegel isoliert. Die Elution fand in 35 µl H<sub>2</sub>O<sub>deion.</sub> statt, womit anschließend ein Restriktionsverdau mit *EcoRI* und *XhoI* in einem Gesamtvolumen von 50 µl durchgeführt wurde (s. 3.2.2). Da die Klonierung über Restriktionsschnittstellen stattfand, wurden zeitgleich 2 µg des Vektors einer Restriktion mit *EcoRI* und *XhoI* unterzogen (s. 3.2.2). Beide Restriktionen wurden anschließend 20 min bei 80 °C inaktiviert und der Vektor wurde dephosphoryliert (s. 3.2.8). Daraufhin wurden Vektor und Insert mithilfe des ‚GenepHlow™ Gel/PCR Kits‘ (Geneaid Biotech) nach Protokoll 2 des Kits aufgereinigt. Die Ligation wurde mit 100 ng Vektor im 1:3 Insert-Verhältnis mit 1 µl T4 Ligase und 1 µl 10x T4 Ligase-Puffer in einem Endvolumen von 10 µl für 3 h bei 25 °C durchgeführt. Anschließend folgte die Transformation von DH5α-Zellen (s. 3.2.12). Mit einigen Kolonien wurden Flüssigkulturen zur Minipräparation (s. 3.2.15) angeimpft,

und nach der Plasmid-Isolation wurde jeweils eine PCR (s. 3.2.3) mit den Primern pGEX3 und pGEX5 sowie eine mit den Primern otp-PE for und otp-PE rev zur Kontrolle angesetzt. Die PCR-Produkte wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt (s. 3.2.5), und mit zwei positiv getesteten Klonen wurden Übernachtskulturen zur Isolation der Plasmid-DNA mithilfe des ‚GeneJET™ Plasmid Midi Prep Kit‘ (ThermoFisher Scientific) angeimpft. Nach der Plasmid-Isolation wurden je 10 µl der Plasmid-DNA (120 ng/µl, Primer pGEX5) zur Sequenzierung an die Firma StarSeq (Mainz) geschickt, um sicherzugehen, dass das Insert sequenziell fehlerfrei vorliegt. Im Anschluss wurde die überprüfte Plasmid-DNA zur Expression und Aufreinigung des Proteins weiterverwendet (s. 3.2.21).

## *Arbeiten mit Proteinen*

### **3.2.20 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Um Proteinproben gelelektrophoretisch aufzutrennen, wurden 0,75 mm dicke SDS-Polyacrylamid-Gele mit fünfprozentigem Sammelgel, zwölfprozentigem Trenngel und 15 Taschen verwendet. Zum Gießen der Gele und zur gelelektrophoretischen Auftrennung wurden Gelsysteme der Firma Bio-Rad verwendet. Die Proteinproben wurden mit denaturierendem 2x Laemmli Puffer versetzt und 10 min bei 95 °C inkubiert. Anschließend wurden je 5 µl in die Taschen pipettiert und das Gel zur Konzentration der Proben im Sammelgel einer Spannung von 60 V ausgesetzt. Sobald die nun konzentrierte Proteinbande die Sammelgel-Trenngel-Grenze erreichte, wurde die Spannung auf 120 V erhöht und die Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Als Marker für das Molekulargewicht wurden der ‚PageRuler™ Unstained Protein Ladder‘ und der ‚PageRuler™ Prestained Protein Ladder‘ (beide ThermoFisher Scientific) verwendet. Die Gele wurden anschließend 1 h in Coomassie-Lösung sanft bewegt gefärbt und danach bis zur deutlichen Sichtbarkeit der Banden mit Entfärbelösung, die alle 15 min ausgetauscht wurde, entfärbt. Ü. N. wurden die Gele in H<sub>2</sub>O gelagert und anschließend noch einige Male in H<sub>2</sub>O gewaschen, bevor sie mehrere Stunden sanft bewegt in 5 % Glycerol in H<sub>2</sub>O inkubiert wurden. Danach wurden die Gele in Rahmen gespannt und über mehrere Tage getrocknet.

### 3.2.21 Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen über Glutathion-Sepharose im Batch-Verfahren

GST-Fusionsproteine wurden über Glutathion-Sepharose im Batch-Verfahren aufgereinigt. Hierzu wurden zunächst BL21-Zellen innerhalb einer Schnell-Transformation (s. 3.2.13) mit dem spezifischen pGEX4T-1-Konstrukt transformiert. Mit einer der gewachsenen Kolonien wurde anschließend eine Vorkultur von 100 ml LB<sub>Amp</sub>-Flüssigmedium angeimpft und ü. N. bei 37 °C und 220 rpm im Schüttler inkubiert.

#### 3.2.21.1 Zellpräparation

250 ml LB<sub>Amp</sub>-Flüssigmedium wurden mithilfe der Vorkultur auf eine OD<sub>600</sub> von 0,1–0,2 angeimpft und so lange bei 37 °C und 220 rpm inkubiert, bis die OD<sub>600</sub> 0,5–1 betrug. Anschließend wurde die GST-Fusionsproteinexpression durch die Zugabe von IPTG (1 mM Endkonzentration) induziert und die Kultur 3,5 h bei 37 °C und 220 rpm inkubiert. Die Zellernte fand durch zehnmündige Zentrifugation bei 5000 rpm und 4 °C (Sorvall Evolution RC, Rotor SLA-1500) statt. Das Pellet wurde in 20 ml Lysepuffer<sub>Protein</sub> resuspendiert und die Suspension wurde 30 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mittels Sonifikation (4x 30 s) aufgeschlossen. Durch eine dreißigminütige Zentrifugation bei 12.000 rpm und 4 °C (Sorvall Evolution RC, Rotor SLA-600) wurden die Zelltrümmer pelletiert, und das GST-Fusionsprotein befand sich im klaren Überstand, im Folgenden ‚Sonikat‘ genannt. Während der Zellpräparation wurden die Proben ‚vor Induktion‘, ‚nach Induktion‘, ‚Überstand‘ und ‚Pellet‘ genommen, die anschließend mit 1x Laemmli Puffer (Pellets) bzw. 2x Laemmli Puffer (Flüssigkeit) verdünnt und bei -20 °C gelagert wurden, bis sie zur gelelektrophoretischen Kontrolle benötigt wurden (s. Tab. 3.10).

#### 3.2.21.2 Vorbereitung der Matrix

Es wurden pro Sonikat 500 µl Glutathion Sepharose 4B (GE Healthcare) vorbereitet. Diese wurden zunächst 5x 5 min in je 4 ml 1x PBS<sub>Protein</sub> bei 500 rpm zentrifugiert und bis zur Weiterverwendung in 500 µl 1x PBS<sub>Protein</sub> gelagert.

#### 3.2.21.3 Proteinaufreinigung

Die Proteinaufreinigung fand je nach Lösungsvolumen in 15 ml- und 50 ml-Falkons statt. Das Sonikat wurde zur Matrix gegeben und ü. N. bei 4 °C auf dem Taumler inkubiert. Anschließend wurde die Matrix 10 min bei 1000 xg und 4x 5 min in je 4 ml 1x PBS<sub>Protein</sub> bei 500 rpm zentrifugiert. Zur Elution wurde die Matrix in 1 ml 1x PBS<sub>Protein</sub> in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt und 4 min bei 800 rpm zentrifugiert. Die Elution erfolgte 3x mit je 500 µl Elutionspuffer<sub>Protein</sub> und abschließend ein viertes

Mal mit 1 ml Elutionspuffer<sub>Protein</sub>. Hierzu wurde die Matrix mit Elutionspuffer<sub>Protein</sub> jeweils 10 min bei RT auf dem Taumler inkubiert und anschließend 4 min bei 800 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde jeweils abgenommen, als Elution in je einem frischen Reaktionsgefäß in Flüssigstickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert. Während der Proteinaufreinigung wurden die Proben ‚Durchlauf‘ (Überstand nach Säulenbindung) und ‚Waschschritte‘ (aus einem Pool aller Wasch-Überstände) entnommen sowie jeweils 50 µl jeder Elution. Diese wurden mit 2x Laemmli Puffer verdünnt und bei -20 °C gelagert, bis sie zur gelelektrophoretischen Kontrolle verwendet wurden (s. Tab. 3.10). Die Elutionsfraktionen wurden nach einer Konzentrationsüberprüfung am NanoDrop-Spektrophotometer (Peqlab) in 100 µg-Aliquots zur Herstellung polyklonaler Antikörper im Kaninchen verwendet.

## *Arbeiten mit *Drosophila melanogaster**

### **3.2.22 Fliegenzucht**

Die verwendeten Fliegenstämme wurden bei 24 °C und einer Luftfeuchtigkeit von 60 % in Futterröhrchen auf Standard-Futtermedium gehalten. Unter diesen Bedingungen beträgt die Generationszeit etwa 12 Tage.

### **3.2.23 Letalitätsanalyse**

Zur Letalitätsanalyse von mutanten Fliegenstämmen wurden Fliegen in Zuchtbecher auf Apfelsaftplatten überführt und zur Eiablage über einige Stunden bei 24 °C inkubiert. Anschließend wurden die abgelegten Eier ausgezählt und die Apfelsaftplatten für 24 h bei 24 °C gelagert. Danach wurden die geschlüpften Larven gezählt und in frische Futterröhrchen überführt, die bis zum Ende der Letalitätsanalyse bei 24 °C gelagert wurden. Nach der Verpuppung wurden die Puppen gezählt und nach dem Schlüpfen die Fliegen.

### **3.2.24 Absammeln von virginellen Weibchen (Jungfrauen) für Kreuzungen**

Um auszuschließen, dass für Kreuzungen verwendete Weibchen bereits befruchtet sind, wurden alle älteren Fliegen aus einem Futterröhrchen verworfen und das Röhrchen mit Puppen, Larven und Embryonen zweimal täglich auf neu geschlüpfte Fliegen untersucht. Jungfrauen zeichnen sich durch ihre helle Körperfarbe, eventuell noch nicht ausgefaltete Flügel und das Meconium, die typische, dunkle Stelle am ventralen Abdomen, aus. Männliche Tiere wurden verworfen.

### 3.2.25 Rekombination

Das natürliche Ereignis der Rekombination, das bei *Drosophila* in der weiblichen Keimbahn stattfindet, kann sich zu Nutze gemacht werden, um mehrere genetische Abschnitte auf dem gleichen Chromosom stabil zu koppeln. Hierzu wurden Fliegen, die je eines der genetischen Elemente tragen, miteinander gekreuzt und Nachkommen mit beiden Elementen mit Fliegen des Stammes yw<sup>67c23</sup> rückgekreuzt. Bei einem erfolgreichen Rekombinationsereignis treten in der Folgegeneration einige wenige männliche Tiere auf, in denen beide Elemente nachgewiesen werden können und die anschließend balanciert wurden (s. 3.2.27).

### 3.2.26 Durchführung einer Keimbahntransformation

#### 3.2.26.1 Injektionsmaterial

Zur Injektion wurde Plasmid-DNA, die mithilfe eines Kits aufgereinigt wurde (s. 3.2.16), in H<sub>2</sub>O<sub>deion.</sub> verwendet, wobei die Konzentration 400–450 ng/μl betrug.

#### 3.2.26.2 Absammeln, Dechorionieren und Aufreihen von Embryonen

Zur Injektion wurden Fliegen des zu injizierenden Stammes etwa eine Woche nach dem Schlüpfen in Zuchtbecher auf mit Hefe bestrichene Apfelsaftplatten überführt und bei 24 °C und 60 % Luftfeuchtigkeit gehalten. Vor Beginn der Injektion wurden die Apfelsaftplatten gewechselt und die Becher 45 min bei 24 °C gelagert, um zu gewährleisten, dass in dieser Zeit alle älteren Eier abgelegt werden. Anschließend wurden die Apfelsaftplatten alle 30 min gewechselt, um sicherzustellen, dass sich der Großteil der Embryonen zum Injektionszeitpunkt noch im richtigen Alter befindet. Hierbei sollten die Embryonen etwa 45–55 min alt sein und sich noch vor der Polzellbildung befinden, die die Keimbahnvorläuferzellen darstellen, in welche die DNA bei der Zellbildung mit einbezogen werden soll. Die Apfelsaftplatten mit den höchstens 30 min alten Embryonen wurden direkt nach dem Abnehmen mit 50 % Hypochlorit-Lösung überschichtet und 1 min 30 s vorsichtig bewegt. Die dadurch dechorionierten Embryonen wurden durch ein Netzchen gespült und darin mit Embryonenwaschpuffer gewaschen. Das Netzchen wurde zunächst zum Entfernen der Flüssigkeit auf ein Papiertuch gelegt und anschließend auf eine frische, eisgekühlte Apfelsaftplatte, wobei die Embryonen vorsichtig mit einer Präpariernadel auf die abgeschnittene Kante der Apfelsaftplatte überführt wurden. Hierbei wurden die Embryonen so aufgereiht, dass sie mit dem anterioren Teil in Richtung Kante zeigten und dass keine Berührung untereinander stattfand. Anschließend wurden sie im aufgereihten Zustand mithilfe von doppelseitigem Klebeband (Tesa Photo Film Tape, 12 mm breit) auf ein Deckglas überführt, sodass sich die posterioren Enden etwa 2 mm vom Rand des Deckglases

befanden. Dieses Deckglas wurde dann zum Trocknen der Embryonen in eine Trockenkammer über Silicakugeln gelegt, wobei die Trockenzeit je nach Umgebungstemperatur, Luftfeuchtigkeit und Zustand der Silicakugeln zwischen 6 min 30 s und 7 min 30 s betrug. Danach wurden die Embryonen auf dem Deckglas mit auf 18 °C gekühltem Voltalef® überschichtet, um eine Austrocknung zu verhindern.

### 3.2.26.3 Injektion

Die Injektionsnadeln wurden mit dem PC-10 Pipette Puller (Narishige) unter der Einstellung 1 Pull bei 50 °C aus Glaskapillaren mit 1 mm Durchmesser hergestellt. Die Injektion erfolgte unter dem inversen Mikroskop Axiovert 25 (Zeiss) und einem Mikromanipulator (Leitz). Vor der Injektion wurde die Injektionsnadel mit einer Microloader-Pipettenspitze (Eppendorf) mit 2,5 µl Injektionsmaterial befüllt, am Micromanipulator befestigt und durch vorsichtige Berührung mit dem Objektträger geöffnet. Das Deckglas wurde mit den Embryonen nach oben auf den Objektträger gelegt und die Injektion erfolgte nacheinander in das posteriore Ende der Embryonen. Das Injektionsmaterial wurde in definierter Menge durch einen kurzen Druckimpuls, der durch das FemtoJet-Luftdruck Injektionsgerät (Eppendorf) aufgebaut wurde, in die Embryonen befördert. Je nach Größe der Nadelöffnung variierte der Injektionsdruck  $p_i$  zwischen 0,80 und 1,30.

### 3.2.26.4 Behandlung injizierter Embryonen

Das Deckglas mit den injizierten Embryonen wurde ü. N. in einer feuchten Kammer bei 18 °C inkubiert. Anschließend wurde es auf eine Apfelsaftplatte mit seitlichem Hefestreifen überführt, die Embryonen bei Bedarf erneut mit Voltalef® überschichtet und bei 24 °C und 60 % Luftfeuchtigkeit gelagert. Geschlüpfte L2- und L3-Larven wurden 4–6 Tage nach der Injektion in frische Futterröhrchen überführt und zur weiteren Entwicklung bei 24 °C und 60 % Luftfeuchtigkeit gehalten.

### 3.2.26.5 Selektion von Transformanten

Nach der Injektion geschlüpfte Fliegen (G0-Generation) wurden einzeln mit je 3 Tieren des anderen Geschlechts des Stammes  $yw^{67c23}$  rückgekreuzt und bei 24 °C und 60 % Luftfeuchtigkeit gehalten. Nachkommen (G1-Generation), die das injizierte Konstrukt in der Keimbahn tragen, prägen das auf dem Plasmid enthaltene Markergen *white* aus, sind so phänotypisch leicht aufgrund ihrer roten Augen zu selektieren und werden im Folgenden als Transformanten bezeichnet. Männliche Transformanten wurden direkt balanciert (s. 3.2.27), weibliche Transformanten zur Sicherheit zur Vervielfachung einzeln mit 3 männlichen  $yw^{67c23}$ -Fliegen rückgekreuzt. Nach erfolgreicher Herstellung des jeweiligen transgenen Fliegenstammes wurden die jeweiligen Transformanten oder deren



Nachkommen nach der Präparation der genomischen DNA (s. 3.2.1) molekular mittels PCR (s. 3.2.3) überprüft.

### **3.2.27 Balancierung transgener Fliegen**

Zur heterozygoten Stabilisierung von Deletionen, Mutationen oder Insertionen werden Balancerchromosomen verwendet, die selektierbare Markergene tragen, vielfache Inversionen besitzen, die eine Rekombination verhindern, und über einen rezessiven Letalfaktor verfügen, sodass keine Fliegen auftreten, die den Balancer homozygot tragen. Um genetische Veränderungen auf dem zweiten Chromosom zu stabilisieren, wurden männliche Fliegen mit dem zweitchromosomalen Balancerstamm  $yw^{1118}; Sco/CyO; +/+$  gekreuzt, um genetische Veränderungen auf dem dritten Chromosom zu stabilisieren, wurden männliche Fliegen mit dem drittchromosomalen Balancerstamm  $w^{1118}; +/+; TM6B,Tb/TM3,Sb$  gekreuzt. Zur Kombination einer genetischen Veränderung auf dem zweiten Chromosom mit einer genetischen Veränderung auf dem dritten Chromosom wurde der Doppel-Balancerstamm BL7198 ( $w; Kr[If]/CyO; D/TM3,Ser$ ) zur Kreuzung verwendet. Die Selektion der F1-Nachkommen erfolgte anhand der phänotypischen Ausprägung der gewünschten Marker. F1-Nachkommen mit diesem Phänotyp wurden untereinander gekreuzt (‚Selbstung‘), wonach die F2-Generation die genetische Veränderung über dem Balancerchromosom trägt oder, falls solche Fliegen lebensfähig sind, die Veränderung auch homozygot vorliegt.

## *Histologische Methoden*

### **3.2.28 Absammeln und Fixieren von Embryonen zur Immunfluoreszenzfärbung bzw. zur *in situ* Hybridisierung**

Die Fliegen des gewünschten Stammes wurden in Becher auf mit Hefe bestrichene Apfelsaftplatten überführt, die zweimal täglich gewechselt und anschließend, je nach für die Färbung benötigtem Embryonalalter, bei 24 °C inkubiert oder bei 4 °C gelagert wurden. Zum Absammeln und Fixieren der Embryonen wurde ein 15 ml Falcon mit 7 ml Heptan, 6,3 ml PEM und 700 µl 37 % Formaldehyd (zur Immunfluoreszenzfärbung) bzw. mit 7,5 ml Heptan und 7,5 ml Fixativ für *in situ* (zur *in situ* Hybridisierung) vorbereitet. Die Platten mit den Eiern wurden mit einer 50 % Hypochlorit-Lösung überschichtet und 2 min vorsichtig bewegt, bevor die dechorionierten Embryonen durch ein Netzchen abgossen wurden. Die Platten und die Netzchen mit den Embryonen wurden mit Embryonenwaschpuffer abgespült und das Netz mit den Embryonen im vorbereiteten Falcon ausgeschwenkt, bis sich alle Embryonen im Falcon befanden. Zur Fixierung wurden die Embryonen anschließend 12 min (zur Immunfluoreszenzfärbung) bzw. 15 min (zur *in situ* Hybridisierung) im

Rotator über-Kopf getaumelt. Danach wurden beide Phasen abgenommen und zum Deviellinieren je 7 ml Heptan und Methanol zu den Embryonen gegeben. Nach energischem Schütteln für 2 min wurden die Embryonen dreimal mit je 5 ml Methanol gewaschen. Anschließend wurden die Embryonen bei -20 °C in Methanol gelagert.

### **3.2.29 Präparation und Fixierung von larvalen und adulten Geweben zur Immunfluoreszenzfärbung**

Zur Präparation larvaler Gewebe wurden L3-Larven in einem Blockschälchen mit 1x PBS<sub>AK</sub> auf Eis gesammelt, zur Präparation adulter Gewebe wurden Fliegen im Blockschälchen 30 s in 90 % Ethanol inkubiert, anschließend 30 s in 1x PBS<sub>AK</sub> gewaschen und anschließend in 1x PBS<sub>AK</sub> auf Eis gesammelt. Freigelegte larvale Gehirne wurden mit Mundhaken und Flügel-Imaginalscheiben an der umgestülpten Kutikula fixiert und am Ende der Immunfluoreszenzfärbung sauber freipräpariert. Larvale Enddärme, adulte Gehirne und adulte Enddärme wurden direkt sauber freipräpariert. Die zu fixierenden Gewebe wurden in 1,5 ml Reaktionsgefäßen in 900 µl PBL auf Eis gesammelt. Zur Fixierung wurden 300 µl 8 % PFA hinzugegeben und die Reaktionsgefäße 1 h bei RT getaumelt. Anschließend wurde die Flüssigkeit vorsichtig abgenommen und die Gewebe dreimal mit PBX gewaschen, bevor sie dreimal 5 min in Methanol auf dem Taumler inkubiert wurden. Danach wurden die Gewebe bei -20 °C bis zur Immunfluoreszenzfärbung in Methanol gelagert.

### **3.2.30 Präadsorption von primären Antikörpern**

Die Antikörper-Präadsorption ist wichtig, um Antikörper aus der Antikörper-Lösung zu isolieren, die unspezifische Bindungen aufbauen und somit für eine ungewünschte Hintergrundfärbung verantwortlich sind. Hierzu wurden fixierte Embryonen dreimal in PBX gespült und sechsmal 30 min in PBX auf dem Taumler gewaschen. Anschließend wurde 1 ml einer 1:10 Verdünnung des jeweiligen Antikörpers in PBX zugegeben und die Embryonen darin ü. N. bei 4 °C bewegt inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Antikörperlösung in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bei 4 °C gelagert.

### **3.2.31 Immunfluoreszenzfärbungen an *Drosophila*-Embryonen und -Geweben**

Alle Waschschritte der Immunfluoreszenzfärbungen erfolgten in einem Volumen von 1 ml für eine Dauer von 30 min auf dem Taumler. Mit Ausnahme der adulten Gehirne, die jeweils zwei Nächte in der entsprechenden Antikörperlösung inkubiert wurden, wurden alle Gewebe und die Embryonen jeweils eine Nacht in der entsprechenden Antikörperlösung inkubiert. Die Embryonen bzw. Gewebe

wurden dreimal mit PBX gespült und sechsmal mit PBX gewaschen, bevor sie 30 min mit 500 µl Horseserum geblockt wurden. Anschließend wurden sie ü. N. in 500 µl primären Antikörpern (s. Tab. 3.4), die in Horseserum verdünnt wurden, bei 4 °C bewegt inkubiert. Wurden Embryonen einer Co-Färbung mit direkt FITC-gekoppeltem HRP-Antikörper unterzogen, so wurde dieser ebenfalls am ersten Tag der Färbung zur Antikörperlösung hinzugegeben und das Reaktionsgefäß bereits ab diesem Punkt vor Licht geschützt. Am zweiten Färbungstag wurden die Embryonen bzw. Gewebe erneut dreimal mit PBX gespült und sechsmal mit PBX gewaschen, 30 min mit 500 µl Horseserum geblockt und ü. N. lichtgeschützt in 500 µl Fluoreszenz-gekoppelten, sekundären Antikörpern (s. Tab. 3.5), die 1:1000 in Horseserum verdünnt wurden, bei 4 °C bewegt inkubiert. Am dritten Färbungstag wurden sie dreimal mit PBX gespült und sechsmal mit PBX gewaschen, bevor 900 µl des Überstands der Gewebe abgenommen und 900 µl 1x PBS<sub>AK</sub> hinzugegeben wurden. Die Gewebe wurden in dieser Flüssigkeit in ein Blockschälchen überführt, im Falle der L3-Gehirne und Flügel-Imaginalscheiben noch sauber frei präpariert und anschließend in Vectashield gemountet sowie mikroskopisch aufgenommen. Der Überstand der Embryonen wurde komplett abgenommen und je nach Embryonenmenge 50–80 µl Vectashield zugegeben, gemountet und mikroskopisch aufgenommen.

### **3.2.32 *In situ* Hybridisierung an *Drosophila*-Embryonen**

Zur *in situ* Hybridisierung wurden Digoxigenin-markierte DNA-Sonden verwendet. Neben den Embryonen, die zur *in situ* Hybridisierung verwendet wurden, wurde eine weitere Probe mit Embryonen zur Antikörper-Präadsorption anfangs in identischer Weise mitbehandelt. Alle Wasch- und Fixierungsschritte erfolgten in je 1 ml Volumen. Die Embryonen wurden einmal in Methanol und zweimal in 50 % Methanol/50 % (PBT<sub>insitu</sub> + 5 % Formaldehyd)-Lösung gespült und anschließend 20 min in PBT<sub>insitu</sub> + 5 % Formaldehyd auf dem Taumler nachfixiert. Danach folgten drei Waschschrte in PBT<sub>insitu</sub> für jeweils 5 min auf dem Taumler. Anschließend wurden die Embryonen 3 min in 1 ml PBT<sub>insitu</sub> + 50 µg/µl Proteinase K bei 37 °C im Heizblock inkubiert, um die Zellmembranen für die DNA-Sonden passierbar zu machen, wobei die PBT<sub>insitu</sub> + Proteinase K -Lösung bereits auf 37 °C vorgewärmt war. Zum Abstoppen des Proteinase K-Verdau wurden die Embryonen zweimal in PBT<sub>insitu</sub> + 2 mg/ml Glycin gespült. Anschließend folgten zwei fünfminütige Waschschrte in PBT<sub>insitu</sub> auf dem Taumler, bevor die Embryonen erneut für 20 min in PBT<sub>insitu</sub> + 5 % Formaldehyd auf dem Taumler nachfixiert wurden. Nach weiteren 5 min in PBT<sub>insitu</sub> war die Behandlung der Embryonen zur Antikörper-Präadsorption beendet. Pro Hybridisierung wurden 0,5 µl Anti-Digoxigenin-Antikörper (s. Tab. 3.4) in einer Verdünnung von 1:200 in PBT<sub>insitu</sub> zu den vorbehandelten Embryonen gegeben und ü. N. bewegt bei 4 °C inkubiert. Die Embryonen für die *in situ* Hybridisierung wurden zweimal

10 min in einer 50 % PBT<sub>insitu</sub>/50 % HybMix-Lösung und 10 min in HybMix auf dem Taumler bewegt, bevor sie 45 min in 100 µl HybMix bei 48 °C im Wasserbad prähybridisiert wurden. Diese Hybridisierungslösung ermöglicht ein ungehindertes Diffundieren und Binden der DNA-Sonden an die mRNA, weshalb auch die Sonden (1 ng/µl) 1:10 in HybMix verdünnt wurden, was im Folgenden als Sondenmix bezeichnet wird. Der Sondenmix wurde 15 min zu denaturierenden Zwecken bei 95 °C im Becherglas aufgekocht. Die Embryonen wurden anschließend ü. N. mit 100 µl Sondenmix bei 48 °C im Wasserbad hybridisiert. Am nächsten Tag wurden die Embryonen zweimal 2 min in HybMix sowie einmal 20 min in HybMix und viermal 10 min in PBT<sub>insitu</sub> bei 48 °C inkubiert, bevor sie einmal 20 min in PBT<sub>insitu</sub> auf dem Taumler inkubiert wurden. Anschließend wurden sie ü. N. mit dem präadsorbierten Anti-Digoxigenin-Antikörper in einer Endverdünnung von 1:2000 in PBT<sub>insitu</sub> bei 4 °C auf dem Taumler inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurden die Embryonen einmal 5 min und viermal 10 min in PBT<sub>insitu</sub> gewaschen und zweimal 5 min in Färbepuffer<sub>insitu</sub> auf dem Taumler äquilibriert, bevor sie in 1 ml Färbepuffer<sub>insitu</sub> mit 9 µl NBT (50 mg/ml) und 3,5 µl BCIP (50 mg/ml) in ein Blockschälchen überführt wurden. Die Farbentwicklung wurde unter dem Binokular beobachtet. Zum Abstoppen der Farbreaktion wurden die Embryonen zurück ins Reaktionsgefäß gegeben und dreimal in PBT<sub>insitu</sub> und danach in einer aufsteigenden Ethanolreihe von 30 %, 50 %, 70 %, 90 % und 100 % gespült. Anschließend wurden sie in 300 µl Canadabalsam-Gemisch ü. N. stehend bei RT gelagert. Verfärbtes Canadabalsam-Gemisch wurde ausgetauscht und die Embryonen im Canadabalsam-Gemisch gemountet und mikroskopisch aufgenommen.

## *Mikroskopie*

### **3.2.33 Lichtmikroskopie**

Zur Hellfeld-Mikroskopie von Embryonen nach *in situ* Hybridisierungen wurde das Mikroskop BX61 (Olympus) verwendet. Aufnahmen wurden mit der Kamera CC12 und dem Programm CellP (Olympus) angefertigt.

### **3.2.34 Fluoreszenzmikroskopie**

Zur Kontrolle von fluoreszierenden Larven zur Selektion für Kreuzungen oder vor der Präparation sowie zur Aufnahme von fluoreszierenden Larven wurde das Mikroskop SZX12 (Olympus) mit der Kamera CC12 und dem Programm CellP (Olympus) verwendet. Zur Kontrolle von Fluoreszenz nach Immunfluoreszenzfärbungen an Embryonen und Geweben wurde das Mikroskop BX61 (Olympus) verwendet.

### **3.2.35 Konfokale Mikroskopie**

Immunfluoreszenzfärbungen an Embryonen und Geweben sowie Fluoreszenz-Reporterexpressionen wurden mithilfe des Konfokal-Mikroskops SP5 (Leica) und der zugehörigen Software LAS AF aufgenommen. Konfokale Bildaufnahmen wurden mit dem Programm ImageJ bearbeitet.

## 4 Ergebnisse

Das in der 57B-Region lokalisierte Homeoboxgen *orthopedia (otp)* spielt eine essentielle Rolle in der embryonalen Enddarmentwicklung von *Drosophila melanogaster*, wird aber auch im embryonalen Gehirn exprimiert (Hildebrandt *et al.*, 2020). Es sind neun Transkripte bekannt, die sich anhand ihrer Länge und Exonbeschaffenheit (Flybase FB2022\_04, Thurmond *et al.*, 2019) in zwei Transkriptklassen einordnen lassen, die im Embryo gewebespezifisch exprimiert werden. Der Fokus dieser Arbeit liegt auf der Beschreibung der Otp-Expression im embryonalen, larvalen und adulten Gehirn, auf der Untersuchung der Expression der beiden Transkriptvarianten otp-RE und otp-RC im Larval- und Adultstadium und auf der Überprüfung der Interaktion der microRNA miR-252 mit *otp*. Einen weiteren Punkt bildet die molekulare Verifizierung der beiden EMS-induzierten Punktmutationsstämme otp<sup>1024</sup> und otp<sup>13064</sup> mittels Sequenzierung. Des Weiteren besteht ein Ziel dieser Arbeit in der Vervollständigung von Expressions- und Regulationsanalysen der neuronalen Transkriptionsfaktoren *Drosophila* Retinal Homeobox (DRx), Homeobrain (Hbn) und Earmuff (Erm) durch die Herstellung spezifischer Gal4-Stämme und die Untersuchung von Enhancer-Deletionsstämmen.

### 4.1 Untersuchung der Expression des Homeoboxgens *orthopedia (otp)*

Es sind neun verschiedene Transkripte von *otp* bekannt, die mithilfe von cDNA-Analysen ermittelt werden konnten (Flybase FB2022\_04, Thurmond *et al.*, 2019). Diese lassen sich anhand ihrer Expressionsdaten in zwei verschiedene Varianten-Klassen einteilen, wobei die fünf Transkriptvarianten otp-RE, otp-RI, otp-RJ, otp-RK und otp-RL die Exons 1 und 2 besitzen, woraufhin zu Exon 4 gespliced wird, während die vier Transkriptvarianten otp-RC, otp-RF, otp-RG und otp-RH mit Exon 3 beginnen und zu Exon 4 gespliced werden. Der Translationsstart der fünf längeren Transkriptvarianten liegt in Exon 2, der der vier kürzeren Transkriptvarianten in Exon 4. Die beiden Varianten-Klassen unterscheiden sich demnach in der Transkriptlänge und Exon-Verwendung, aber auch im frühesten Zeitpunkt ihrer Expression. Während die vier 2,3 kb langen Transkriptvarianten bereits in 3 bis 6 Stunden alten Embryonen detektiert werden können, sind die fünf 2,9 kb langen Transkriptvarianten erst in 9 bis 12 Stunden alten Embryonen nachweisbar. Anschließend wird die Expression beider Varianten-Klassen über alle folgenden Entwicklungsstadien aufrechterhalten (Flybase FB2022\_04, Thurmond *et al.*, 2019). Während die Otp-Expression im Enddarm bis ins Adultstadium beschrieben ist, wurde in Bezug auf das Nervensystem bisher nur die Otp-Expression im embryonalen Gehirn in verschiedenen Zellclustern gezeigt (Hildebrandt *et al.*, 2020).

#### 4.1.1 Analyse der wildtypischen Otp-Expression im embryonalen, larvalen und adulten Gehirn

Im embryonalen *Drosophila*-Gehirn ist die Otp-Expression in drei Expressions-Domänen zu beobachten (Abb. 4.1 A), wobei zwei Domänen, bestehend aus zehn (P1) bzw. drei (P2) Otp-positiven Neuronen, im Protocerebrum und eine Domäne aus fünf Neuronen (D1) im Deutocerebrum lokalisiert sind (Hildebrandt *et al.*, 2020). Zur genaueren Untersuchung wurde eine Immunfluoreszenzfärbung (s. 3.2.31) mit Anti-Otp und Anti-HRP, was Glykoproteine des Insekten-Nervensystems spezifisch bindet und somit als Strukturmarker bei Färbungen verwendet werden kann, auf wildtypische Embryonen angefertigt. Neben den drei beschriebenen Otp-positiven Zell-Domänen zeigen sich drei Zellen im dorsomedialen Bereich gefärbt (Abb. 4.1 A, weißer Pfeil) sowie mehrere Zellen im suboesophagealen Bereich (Abb. 4.1 A, grauer Pfeil). Die Otp-Färbung beginnt aus dorsaler Richtung auf Höhe der präoralen Kommissur (Abb. 4.1 B) und zeigt in Domäne P1 das Lineage-Cluster DPL1–3 (laterale dorso-posteriore Lineages, laterale Subgruppen 1–3), in Domäne P2 die Lineage DPLc4 (laterale dorso-posteriore Lineages, zentrale Subgruppe 4) und in Domäne D1 die Lineage BAMv3 (baso-anteriore Lineages, ventro-mediale Subgruppe 3) sowie vermutlich ventral benachbart auch das Lineage-Cluster BALc (baso-anteriore Lineages, caudo-laterale Subgruppe) als Otp-positiv. Eine weitere Otp-Expressionsdomäne ist in der dorsomedialen Gehirnregion zu sehen, aus der die dorsomedialen (DM) Lineages entspringen (in Abb. 4.1 A mit dem weißen Pfeil gekennzeichnet). Im ventralen Bereich der Hemisphären (Abb. 4.1 C) sind nach wie vor die Lineages DPL1–3 und BAMv3 Otp-positiv und außerdem in Domäne P2 das Lineage-Cluster BLAd (anteriore, baso-laterale Lineages, dorsale Subgruppen). Im Übergang von Zentralgehirn und suboesophagealem Ganglion (SOG) (Abb. 4.1 D) zeigen sich die Lineages BALp4 (baso-anteriore Lineages, postero-laterale Subgruppe 4) und Zellen der mandibularen suboesophagealen anterioren Domäne 1 (MD SA1, in Abb. 4.1 A mit dem grauen Pfeil gekennzeichnet) als Otp-positiv.

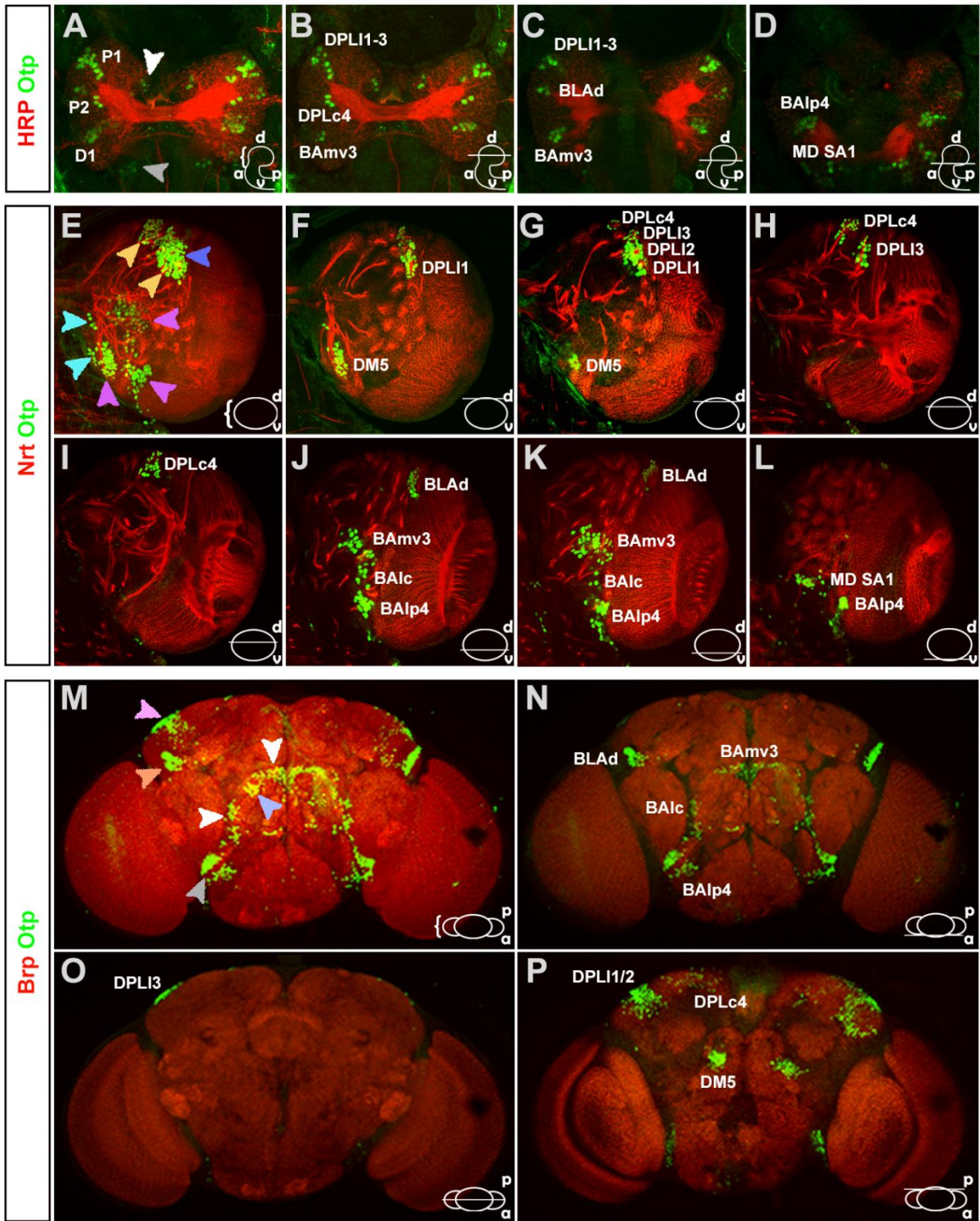
Um die Otp-Expression auch in weiteren Entwicklungsstadien des Gehirns zu analysieren, wurden Immunfluoreszenzfärbungen (s. 3.2.31) auf wildtypische larvale Gehirne des Larvalstadiums L3 sowie auf adulte Gehirne des Wildtyp-Stammes durchgeführt. Zur strukturellen Einordnung wurden die larvalen Gehirne außerdem mit einem Marker für sekundäre Neuronen, Anti-Neurotactin (Nrt), co-gefärbt und die adulten Gehirne mit Anti-Bruchpilot (Brp), was das Neuropil und somit die Kompartimente des Gehirns markiert. Die Otp-Expression in der larvalen Hemisphäre wurde zunächst grob lokalisiert (Abb. 4.1 E), wobei vier Otp-exprimierende Bereiche eingegrenzt werden konnten. In den dorsalen Ebenen handelt es sich um ein Muster, das sich benachbart zur Neuraxis befindet (Abb. 4.1 E, türkise Pfeile), sowie ein anteriores Muster in verschiedenen Lineages, das lateral zum *Mushroom Body* (MB) zu lokalisieren ist (Abb. 4.1 E, gelbe Pfeile). Im Gesamt-Otp-Expressionsmuster

zum Großteil überdeckt befindet sich hier auch ein kleineres ventrales Muster, das direkt benachbart zur optischen Lobe (OL) liegt (Abb. 4.1 A, blauer Pfeil). Ein größerer Otp-Expressionsbereich befindet sich außerdem ventral-lateral im Bereich des SOG und Deutocerebrum (Abb. 4.1 E, lila Pfeile). Aufgrund der Verteilung des Musters und im Vergleich mit der Nrt-Expression scheint es sich vor allem um sekundäre Neurone zu handeln, was durch weitere Untersuchungen bestätigt werden konnte (Bruno Bello, persönliche Mitteilung, unveröffentlichte Daten). Dennoch scheinen vereinzelt auch primäre Neurone, die bereits im Embryo gebildet wurden, im larvalen Gehirn Otp-positiv zu sein (Volker Hartenstein, persönliche Mitteilung).

Mithilfe der Nrt-Immunfluoreszenzfärbung konnten die beschriebenen Otp-Expressionsmuster anschließend auch bestimmten Lineages zugeordnet werden, die zum Großteil bereits im Embryo Otp-positive Zellen aufwiesen. Im dorsalen Bereich der Hemisphäre zeigen sich anterior zunächst Zellen der Lineage DPL1 Otp-positiv und entlang der Neuraxis ist die dorsomediale Lineage 5 (DM5) angefärbt (Abb. 4.1 F). In weiteren, in Richtung ventral gelegenen Querschnitten der larvalen Hemisphäre erscheinen anschließend im anterioren Bereich Otp-positive Zellen der Lineages DPL2, DPL3 und DPLc4 (Abb. 4.1 G–I). Weiter ventral gelegen sind im anterioren Bereich benachbart zur OL Zellen der dorsalen Subgruppe der anterioren BLAd-Lineages in grüner Färbung zu finden und das größerflächige, ventral-laterale Otp-Muster im Bereich des SOGs und Deutocerebrums (Abb. 4.1 J–K). Hierbei handelt es sich um Zellen der Lineages BA1p4, BA1c und BAMv3, außerdem wahrscheinlich auch um primäre Neuronen der Lineages BAMv1–3. Im ventralen Bereich der Hemisphäre sind zudem bereits zum SOG gehörende Otp-positive Zellen der MD SA1 zu sehen (Abb. 4.1 L).

Auch im adulten Gehirn wurde die Verteilung der Otp-positiven Zellen zunächst mithilfe der Brp-Immunfluoreszenzfärbung, durch die die Kompartimente des Gehirns sichtbar werden, in grobe Expressionsbereiche eingeteilt (Abb. 4.1 M). Es handelt sich um drei anteriore Muster, wovon eines die antennale Lobe (AL) umgibt (Abb. 4.1 M, weiße Pfeile), eines sich zwischen SOG und VLP (ventro-laterales Protocerebrum) befindet (Abb. 4.1 M, grauer Pfeil) und eines im Bereich des lateralen Horns (LH) liegt (Abb. 4.1 M, orangefarbener Pfeil). Posterior ist ein Otp-Expressionsmuster im Bereich LH, SLP (laterales *superior* Protocerebrum) und SMP (mediales *superior* Protocerebrum) zu sehen (Abb. 4.1 M, rosa Pfeil), eine mediale Färbung (Abb. 4.1 M, hellblauer Pfeil) sowie eine Färbung zwischen SOG und OL, die durch die anteriore Färbung überdeckt wird (Abb. 4.1 M, grauer Pfeil). Diese Färbungs-Muster konnten unter Zuhilfenahme des Virtual Fly Brain Atlases (Milyaev *et al.*, 2012; Ito *et al.*, 2013; Yu *et al.*, 2013; Bates *et al.*, 2020) verschiedenen Lineages zugeordnet werden, die zum Großteil bereits in der Larve Otp-positiv vorlagen.





**Abbildung 4.1:** Untersuchung der wildtypischen Otp-Expression im embryonalen Gehirn, in der larvalen Gehirnhemisphäre und im adulten Gehirn von *Drosophila melanogaster* mittels Immunfluoreszenzfärbung. Otp-exprimierende Lineages sind in Weiß beschriftet: BALc, baso-anteriore Lineages (caudo-laterale Subgruppe); BAIp, baso-anteriore Lineages (postero-laterale Subgruppe); BAmv, baso-anteriore Lineages (ventro-mediale Subgruppe); BLAd, anteriore baso-laterale Lineages (dorsale Subgruppe); DM, dorsomediale Lineage; DPLc, laterale dorso-posteriore Lineages (zentrale Subgruppe); DPLI, laterale dorso-posteriore Lineages (laterale Subgruppe); MD SA, mandibulare suboesophageale anteriore Domäne. Die Position des jeweiligen Querschnitts durch die Gehirne bzw. Hemisphäre ist in jedem Abbildungsteil grafisch dargestellt. (A–D) Embryonales Gehirn in Dorsalansicht, anterior ist unten, Embryonalstadium 16, mit Otp-Immunfluoreszenzfärbung in Grün und HRP-Immunfluoreszenzfärbung in Rot. (A) Gesamt-Expressionsmuster von Otp. Die bereits benannten Expressionsdomänen P1 und P2 im Protocerebrum sowie D1 im Deutocerebrum sind beschriftet, Pfeile zeigen auf zwei weitere Expressionsbereiche in der dorsomedialen Region (weiß) und im Übergang zum SOG (grau). (B–D) Querschnitte durch das Gehirn, die die Otp-Expression zeigen, von dorsal (B) nach ventral (D). (E–L) Larvale Hemisphäre in

Dorsalansicht mit Otp-Immunfluoreszenzfärbung in Grün und Neurotactin (Nrt)-Immunfluoreszenzfärbung in Rot, anterior ist oben. **(E)** Gesamt-Expressionsmuster von Otp. Pfeile zeigen auf die unterschiedlichen Expressionsbereiche. Türkis, Muster dorsal an der Neuraxis; Gelb, Muster in verschiedenen Lineages lateral zum *Mushroom Body* (MB); Blau, Muster ventral neben den optischen Loben (OL); Lila, Muster ventral-lateral im Bereich Suboesophageales Ganglion (SOG)/Deutocerebrum. **(F–L)** Einzelne Querschnitte durch die Hemisphäre, die Otp-Expressionsmuster zeigen, von dorsal **(F)** nach ventral **(L)**. **(M–P)** Adultes Gehirn in anteriorer Ansicht mit Otp-Immunfluoreszenzfärbung in Grün und Bruchpilot (Brp)-Immunfluoreszenzfärbung in Rot, dorsal ist oben. **(M)** Gesamt-Expressionsmuster von Otp. Pfeile zeigen auf die unterschiedlichen Expressionsbereiche. Weiß, Muster anterior die antennalen Loben (AL) umgebend; Grau, Muster anterior zwischen SOG und ventro-lateralem Protocerebrum (VLP); Orange, Muster anterior in der Region des lateralen Horns (LH); Rosa, Muster posterior im Bereich des LH, lateralen *superior* Protocerebrums (SLP) und medialen *superior* Protocerebrums (SMP); Hellblau, Muster posterior medial. **(N–P)** Einzelne Längsschnitte durch das adulte Gehirn, die Otp-Expressionsmuster zeigen, von anterior **(N)** nach posterior **(P)**.

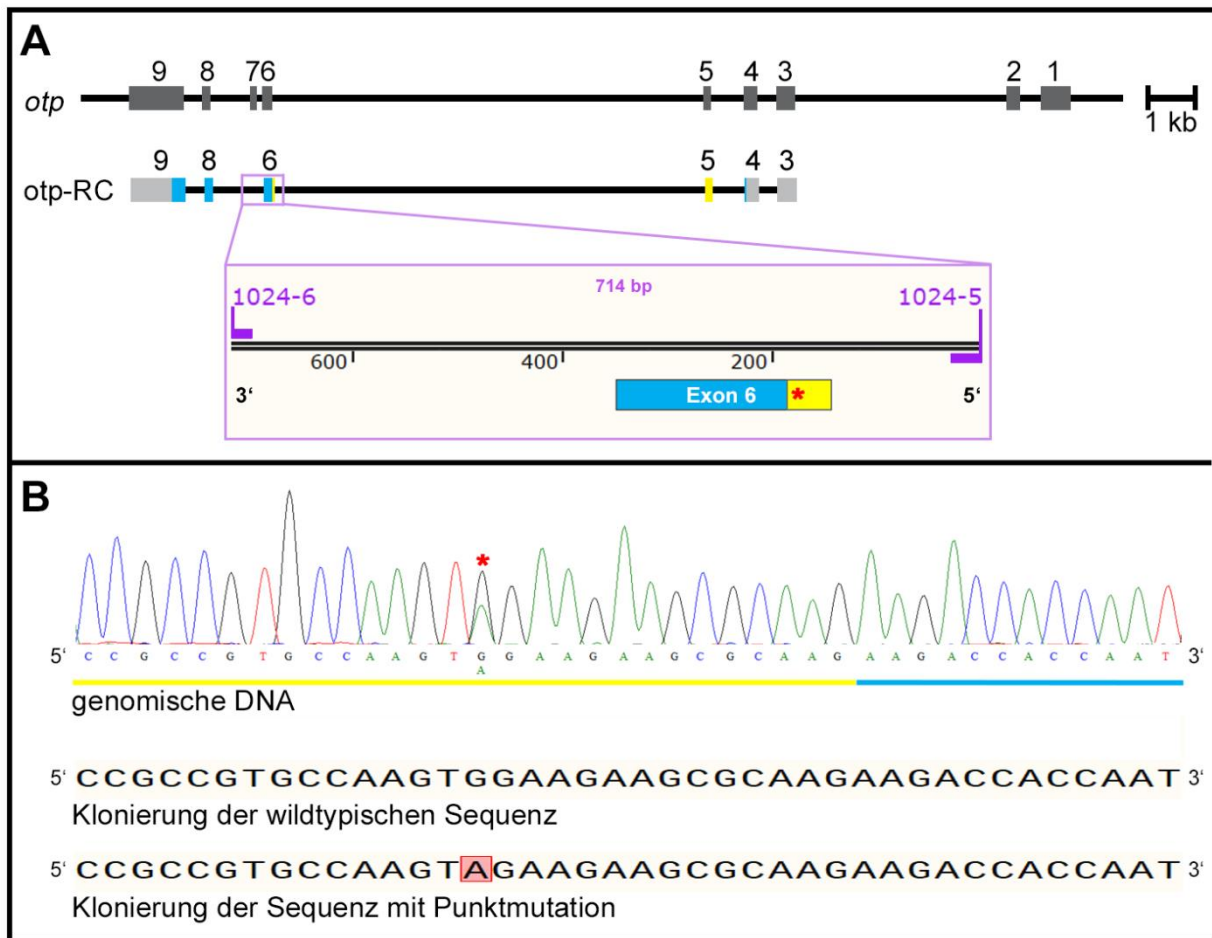
So handelt es sich bei dem anterioren Expressionsmuster, das die AL umgibt, im medialen Bereich um Zellen der Lineage BAMv3 und im lateralen Bereich um Zellen der Lineage BALc (Abb. 4.1 N). Zwischen SOG und VLP zeigen sich Zellen der Lineage BALp4 Otp-positiv und im Bereich des LH sind Zellen der Lineage BLAd grün gefärbt (Abb. 4.1 N). Im zentralen Längsschnitt des adulten Gehirns erscheint im dorsalen Bereich die Otp-positive Lineage DPLI3 (Abb. 4.1 O). Im posterioren Bereich des Gehirns ist dorsal die Otp-Expression in den Lineages DPLI1 und DPLI2 sowie DPLc4 zu sehen und medial in der Lineage DM5 (Abb. 4.1 P). Alle im adulten Gehirn gefärbten Lineages waren bereits im larvalen Gehirn Otp-positiv, was Otp zu einem recht stabilen Marker für diese Lineages macht.

#### 4.1.2 Überprüfung verschiedener *otp*-Mutanten

Bevor die Untersuchungen der unterschiedlichen Transkriptvarianten von *otp* und der Interaktion von miR-252 mit *otp* durchgeführt wurden, wurden die drei homozygot letalen *otp*-Mutantenstämme  $otp^{GT}$ ,  $otp^{1024}$  und  $otp^{13064}$  analysiert. Bei  $otp^{GT}$  handelt es sich um einen *Genetargeting* (GT)-Stamm, bei dem der Translationsstart des kürzeren Transkripts und ein großer Teil der Homeodomäne (gelb) deletiert wurden (rot) (Abb. 4.3 A) und der in einer vorherigen Arbeit hergestellt wurde (Bach, 2011). In dieser vorhergehenden Arbeit wurden ebenfalls die beiden mittels EMS erzeugten Punkt-Mutationsstämme  $otp^{1024}$  und  $otp^{13064}$  durch Immunfluoreszenzfärbungen und Defizienzkreuzungen als *otp*-Mutanten verifiziert (Bach, 2011).

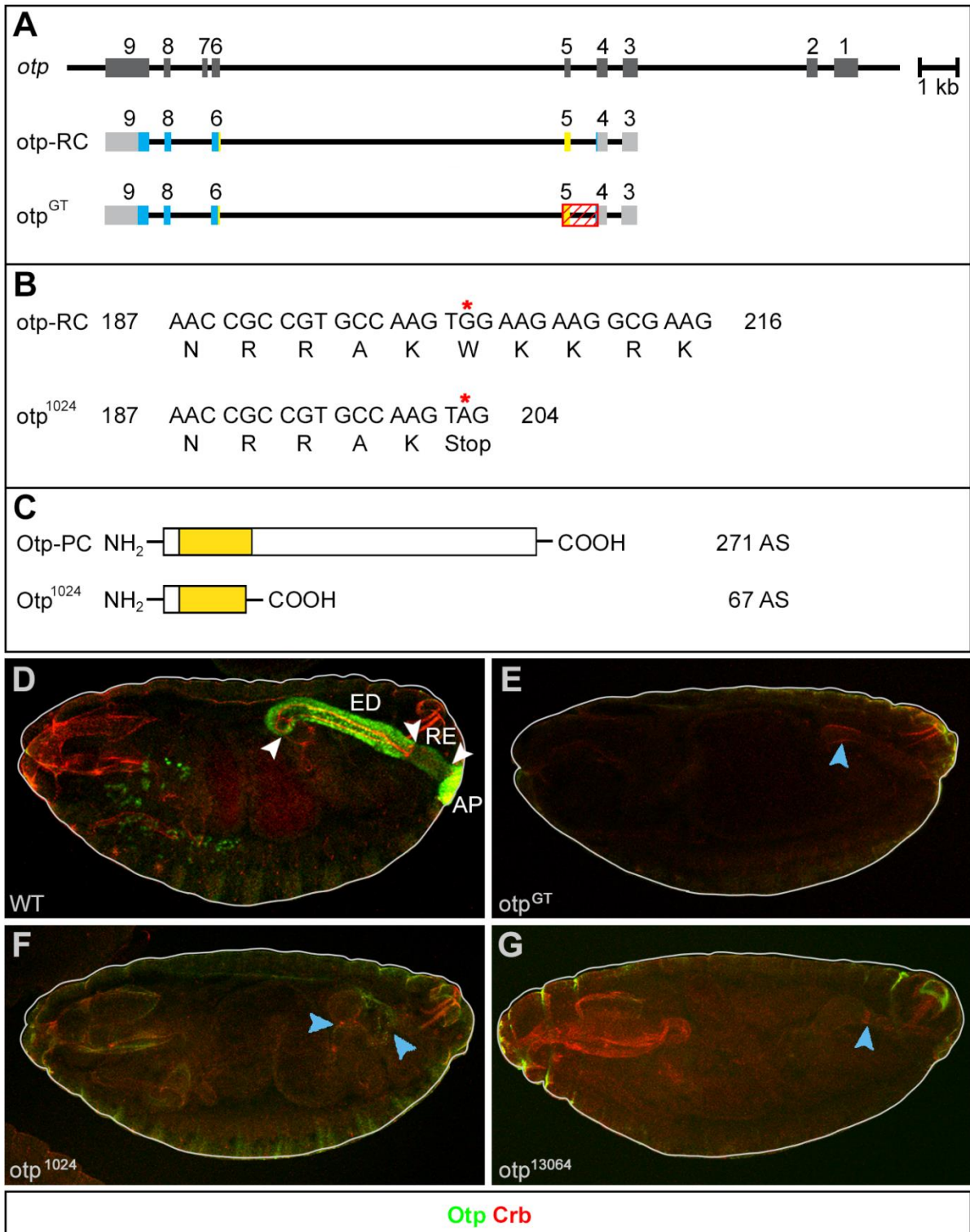
Diese Annahme sollte nun durch Sequenzierung auf genomischer Ebene bestätigt werden (Abb. 4.2). Hierzu wurde genomische DNA der beiden Stämme präpariert (s. 3.2.1), alle translatierten Bereiche inklusive *Splicesites* amplifiziert (s. 3.2.3), die PCR-Produkte aufgereinigt und zur Sequenzierung an die Firma StarSeq (Mainz) geschickt. Da es sich um homozygot letale Stämme handelt, wurde zunächst die heterozygote genomische DNA sequenziert, wobei zu erwarten war, dass Mutationen sich in Sequenzierungskurven-Überlagerungen ausprägen. Exons, die in dieser Sequenzierung eine solche Kurven-Überlagerung zeigten, wurden anschließend mittels TA-Klonierung in den pCR® 2.1 TOPO® Vektor kloniert (s. 3.2.17), woraufhin zehn Klone erneut zur Sequenzierung an die Firma StarSeq (Mainz) geschickt wurden. Durch Anwendung dieser Methode konnten Klone, die den

mutierten Strang tragen, von Klonen mit wildtypischer Sequenz unterschieden und ohne Überlagerungen sequenziert werden (Abb. 4.2 B).



**Abbildung 4.2: Sequenzierungsergebnis des EMS-induzierten Mutationsstammes *otp*<sup>1024</sup>.** (A) Genomische Region von *otp* sowie die Transkriptvariante *otp-RC*. Exons sind als Kästchen dargestellt, translatierte Bereiche in Blau und die Homeobox in Gelb. Die Lage der verwendeten Primer 1024-5 und 1024-6 ist gezeigt sowie die Länge des resultierenden PCR-Produkts (714 bp) und die Lage von Exon 6, das das 3'-Ende der Homeobox beinhaltet (gelb). Die Stelle der Punktmutation ist mit einem roten Stern markiert. (B) Sequenzierungsergebnis der betroffenen Stelle aus genomischer DNA in 5'-3'-Richtung mit Markierung des Homeobox-3'-Endes (gelb), des anschließenden Fortlaufs von Exon 6 (blau) und der Punktmutation (roter Stern) von G zu A. Darunter die Sequenzen der entsprechenden Stelle aus Sequenzierungen nach Klonierung des PCR-Produkts in den pCR® 2.1 TOPO® Vektor. Die Punktmutation ist rot unterlegt.

Das Ergebnis der Sequenzierung des Stammes *otp*<sup>1024</sup> zeigt eine Punktmutation an Stelle 203 der cDNA von *otp-RC*, durch die statt des wildtypischen Guanin (G) ein Adenin (A) auftritt, was durch den roten Stern gekennzeichnet ist (Abb. 4.2 B und 4.3 B). Diese Punktmutation resultiert in einem Stoppcodon in der mRNA-Sequenz und dadurch in einem Abbruch der Proteinexpression an dieser Stelle. Das entstehende stark verkürzte Protein, das aus nur 67 Aminosäuren besteht und somit 204 Aminosäuren kürzer ist als das wildtypische Otp-PC-Protein, zeigt, dass die Punktmutation noch innerhalb der Homeodomäne (gelb) liegt (Abb. 4.2 und 4.3 C). Hierbei befindet sich die betroffene Aminosäure im C-terminalen Bereich der dritten Helix (Jumper et al., 2021; Varadi et al., 2022; Flybase FB2022\_04).



**Abbildung 4.3: Phänotypische und molekulare Analyse verschiedener *otp*-Mutantenstämme mittels Immunfluoreszenzfärbung und Sequenzierung.** (A) Genomische Region von *otp* und das Transkript *otp*-RC sowie ein Transkript, in dem die durch *Genetargeting* erzeugte Deletion (rot) des Stammes *otp*<sup>GT</sup> gezeigt ist. Exons sind als Kästchen dargestellt, in Blau sind translatierte Bereiche zu sehen und in Gelb die Region der Homeodomäne. (B) Nukleotid- und Aminosäuresequenzen des Mutantenstammes *otp*<sup>1024</sup> nach Sequenzierung im Vergleich zu wildtypischen Sequenzen (*otp*-RC). Die Punktmutation, die im Stamm *otp*<sup>1024</sup> zu einem Stopp-Codon führt, ist mit Pfeilen markiert. (C) Schema des mutanten Proteins *otp*<sup>1024</sup> im Vergleich zu dem wildtypischen Protein Otp-PC. In Gelb ist die Homeodomäne gezeigt. (D–G) Embryonen in Embryonalstadium 14 und Lateralansicht. Anterior ist links. Zur besseren Orientierung wurden die Embryonen umrandet. Die Anti-Otp-Immunfluoreszenzfärbung ist in Grün dargestellt, die Anti-Crubs (Crb)-Immunfluoreszenzfärbung in Rot. Gezeigt sind ein wildtypischer Embryo (D) sowie je ein homozygoter Embryo der Stämme *otp*<sup>GT</sup> (E), *otp*<sup>1024</sup> (F) und *otp*<sup>13064</sup> (G). Weiße Pfeile zeigen auf die Grenzen der verschiedenen Enddarm-Strukturen. AP, Analplatten; ED, Enddarm; RE, Rektum. Blaue Pfeile deuten auf Enddarm-Reste hin.

Für  $otp^{13064}$  konnte mittels Sequenzierung weder im codierenden Bereich der Sequenz noch innerhalb der *Splicesites* eine Punktmutation gefunden werden.

Zur phänotypischen Analyse wurden Embryonen einer Co-Immunfluoreszenzfärbung (s. 3.2.31) mit Anti-Otp in Grün und Anti-Crumbs (Crb) in Rot unterzogen. Crb markiert die apikale Oberfläche von Epithelien ektodermalen Ursprungs und macht dadurch unter anderem den Enddarm sichtbar. Alle *otp*-Mutantenstämme stellen sich als embryonal letal dar. Die wildtypische Otp-Färbung markiert die Otp-Expression im Gehirn und im anterioren Bereich des ventralen Nervensystems sowie im Enddarm (ED), im Rektum (RE) und den Analplatten (AP) (Abb. 4.3 D). Die Grenzen der verschiedenen Bereiche sind mit weißen Pfeilen markiert. Im Gegensatz dazu weisen die homozygoten Embryonen der Stämme  $otp^{GT}$  (Abb. 4.3 E),  $otp^{1024}$  (Abb. 4.3 F) und  $otp^{13064}$  (Abb. 4.3 G) weder im Nervensystem noch im Darm eine Otp-Expression auf und gleichen sich phänotypisch. Lediglich eine stark veränderte Crb-Expression zeigt hier einen deutlich verkürzten und morphologisch veränderten Enddarm, was durch die blauen Pfeile markiert wird. Trotz der wildtypischen Sequenzierung des codierenden Bereichs von  $otp^{13064}$  deuten die Co-Färbung sowie die Ergebnisse von Bach, 2011, darauf hin, dass es sich dennoch auch um eine *otp*-Mutante handelt.

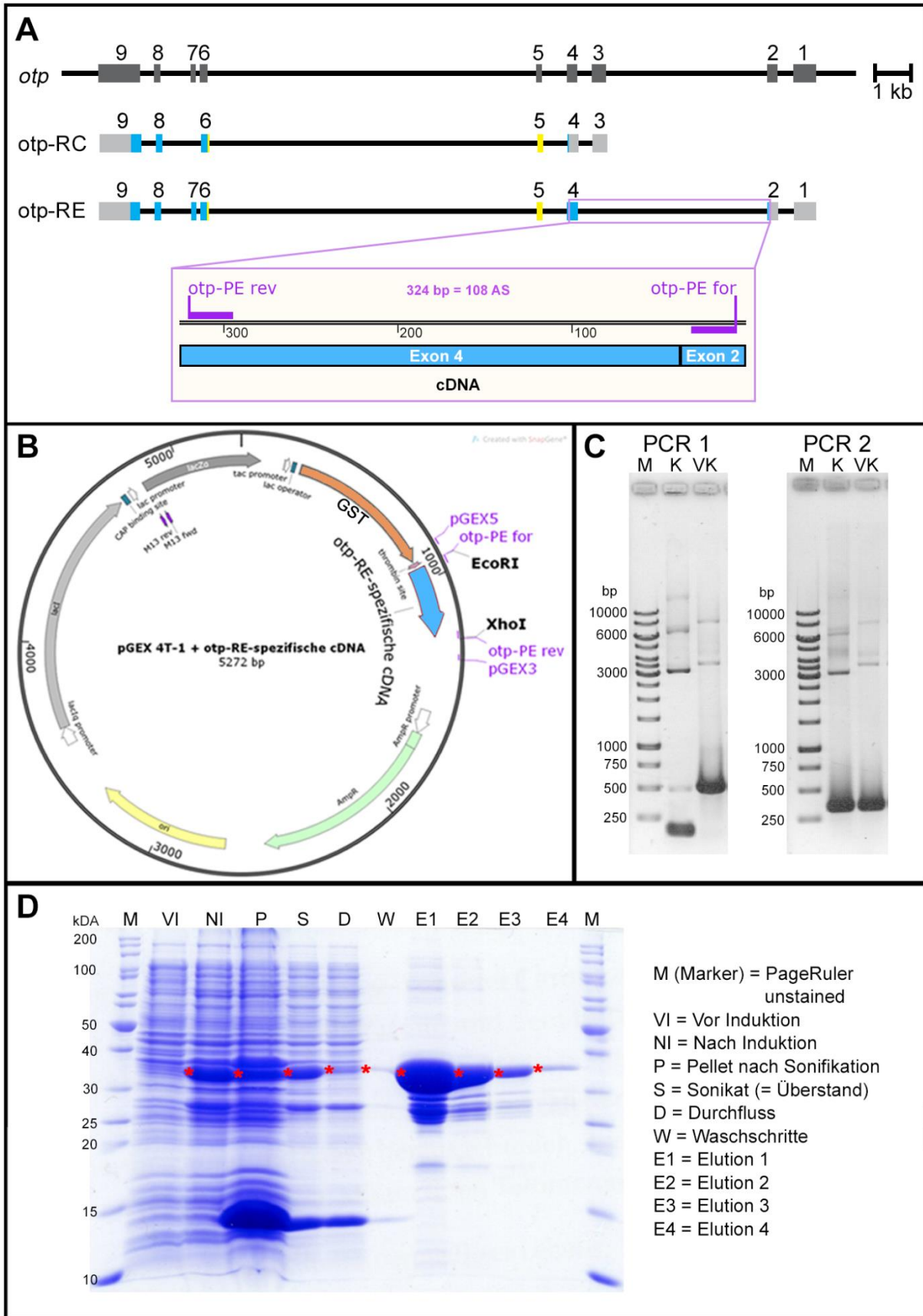
#### **4.1.3 Untersuchung der Transkriptvarianten von *otp***

Grundlage der Untersuchungen in dieser Arbeit bildeten die beiden cDNA-Klone cW26/1 und cW26/2, die den beiden Transkriptvarianten *otp*-RC (cW26/1) und *otp*-RE (cW26/2) entsprechen. Es konnte bereits gezeigt werden, dass *otp*-RE ausschließlich im Nervensystem und *otp*-RC ausschließlich im Enddarm und den Analplatten des *Drosophila*-Embryos, also ortsspezifisch, exprimiert wird (Hildebrandt *et al.*, 2020). Da die kürzere Transkriptvariante *otp*-RC in einer anderen Arbeit bereits Gegenstand genauerer Untersuchungen war (Bach, 2011), liegt der Fokus in dieser Arbeit vor allem auf der längeren Transkriptvariante *otp*-RE und daraus resultierend auf der Frage, ob die Transkriptvarianten von *otp* auch im Larval- und Adultstadium weiterhin gewebespezifisch exprimiert werden.

Um die embryonale Expression des Transkripts *otp*-RE auf Proteinebene genauer zu untersuchen und die innerhalb der *in situ* Hybridisierung beobachtete ortsspezifische Expression von *otp*-RE im Embryo (Hildebrandt *et al.*, 2020) zu verifizieren, wurde zunächst ein für das Protein Otp-PE spezifischer Antikörper hergestellt. Hierzu erfolgte eine Klonierung des für *otp*-RE spezifischen cDNA-Teils in den Vektor pGEX4T-1, um ein Glutathion-S-Transferase (GST)-Fusionsprotein erhalten zu können (s. 3.2.19). Zunächst wurde der für *otp*-RE spezifische cDNA-Teil mithilfe der Primer *otp*-PE for und *otp*-PE rev amplifiziert (s. 3.2.3), deren Lage auf dem für *otp*-RE spezifischen cDNA-Teil

vergrößert in Lila gezeigt ist (Abb. 4.4 A). Es handelt sich um einen Bereich von 324 bp, aus denen 108 Aminosäuren (AS) resultieren, und der sich vom Translationsstart von otp-RE in Exon 2 bis zum Translationsstart von otp-RC in Exon 4 erstreckt, wobei Exon 3 übersprungen wird. Die Klonierung in den Expressionsvektor pGEX4T-1 (s. 3.2.19) erfolgte über die an die Primer angefügten Restriktionsschnittstellen für die Restriktionsenzyme *EcoRI* und *XhoI* in Leserichtung und im Leseraster mit der GST-Sequenz (Abb. 4.4 B). Die *Multiple Cloning Site* (MCS), in die die otp-RE-spezifische cDNA (rot) kloniert wurde, liegt direkt hinter der GST-Sequenz (orange), sodass ein GST-Insert-Fusionsprotein entsteht. Hierzu beinhaltet der Vektor außerdem ein lac-Operon (grau), das die Induktion der Proteinexpression mithilfe des Lactose-Analogons IPTG ermöglicht. Der Klonierungserfolg wurde mittels PCR überprüft (Abb. 4.4 C), wobei eine PCR mit den vektorspezifischen Primern pGEX3 und pGEX5 (PCR 1) und eine PCR mit den Primern otp-PE for und otp-PE rev (PCR 2), die auch zur Herstellung des Inserts verwendet wurden, durchgeführt wurde (s. 3.2.3). Als Negativkontrolle (K) für PCR 1 diente der Leervektor pGEX4T-1, und zur Positivkontrolle (K) von PCR 2 wurde der die otp-cDNA enthaltende Klon cW26/2, der auch zur Herstellung des Inserts hinzugezogen wurde, verwendet. Beide PCRs waren erfolgreich und zeigen in der jeweiligen Vektorkonstrukt-Spur (VK) das gewünschte Fragment mit einer Größe von 476 bp (PCR 1) bzw. 324 bp (PCR 2).

Das erfolgreich klonierte Vektorkonstrukt wurde anschließend in BL21-Zellen transformiert, und das GST-Otp-PE<sub>spez.</sub>-Fusionsprotein wurde exprimiert und aufgereinigt (s. 3.2.19). In einer anschließenden SDS-Gelelektrophorese (s. 3.2.20) erfolgte die Überprüfung der Expression und Aufreinigung von GST-Otp-PE<sub>spez.</sub> (Abb. 4.4 D). Auf dem SDS-Gel aufgetragen sind Proben, die während verschiedener Schritte der Proteinexpression und -aufreinigung genommen wurden. Die GST-Otp-PE<sub>spez.</sub>-enthaltenden Banden sind mit einem roten Stern markiert. Das Fusionsprotein hat ein ungefähres Molekulargewicht von 38 kDa, das sich aus etwa 25,5 kDa GST-Tag und etwa 12,5 kDa Otp-PE<sub>spez.</sub> zusammensetzt. Der Vergleich der beiden ersten Spuren zeigt, dass nach der Induktion (NI) eine deutliche starke Bande im Bereich zwischen 30 und 40 kDa auf dem Gel erscheint, wobei es sich um das GST-Fusionsprotein handelt. Diese Bande ist auch im Pellet (P) nach dem Zellaufschluss und ebenso im Sonikat (S) zu finden, das den Überstand des Pellets darstellt. Das Sonikat wurde zur Proteinaufreinigung eingesetzt und auf die Matrix gegeben. Dass der Großteil von GST-Otp-PE<sub>spez.</sub> an die Matrix gebunden vorlag, ist an der Durchfluss-Probe (D), die nach der Säulenbindung genommen wurde, zu erkennen, da hier nur wenig GST-Otp-PE<sub>spez.</sub> vorliegt. In einer Probe der Waschschrte (W) ist das GST-Fusionsprotein ebenfalls nur schwach vorhanden.



**Abbildung 4.4: Überprüfung der Klonierung und Proteinexpression zur Herstellung des otp-RE-spezifischen Antikörpers Otp-PE. (A)** Genomische Region von *otp* sowie die beiden Transkriptvarianten *otp-RC* und *otp-RE*. Kästchen deuten auf Exons hin, in Blau sind translatierte Bereiche markiert, in Gelb die Homeodomäne. Außerdem ist die Lage der Primer zur Herstellung des Klonierungsinserats in der *otp-RE*-cDNA gezeigt. **(B)** Vektorkarte des Vektors pGEX4T-1 mit der *otp-RE*-spezifischen cDNA als Insert (blau). Die zur Klonierung verwendeten Restriktionsenzym-Schnittstellen für *EcoRI* und *XhoI*

sind gezeigt sowie die verschiedenen Primer-Bindestellen zur PCR-Überprüfung des klonierten Konstrukts. Die Vektorkarte wurde mit dem Programm SnapGene erstellt. (C) Gelelektrophoretische Auftrennung von PCR-Produkten zweier unterschiedlicher PCRs zur molekularen Überprüfung des klonierten Vektorkonstrukts. Als Marker (M) wurde der ‚GeneRuler™ 1kb DNA Ladder‘ (ThermoFisher Scientific) verwendet. PCR 1 = Primerpaar pGEX3 und pGEX5; K = Kontrolle (pGEX4T-1, erwartete Fragmentgröße: 152 bp); VK = Vektorkonstrukt (pGEX4T-1 mit otp-RE-spezifischer cDNA, erwartete Fragmentgröße: 476 bp); PCR 2 = Primerpaar otp-PE for und otp-PE rev; K = Kontrolle (cW26/2, erwartete Fragmentgröße: 324 bp), VK = Vektorkonstrukt (pGEX4T-1 mit otp-RE-spezifischer cDNA, erwartete Fragmentgröße: 324 bp). (D) Auftrennung verschiedener Proben, die während der Expression und Aufreinigung des GST-Fusionsproteins GST-Otp-PE<sub>spez.</sub> genommen wurden, mittels SDS-PAGE. Als Marker wurde der ‚PageRuler™ Unstained Protein Ladder‘ der Firma ThermoFisher Scientific verwendet. Der rote Stern markiert jeweils die GST-Otp-PE<sub>spez.</sub>-enthaltende Bande. Molekulargewicht von GST-Otp-PE<sub>spez.</sub>: ~38 kDa.

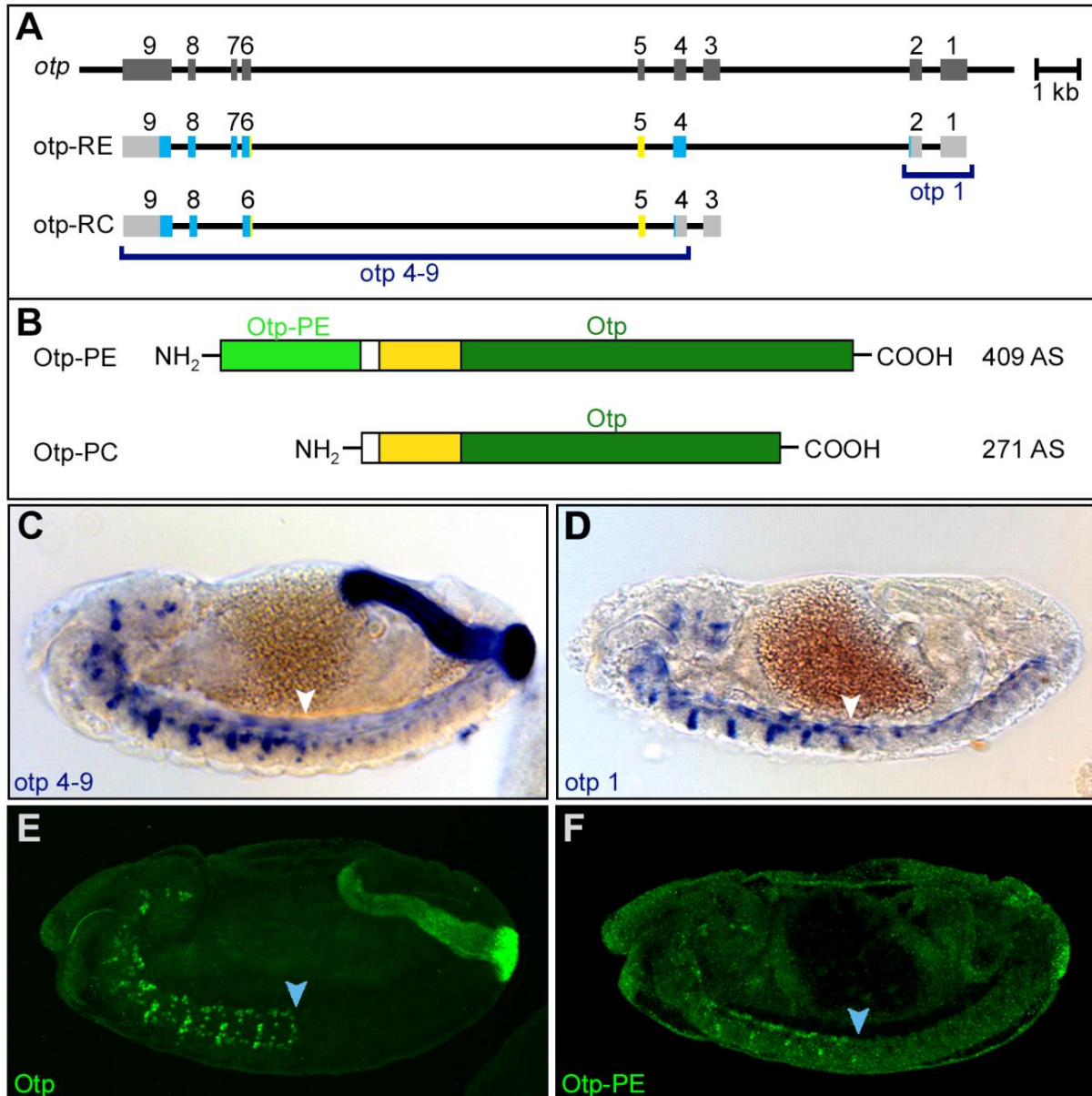
Anschließend sind Proben der vier Elutionsfraktionen aufgetragen, wobei sich GST-Otp-PE<sub>spez.</sub> in starker Konzentration in Elution 1 (E1) befindet, woraufhin die Konzentration in den weiteren Elutionen (E2–E4) stetig abnimmt (Abb. 4.4 D). Neben der mit Stern markierten Bande befinden sich in den Elutions-Spuren außerdem weitere, schwächere Banden im Bereich zwischen 25 und 35 kDa, wobei es sich vermutlich um degradierte Formen des GST-Fusionsproteins handelt. Die Proteinkonzentration in den verschiedenen Elutionen wurde mithilfe des NanoDrop-Spektrophotometers (PepLab) gemessen.

Die Antikörperherstellung im Kaninchen wurde durch die Arbeitsgruppe Prof. Dr. Martin Jung der Fachrichtung ‚Medizinische Biochemie und Molekularbiologie‘ am Universitätsklinikum des Saarlandes durchgeführt. Die Immunisierung erfolgte zu Beginn einmal mit 150 µg und anschließend zehnmal mit 100 µg Protein innerhalb von 6 Monaten. Die Kaninchen-Seren wurden nach Entnahme und Antikörper-Präadsorption (s. 3.2.30) jeweils durch Immunfluoreszenzfärbungen an Embryonen (s. 3.2.31) getestet, woraufhin sich Serum 8 als brauchbar erwies. Die Immunfluoreszenzfärbung mit dem neu hergestellten Antikörper Otp-PE auf *Drosophila*-Embryonen bildete eine Vervollständigung der Untersuchung der ortsspezifischen Expression der *otp*-Transkriptvarianten im Embryo. Die Untersuchung erfolgte durch *in situ* Hybridisierungen (s. 3.2.32) mithilfe der Sonden otp 4–9 und otp 1 sowie Immunfluoreszenzfärbungen (s. 3.2.31) mit den Antikörpern Otp und Otp-PE (Abb. 4.5).

Der Hybridisierungsbereich der *in situ* Sonde otp 1 umfasst die beiden *otp*-Exons 1 und 2, wodurch diese Sonde spezifisch für otp-RE ist (Abb. 4.5 A). Im Gegensatz dazu bindet die *in situ* Sonde otp 4–9 aufgrund ihres *otp*-Exon 4 bis 9 umfassenden Hybridisierungsbereichs alle Transkriptformen von *otp* (Abb. 4.5 A). Analog dazu bindet der Antikörper Otp-PE (hellgrün), dessen Bindebereich N-terminal der Homeodomäne (gelb) liegt, spezifisch das Protein Otp-PE, das aus der Transkriptvariante otp-RE resultiert, während der Antikörper Otp (dunkelgrün) C-terminal der Homeodomäne bindet und somit alle Otp-Proteinformen abdeckt (Abb. 4.5 B). Wie bereits gezeigt (Hildebrandt *et al.*, 2020) resultiert die Bindung der Sonde otp 4–9 in einer Färbung des gesamten mRNA-Expressionsmusters von *otp* im Nervensystem, im Enddarm und den Analplatten (Abb. 4.5 C), während die Sonde otp 1 ausschließlich die Färbung im Nervensystem verursacht (Abb. 4.5 D). Auffällig ist hierbei, dass die Färbung in beiden Fällen nur im anterioren Bereich des ventralen Nervensystems stark ausgeprägt



ist, während sie im posterioren Teil deutlich in der Intensität abnimmt. Die Grenze zwischen dieser anterioren, stärkeren und posterioren, schwächeren Expression befindet sich zwischen den Segmenten A2 und A3 (Abb. 4.5 C+D, weißer Pfeil).

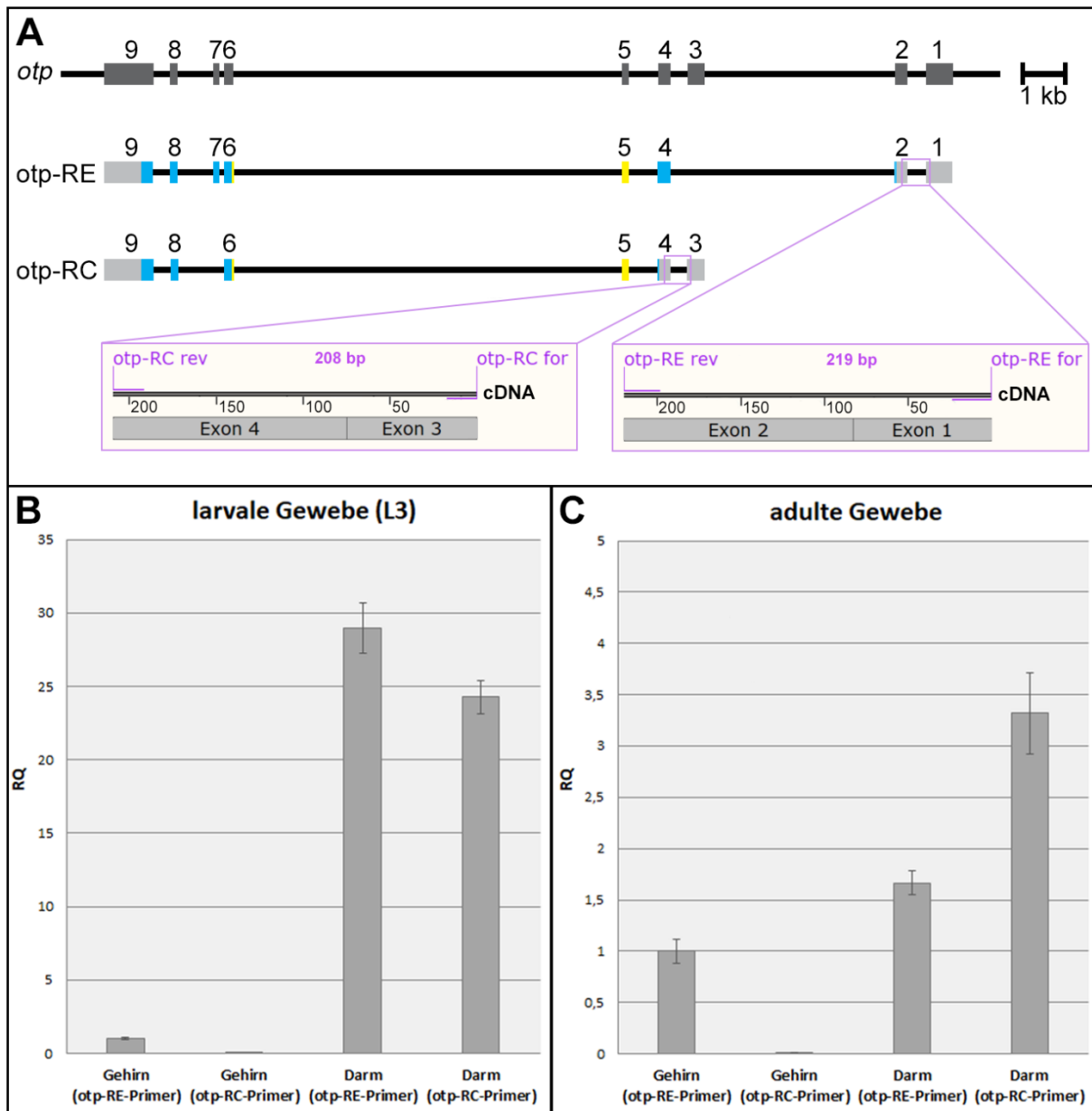


**Abbildung 4.5: Untersuchung des Transkripts *otp-RE* und des Proteins *Otp-PE* im *Drosophila*-Embryo mittels *in situ* Hybridisierung und Immunfluoreszenzfärbung.** (A) Genomische Region von *otp* mit den beiden Transkriptvarianten *otp-RE* und *otp-RC* sowie Lage der beiden *in situ* Sonden *otp 1* und *otp 4-9*. Exons sind als Kästchen dargestellt. In Blau sind translatierte Bereiche zu sehen und in Gelb die Homeodomäne. (B) Schematische Darstellung der beiden *Otp*-Proteinvarianten *Otp-PE* und *Otp-PC*. In Hellgrün ist die Bindestelle des Antikörpers *Otp-PE* zu sehen und in Dunkelgrün die des Antikörpers *Otp*. Gelb deutet auf die Homeodomäne hin. (C+D) *Otp in situ* Hybridisierung und (E+F) *Otp*-Immunfluoreszenzfärbung an wildtypischen Embryonen in Embryonalstadium 14. Die Embryonen befinden sich in Lateralansicht, anterior ist links. Der weiße Pfeil zeigt jeweils auf die Grenze zwischen der anterioren stärkeren und der posterioren schwächeren mRNA-Expression (C+D), der hellblaue Pfeil auf die Expressionsgrenze des Proteins im ventralen Nervensystem (E+F). (C) Nachweis der Gesamt-mRNA von *otp* mithilfe der *in situ* Sonde *otp 4-9*, die durch Detektion der Exons 4-9 alle *otp*-Transkriptformen abdeckt. (D) Nachweis des *otp*-Transkripts *otp-RE* durch die transkriptspezifische *in situ* Sonde *otp 1*. (E) *Otp*-Immunfluoreszenzfärbung mit dem alle *Otp*-Proteinformen bindenden *Otp*-Antikörper. (F) *Otp*-Immunfluoreszenzfärbung mit dem für das Protein *Otp-PE* spezifischen Antikörper *Otp-PE*.

Die Immunfluoreszenzfärbung mit dem Antikörper Otp unterscheidet sich von der *in situ* Hybridisierung mit der *in situ* Sonde otp 4–9 dahingehend, dass keine Otp-Proteinexpression im posterioren Teil des ventralen Nervensystems nachweisbar ist (Abb. 4.5 E), was bereits gezeigt wurde (Hildebrandt *et al.*, 2020). Die Grenze bildet hierbei ebenfalls die Segmentgrenze von A2 nach A3, die durch einen blauen Pfeil angedeutet wird. Analog dazu weist auch der Antikörper Otp-PE nur ein Proteinvorkommen im anterioren Teil des Nervensystems nach. Die Grenze ist hierbei ebenfalls durch einen blauen Pfeil markiert. Vergleichbar mit der *in situ* Hybridisierung mit der Sonde otp 1 verursacht der Antikörper Otp-PE keine Färbung im Enddarm und den Analplatten. Im Vergleich mit der Otp-Immunfluoreszenzfärbung erwies sich die Otp-PE-Immunfluoreszenzfärbung allerdings als schwieriger durchführbar und als deutlich schwächer in der Färbung.

Um zu untersuchen, wie es sich mit der ortsspezifischen Expression von otp-RE und otp-RC in der Larve und der Fliege verhält, wurden zunächst RT-qPCRs (s. 3.2.4) durchgeführt (Abb. 4.6). Hierzu wurden verschiedene Primerpaare getestet, woraufhin die Primer otp-RC for und otp-RC rev bzw. otp-RE for und otp-RE rev zur qPCR eingesetzt wurden (Abb. 4.6 A). Die Primerpaare binden spezifisch das jeweilige Transkript und wurden so gewählt, dass das jeweilige PCR-Produkt eine Exon-Exon-Grenze überspannt, um zu gewährleisten, dass während der qPCR ausschließlich cDNA und keine genomische DNA als *Template* verwendet wird. Die These der ortsspezifischen Expression von otp-RC und otp-RE im Embryo scheint durch die Möglichkeit der Transkript-Nachweise mithilfe der spezifischen *in situ* Sonden im Embryo verifiziert (Hildebrandt *et al.*, 2020), weshalb die RT-qPCR an larvalen und adulten Geweben durchgeführt wurde.

Die Ergebnisse der RT-qPCR sind für die larvalen (Abb. 4.6 B) und für die adulten (Abb. 4.6 C) Gewebe in Balkendiagrammform dargestellt. Hierzu wurden aus 50 Larven und 50 Fliegen jeweils die Gehirne und Enddärme präpariert, wonach die RNA-Isolation folgte (s. 3.2.4.1). Die RNA wurde in einer Reversen-Transkriptase (RT)-Reaktion in cDNA umgeschrieben (s. 3.2.4.2), die daraufhin zur qPCR eingesetzt wurde. Beide Primer-Paare wurden in technischen Triplikaten auf alle vier erzeugten cDNAs angewendet (s. 3.2.4.3), woraus die jeweiligen relativen Expressionsunterschiede (RQ) zur Erstellung der Balkendiagramme resultierten. Als Referenzgen wurde  $\alpha$ -*Tubulin* hinzugezogen (vgl. Ponton *et al.*, 2011). Die RQs wurden innerhalb der Auswertung der qPCR mithilfe der  $\Delta\Delta$ Ct-Methode ermittelt und auf die otp-RE-Expression im larvalen bzw. adulten Gehirn normiert (s. 3.2.4.4).

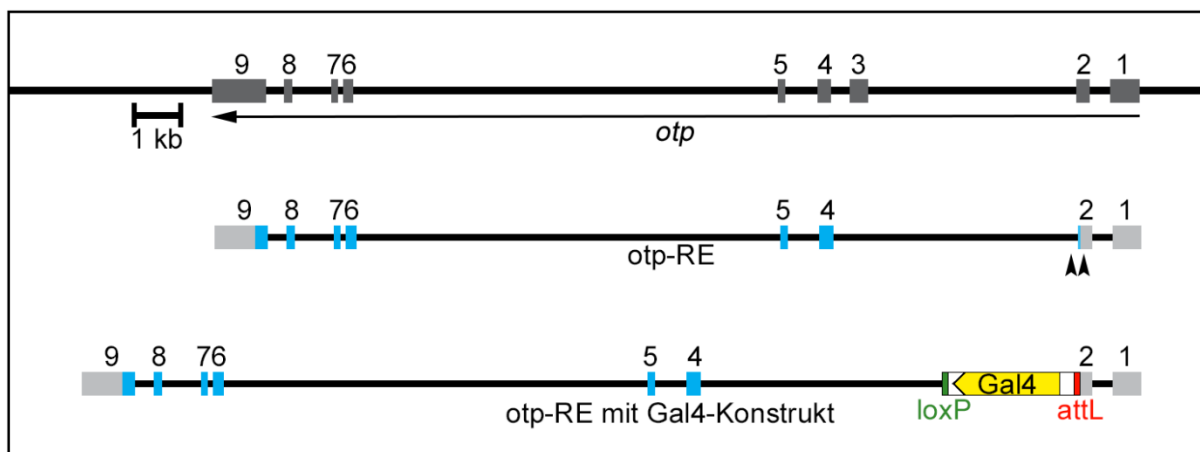


**Abbildung 4.6: Untersuchung der Expression der beiden *otp*-Transkriptvarianten *otp*-RC und *otp*-RE durch transkriptspezifische RT-qPCR. (A) Genomische Region von *otp* sowie die beiden Transkriptvarianten *otp*-RE und *otp*-RC. Exons sind als Kästchen dargestellt, in Blau sind translatierte Bereiche markiert und in Gelb die Homeodomäne. Gezeigt ist außerdem die Lage der qPCR-Primer *otp*-RC for und *otp*-RC rev (PCR-Produktgröße 219 bp) sowie *otp*-RE for und *otp*-RE rev (PCR-Produktgröße 208 bp) innerhalb der jeweiligen *otp*-cDNA. (B) Relativer Expressionsunterschied (RQ) von *otp*-RC und *otp*-RE in wildtypischen L3-Gehirnen und -Enddärmen (n = jeweils 50), ermittelt durch qPCR und normiert auf die *otp*-RE-Expression im larvalen Gehirn. (C) Relativer Expressionsunterschied (RQ) von *otp*-RC und *otp*-RE in wildtypischen adulten Gehirnen und Enddärmen (n = jeweils 50), durch qPCR ermittelt. Normiert wurde auf die *otp*-RE-Expression im adulten Gehirn.**

Die Ergebnisse der RT-qPCR auf larvale Gewebe zeigen, dass die *otp*-RE-Expression in der Larve nicht mehr ortsspezifisch nur im Nervensystem stattfindet, sondern die *otp*-RE-RNA im larvalen Enddarm im Vergleich zur *otp*-RE-RNA im Gehirn sogar um das 29-fache konzentriert vorliegt (Abb. 4.6 B). Dagegen scheint *otp*-RC auch in der Larve ortsspezifisch nur im Enddarm exprimiert zu werden. Im larvalen Gehirn ist keine *otp*-RC-RNA nachweisbar (RQ = 0). Auch in den adulten Geweben (Abb. 4.6 C) ist *otp*-RE-RNA im Enddarm nachweisbar, wenn auch mit einem weniger starken

Expressionsunterschied zur *otp*-RE-RNA im Gehirn (RQ = 1,7). *Otp*-RC scheint dahingegen auch in der Fliege ortsspezifisch im Enddarm exprimiert zu werden (RQ = 3,3) und liegt in doppelt so starker Konzentration vor wie die *otp*-RE-RNA im adulten Enddarm (RQ = 1,7). Im adulten Gehirn ist *otp*-RC nicht nachweisbar (RQ = 0). Zusammenfassend zeigt das RT-qPCR-Experiment also, dass die kürzere Transkriptvariante *otp*-RC auch in der Larve und dem adulten Tier weiterhin ortsspezifisch im Enddarm exprimiert wird, während die längere Transkriptvariante *otp*-RE in Larve und Fliege neben der Gehirn-Expression auch im Enddarm nachweisbar ist.

Um die innerhalb des RT-qPCR-Experiments beobachteten Ergebnisse der Aufhebung der ortsspezifischen Expression der Transkriptvariante *otp*-RE zu visualisieren, wurde ein in einer vorhergehenden Arbeit generierter Fliegenstamm verwendet, der ursprünglich hergestellt wurde, um den resultierenden Phänotyp bei einem Verlust der längeren *otp*-Transkriptvariante zu untersuchen (Hildebrandt, 2015). Zur Herstellung dieses Stammes wurde ein *Genetargeting*-Experiment mit dem Ziel, den Translationsstart der längeren Transkriptvariante *otp*-RE zu deletieren, durchgeführt (Hildebrandt, 2015). Dabei wurde die Deletionsstelle (Abb. 4.7, schwarze Pfeile) so gewählt, dass die Expression der kürzeren Transkriptvariante *otp*-RC mit Translationsstart in Exon 4 möglichst nicht beeinträchtigt wird, da sich das in embryonaler Letalität ausprägen könnte (Bach, 2011).

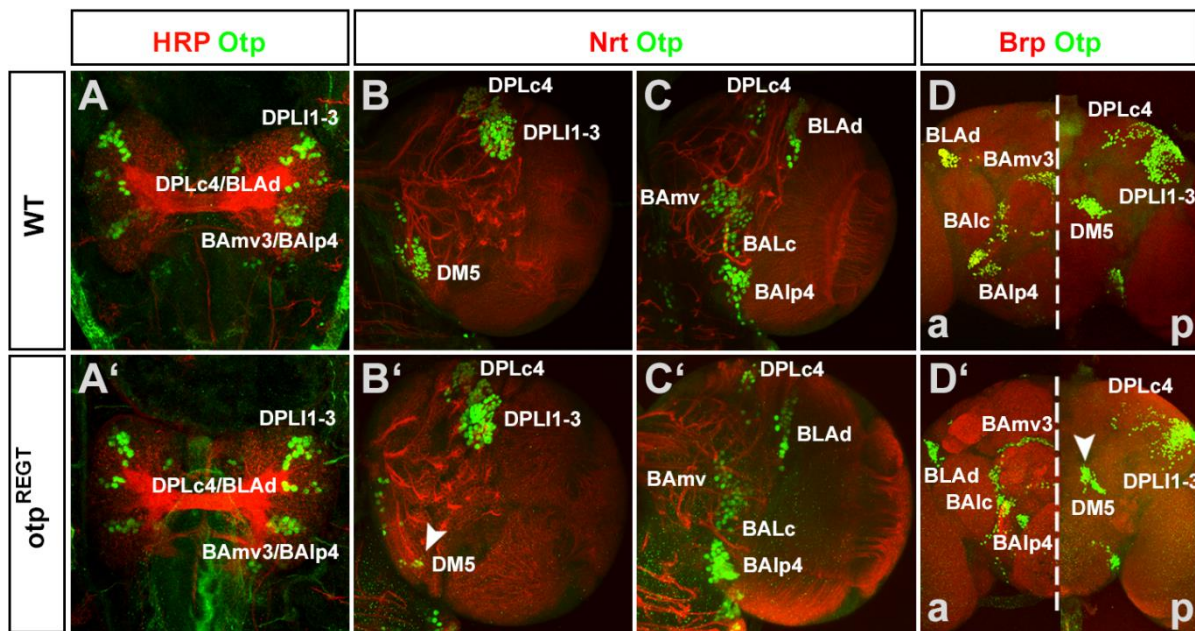


**Abbildung 4.7:** Lokalisation der Deletionsregion des *Genetargeting*-Stammes *otp*<sup>REGT</sup> sowie des Gal4-Konstrukts nach der anschließenden Reintegration von Gal4 in *otp*<sup>REGT</sup>. Dargestellt ist die genomische Region von *otp* sowie das Transkript *otp*-RE mit der *Genetargeting*-Deletionsregion (schwarze Pfeile) und der Lokalisation von Gal4 (gelb). Exons sind als Kästchen gezeigt, translatierte Bereiche in Blau. Das Gal4-Konstrukt besteht nach der Reintegration aus der attL-Sequenz (rot), dem Gal4-Gen (gelb) und einer loxP-Sequenz (grün).

Mithilfe der durch den *Genetargeting*-Vektor in den Bereich der Deletion eingebrachten *attB*-Site konnte im Anschluss eine zielgerichtete Integration von Gal4 über eine PhiC31-vermittelte Keimbahntransformation durchgeführt werden (Hildebrandt, 2017). Der daraus resultierende *otp*-Gal4-Stamm *otp*<sup>REGal4</sup> wurde für die weiteren Untersuchungen verwendet. Am Ende der Reintegration besteht das Gal4-Konstrukt im Genom aus den übrigbleibenden attL- (rot) und

loxP-Sites (grün) sowie der Gal4-Sequenz (gelb) (Abb. 4.7). Das Gal4-Konstrukt ist anstelle des otp-RE-Translationsstarts im Genom integriert. Da es dadurch in 5'-Richtung vor otp-RC liegt, bleibt die otp-RC-Expression, deren Translationsstart sich in Exon 4 befindet, sowohl durch die Deletion als auch die Gal4-Reintegration unbeeinflusst. Zudem liegt das regulatorische Element für die kürzere Transkriptvariante, das als *otp*-Enddarm-Element bezeichnet wird, unmittelbar vor Exon 3 (Kusch et al., 2002), sodass auch dieses nicht durch die Integration des Gal4-Konstrukts gestört wird. Durch die Lage von Gal4 dient dieser Gal4-Stamm der Untersuchung der *otp*-Expression im Nervensystem, da Gal4 im Expressionsmuster von *otp* exprimiert wird, was mithilfe von UAS-Reportergeräten sichtbar gemacht werden kann.

Zunächst erfolgte mittels Immunfluoreszenzfärbung (s. 3.2.31) eine Untersuchung der Otp-Expression in embryonalen, larvalen und adulten Gehirnen des *Genetargeting*-Stammes *otp*<sup>REGT</sup> (Abb. 4.8 A'-D') im Vergleich mit der wildtypischen Otp-Expression (Abb. 4.8 A-D).



**Abbildung 4.8:** Untersuchung der Otp-Expression im embryonalen, larvalen und adulten *Drosophila*-Gehirn des *Genetargeting*-Stammes *otp*<sup>REGT</sup>. Vergleich der wildtypischen Otp-Expression (A–D) mit der Otp-Expression des *otp*<sup>REGT</sup>-Stammes (A'–D') durch Immunfluoreszenzfärbung mit Anti-Otp in grün. Zur Verdeutlichung der Gehirnstrukturen in den unterschiedlichen Stadien sind zusätzlich HRP- (A+A'), Nrt- (B+B', C+C') und Brp-Immunfluoreszenzfärbungen (D+D') in rot gezeigt. Sichtbare, Otp-exprimierende Lineages sind in Weiß beschriftet: BALc, baso-anteriore Lineages (caudo-laterale Subgruppe); BALp, baso-anteriore Lineages (postero-laterale Subgruppe); BAMv, baso-anteriore Lineages (ventro-mediale Subgruppe); BLAd, anteriore baso-laterale Lineages (dorsale Subgruppe); DM, dorsomediale Lineage; DPLc, laterale dorso-posteriore Lineages (zentrale Subgruppe); DPLI, laterale dorso-posteriore Lineages (laterale Subgruppe). (A+A') Gesamt-Expressionsmuster von Otp im embryonalen Gehirn in Dorsalansicht, anterior ist unten, Embryonalstadium 16. (B+B', C+C') Larvale Hemisphäre in Dorsalansicht, anterior ist oben, dorsaler Hemisphärenbereich (B+B') und ventraler Hemisphärenbereich (C+C'). Der weiße Pfeil deutet auf die Lineage DM5 des *Genetargeting*-Stammes *otp*<sup>REGT</sup>, die eine stark reduzierte Otp-Expression aufweist (B'). (D+D') Gesamt-Expressionsmuster von Otp im adulten Zentralhirn, anteriore Ansicht, dorsal ist oben. Links anteriorer (a) Bereich des adulten Zentralhirns, rechts posteriorer (p) Bereich. Der weiße Pfeil deutet auf die Lineage DM5 des *Genetargeting*-Stammes *otp*<sup>REGT</sup>, die sich wildtypisch zeigt.

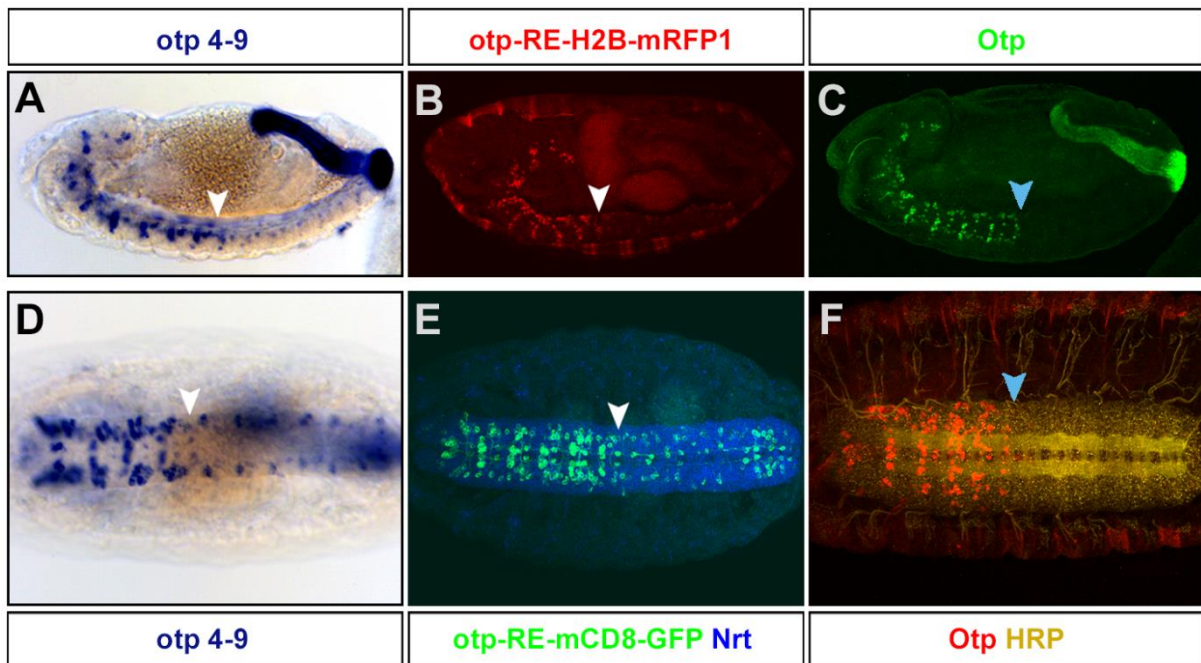
Unerwarteterweise zeigt das embryonale Gehirn des Stammes *otp*<sup>REGT</sup> (Abb. 4.8 A') das wildtypische Otp-Expressionsmuster in den drei Domänen P1, P2 und D1 (Hildebrandt et al., 2020), denen

inzwischen die Lineages DPL1–3 (P1), DPLc4 (P2) sowie BAMv3 und BALp4 (D1) zugeordnet werden konnten (s. Abb. 4.1). Des Weiteren sind die Otp-positiven Zellen der Lineage BLAd lateral zur Expressionsdomäne P2 sichtbar. Im Gegensatz hierzu weist das larvale Gehirn des Stammes  $otp^{REGT}$  im dorsalen Bereich eine stark verringerte Otp-Expression in der Lineage DM5 auf (Abb. 4.8 B', weißer Pfeil). Die weiteren Otp-positiven Lineages DPLc4 und DPL1–3 im dorsal-anterioren Bereich der larvalen Hemisphäre (Abb. 4.8 B') sowie BLAd, BAMv, BALc und BALp4 im ventralen Bereich des Gehirns (Abb. 4.8 C') gleichen dem wildtypischen Otp-Expressionsmuster (Abb. 4.8 B+C). Auch im adulten Gehirn des Stammes  $otp^{REGT}$  (Abb. 4.8 D') zeigen die Lineages BLAd, BAMv3, BALc und BALp4 im anterioren (a) Bereich sowie die Lineages DPL1-3 und DPLc4 im posterioren (p) Bereich keinen Unterschied zur wildtypischen Otp-Expression (Abb. 4.8 D). Die im larvalen  $otp^{REGT}$ -Gehirn im Otp-Expressionsmuster stark reduzierte Lineage DM5 zeigt im adulten Gehirn keinen Unterschied zur wildtypischen Färbung (Abb. 4.8 D', weißer Pfeil).

Mithilfe des neu generierten  $otp$ -Gal4-Stammes  $otp^{REGal4}$  erfolgten anschließend Untersuchungen in Embryonen (Abb. 4.9), L3-Larven (Abb. 4.10) und adulten Tieren (Abb. 4.11), wobei jeweils die beiden UAS-Reportergerne-Stämme UAS-H2B-mRFP1 und UAS-mCD8-GFP verwendet wurden. Hierbei liegt mRFP1 an das Histonprotein H2B fusioniert vor, das mit anderen Histonproteinen und DNA die Nukleosome bildet. Aufgrund dessen wird mRFP1 kernlokalisiert im von Gal4 vorgegebenen Muster exprimiert. Bei mCD8 handelt es sich um ein Transmembranprotein, weshalb das fusionierte GFP membrangebunden im Gal4-Expressionsmuster zu beobachten ist.

Die Untersuchung der embryonalen Otp-Expression erfolgte an Embryonen im Embryonalstadium 14 in Lateral- (Abb. 4.9 A–C) und Ventralansicht (Abb. 4.9 D–F). Zum Vergleich wurden Aufnahmen einer *in situ* Hybridisierung (s. 3.2.32) mit der bereits bekannten, alle  $otp$ -Transkriptvarianten-detectierenden *in situ* Sonde  $otp$  4–9 (Abb. 4.9 A+D) hinzugezogen sowie einer Immunfluoreszenzfärbung (s. 3.2.31) mit dem alle Otp-Proteinvarianten bindenden Antikörper Otp (Abb. 4.9 C+F). Auffällig ist, dass keine Reporterexpression im Enddarm stattfindet und Gal4 hier scheinbar nicht durch das bereits identifizierte  $otp$ -Enddarm-Element aktiviert wird (Kusch *et al.*, 2002). Somit handelt es sich bei dem hergestellten  $otp$ -Gal4-Stamm offenbar um einen spezifischen  $otp$ -RE-Gal4-Stamm. Der Vergleich zu der *in situ* Hybridisierung zeigt, dass die Reporterproteine im Nervensystem analog zur *in situ* Färbung exprimiert werden, nämlich im Gehirn und im anterioren Bereich des ventralen Nervensystems in deutlicher Form, im posterioren Bereich des ventralen Nervensystems schwächer ausgeprägt. Die Grenze zwischen der anterioren stärkeren Färbung und der posterioren schwächeren Färbung ist jeweils mit einem weißen Pfeil markiert, was gleichzeitig den Übergang zwischen den Segmenten A2 und A3 darstellt. Im Gegensatz dazu zeigt die Immunfluoreszenzfärbung keine Otp-Expression im posterioren Teil des ventralen Nervensystems

(Abb. 4.9 C+F). Der blaue Pfeil deutet ebenfalls auf die Grenze zwischen den Segmenten A2 und A3 hin, die hier die Grenze der Expression bildet. Außerdem ist keine Reporter-Expression im Enddarm und den Analplatten zu sehen, sondern ausschließlich im Nervensystem (Abb. 4.9 B), was die ortsspezifische Expression der *otp*-Transkriptvarianten im Embryo bestätigt.



**Abbildung 4.9:** Untersuchung der Expression der *otp*-Transkriptvariante *otp*-RE in Embryonen von *Drosophila melanogaster* (Stadium 14) mithilfe des Treiberstammes *otp*<sup>REGal4</sup>. Die Embryonen sind in Lateral- (A–C) bzw. Ventralansicht (D–F) gezeigt. Anterior ist links. H2B bedeutet, dass das Reporterprotein kernlokalisiert exprimiert wird, und mCD8, dass es membrangebunden auftritt. Die weißen Pfeile deuten auf die Grenze zwischen der stärkeren anterioren und der schwächeren posterioren mRNA- (A+D) bzw. Reporterprotein-Expression (B+E) hin, und die hellblauen Pfeile zeigen auf die Expressionsgrenze des Otp-Proteins (C+F). (A+D) *Otp in situ* Hybridisierung durch die die *otp*-Gesamt-RNA detektierende Sonde *otp* 4–9 an wildtypischen Embryonen. (B) H2B-mRFP1-Expression im *otp*-RE-Expressionsmuster. (C) Otp-Immunfluoreszenzfärbung in Grün an einem wildtypischen Embryo. (E) MCD8-GFP-Expression im *otp*-RE-Expressionsmuster. Nrt wurde als Nervensystem-Marker in Blau gefärbt. (F) Otp-Immunfluoreszenzfärbung in Rot an einem wildtypischen Embryo. Neurale Glykoproteine (Anti-HRP) sind in Gelb dargestellt.

Zur Analyse der Reportergenexpression von H2B-mRFP1 und mCD8-GFP im Expressionsmuster von *otp*-RE in der L3-Larve wurden verschiedene larvale Gewebe herangezogen (Abb. 4.10). Bereits an der intakten Larve (Abb. 4.10 A+B) ist zu sehen, dass die, in diesem Fall mRFP1-, Reportergen-Expression sich nicht auf das Nervensystem beschränkt (Abb. 4.10 A im anterioren Bereich), sondern auch in den Analplatten (Abb. 4.10 A im posterioren Bereich) und im Enddarm (Abb. 4.10 B) auftritt. Der präparierte larvale Enddarm (ED) zeigt eine *otp*-RE-H2B-mRFP1-Expression (Abb. 4.10 D), die analog zur Otp-Expression im Enddarm (Abb. 4.10 C) zu betrachten ist. Im Rektum ist allerdings ein Unterschied zu sehen, da hier keine Otp-, aber eine mRFP1-Expression auftritt (Abb. 4.10 C+D, orangefarbener Pfeil). Somit ist festzustellen, dass die Transkriptvariante *otp*-RE in der Larve nicht mehr ortsspezifisch nur im Nervensystem exprimiert wird.

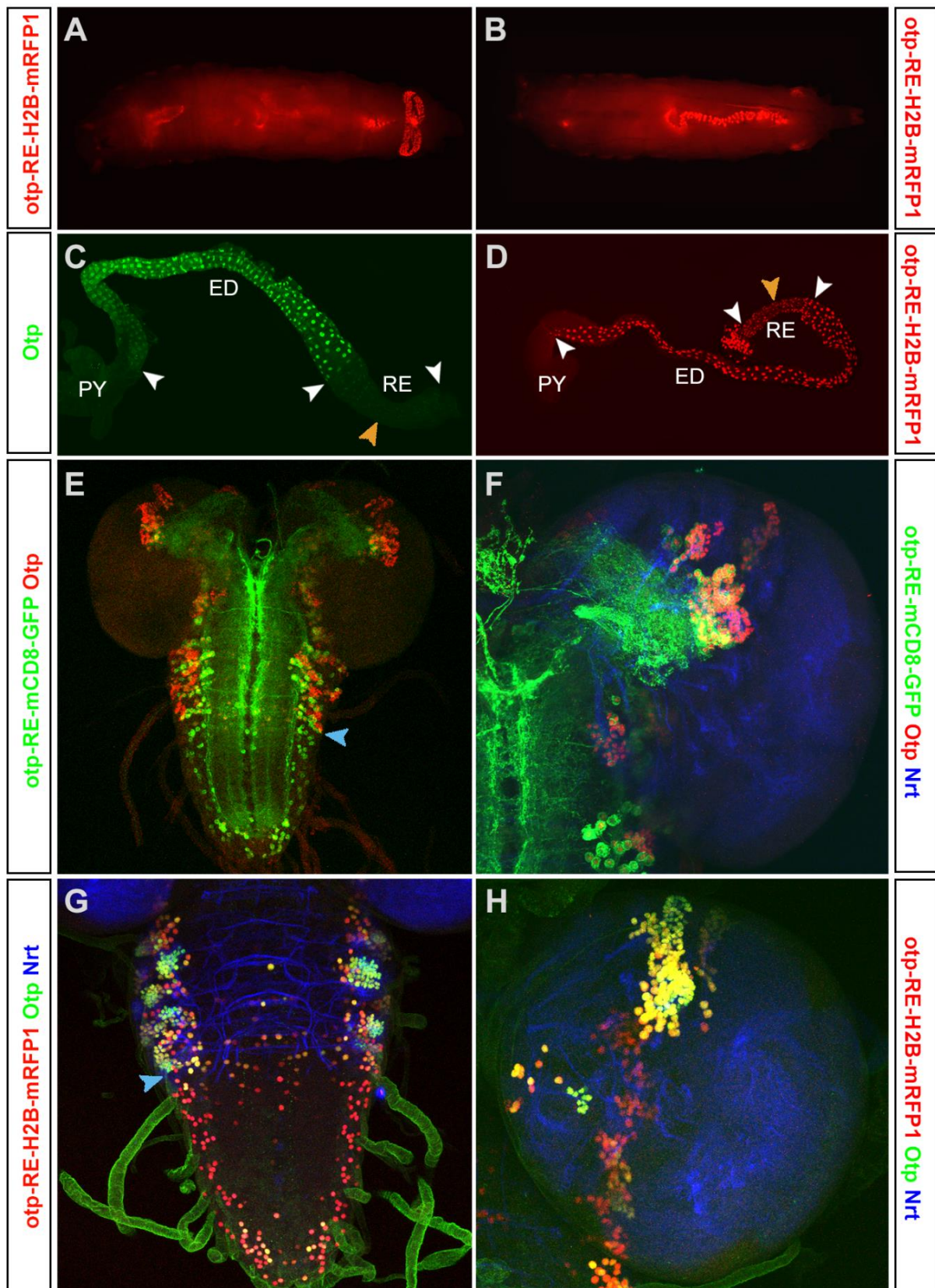


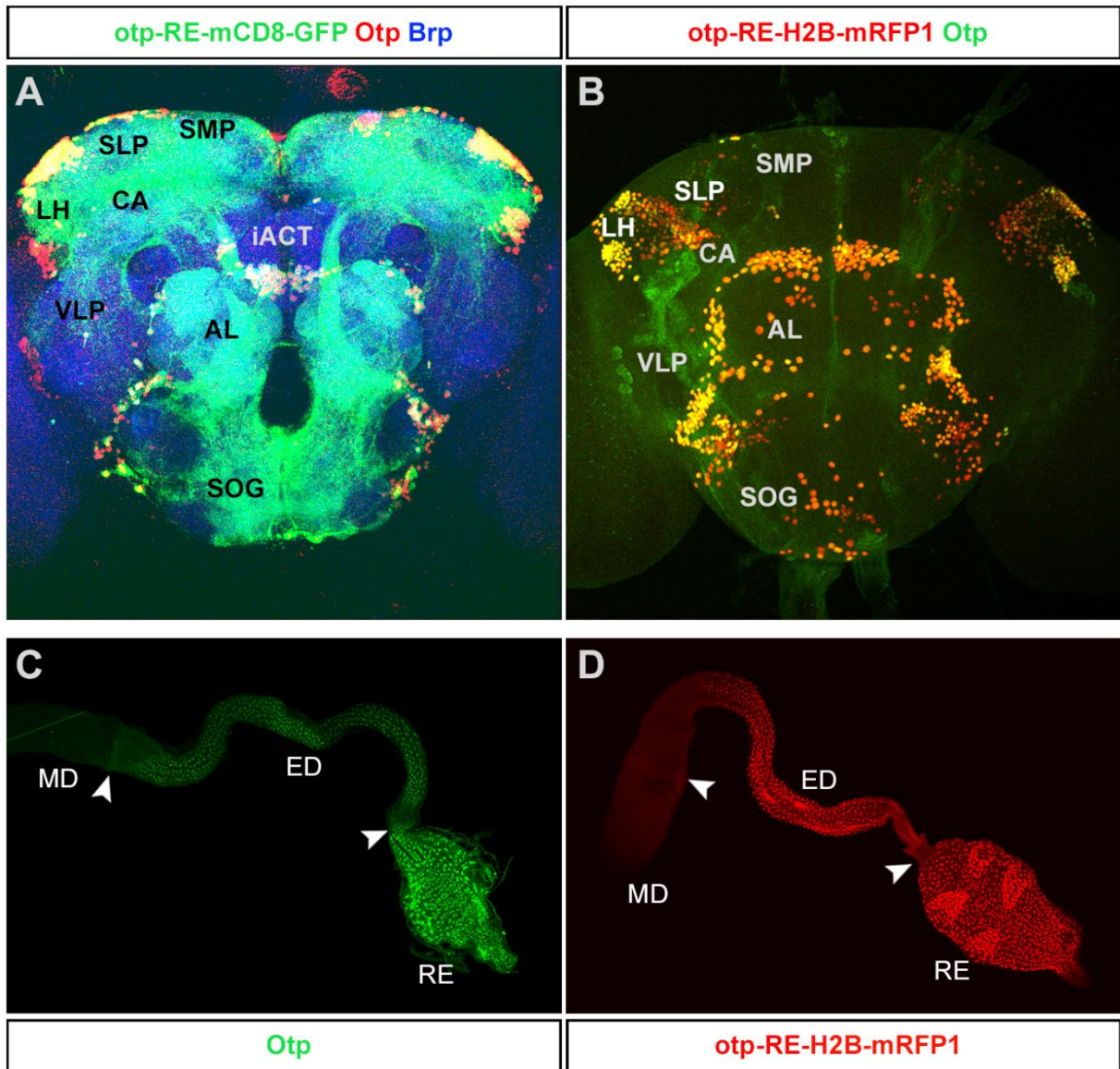
Abbildung 4.10: Untersuchung der Reporterexpression von H2B-mRFP1 bzw. mCD8-GFP im Expressionsmuster der *otp*-Transkriptvariante *otp-RE* in larvalen Geweben von *Drosophila melanogaster* mithilfe des Treiberstammes *otp*<sup>REGal4</sup>. H2B bedeutet, dass das Reporterprotein kernlokalisiert exprimiert wird, und mCD8, dass es membrangebunden auftritt. Weiße Pfeile deuten auf die Grenzen der Strukturen des Darms hin, orangefarbene auf Expressionsunterschiede (C+D). Die hellblauen Pfeile deuten auf die Expressionsgrenze von Otp im Hirnstamm (E+G). PY, Pylorus; ED, Enddarm; RE, Rektum. (A+B) H2B-mRFP1-Expression in der vollständigen L3-Larve in Ventral- (A) und Dorsalansicht (B). Anterior ist links. (C) Otp-Immunfluoreszenzfärbung in Grün im wildtypischen larvalen Enddarm. Anterior ist links. (D) H2B-mRFP1-Expression im



larvalen Enddarm, anterior ist links. (E) MCD8-GFP-Expression im larvalen Gehirn in Dorsalansicht mit Otp-Immunfluoreszenzfärbung in Rot. Anterior ist oben. (F) MCD8-GFP-Expression in einer Hemisphäre des larvalen Gehirns in Dorsalansicht mit Otp-Immunfluoreszenzfärbung in Rot und Nrt-Immunfluoreszenzfärbung in Blau. Anterior ist oben. (G) H2B-mRFP1-Expression im Hirnstamm des larvalen Gehirns in Dorsalansicht mit Otp-Immunfluoreszenzfärbung in Grün und Nrt-Immunfluoreszenzfärbung in Blau. Anterior ist oben. (H) H2B-mRFP1-Expression in einer Hemisphäre des larvalen Gehirns in Dorsalansicht mit Otp-Immunfluoreszenzfärbung in Grün und Nrt-Immunfluoreszenzfärbung in Blau. Anterior ist oben.

Im larvalen Hirnstamm unterscheidet sich die Otp-Expression von der jeweiligen Reporter-Expression dahingehend, dass die Otp-Expression nur in den thorakalen Segmenten auftritt, während die Reporter-Expression auch in den abdominalen Segmenten zu sehen ist (Abb. 4.10 E+G). Die posteriore Grenze der Otp-Expression befindet sich im Hirnstamm des larvalen Gehirns zwischen Thorakal- und Abdominal-Segmenten (Abb. 4.10 E+G, hellblauer Pfeil). Die GFP-Färbung wirkt aufgrund der membrangebundenen Lokalisation so prominent, da dadurch auch die Axone der betroffenen Zellen markiert sind, die sich im Neuropil sammeln (Abb. 4.10 E+F). Im larvalen Gehirn beschränkt sich der Unterschied zwischen Reporterprotein und Otp auf den Hirnstamm, während die larvale Hemisphäre keinen Unterschied zwischen Reporterprotein und Otp aufweist (Abb. 4.10 F+H), was die kernlokalisierte mRFP1-Expression (Abb. 4.10 H) deutlicher zeigt als das membrangebundene GFP (Abb. 4.10 F). Dass nicht alle gefärbten Zellen ein einheitliches Mischungs-Gelb aus mRFP1 und Otp-Alexa488 im Z-Stack aufweisen, ist der Lokalisierung der Zellen in der Hemisphäre geschuldet. Die Auswertung der Rohdaten zeigt, dass alle gefärbten Zellen sowohl mRFP1 als auch Otp enthalten (nicht gezeigt).

Auch für die Untersuchung der Expression von otp-RE mithilfe des otp<sup>REGal4</sup>-Stammes und der beiden Reportergerüststämme UAS-mCD8-GFP und UAS-H2B-mRFP1 im adulten Tier wurden sowohl Gehirne als auch Enddärme betrachtet (Abb. 4.11). Im adulten Gehirn decken sich Reporterprotein-Vorkommen und Otp-Färbung, was im Vergleich mit dem GFP-exprimierenden Gehirn (Abb. 4.11 A) vor allem im mRFP1-exprimierenden Gehirn deutlich wird (Abb. 4.11 B). Aufgrund der Kernlokalisation von mRFP1 und Otp deckt sich das Muster hier offensichtlich. Durch die membrangebundene Lokalisation von GFP sind nicht nur die Zellmembranen, sondern auch die Axone der betroffenen Zellen markiert (Abb. 4.11 A). Hier ist festzustellen, dass sich die Axone der Otp-positiven Lineages vor allem im Bereich des SOG, der AL und dem höherliegenden Protocerebrum konzentrieren. Auffällig ist die Färbung des inneren antennocerebralen Trakts (iACT), über den olfaktorische Informationen aus den AL in Calyx (CA) und LH weitergeleitet werden. Der iACT wird zum Großteil aus Projektionsneuronen der Otp-positiven Lineages BAMv3, BALc und BALp4 gebildet (s. Abb. 5.1). Im Enddarm-Bereich gleichen sich die Otp-Färbung (Abb. 4.11 C) und die mRFP1-Expression (Abb. 4.11 D) sowohl im Enddarm (ED) als auch im Rektum (RE). Das unterstützt die These, dass auch in der Fliege keine ausschließliche nervensystemspezifische Expression von otp-RE mehr vorliegt, sondern otp-RE hier auch im Enddarm und Rektum exprimiert wird.



**Abbildung 4.11:** Untersuchung der Reporterexpression von mCD8-GFP bzw. H2B-mRFP1 im otp-RE-Expressionsmuster in adulten *Drosophila*-Geweben mithilfe des Treiberstammes  $otp^{REGal4}$ . H2B bedeutet, dass das Reporterprotein kernlokalisiert exprimiert wird und mCD8, dass es membrangebunden auftritt. Die weißen Pfeile deuten auf die Strukturgrenzen im Darm hin. AL, antennale Lobe; CA, Calyx; ED, Enddarm; iACT, innerer antennocerebraler Trakt; LH, laterales Horn; MD, Mitteldarm; RE, Rektum; SOG, suboesophageales Ganglion; SMP, mediales superior Protocerebrum; SLP, laterales superior Protocerebrum; VLP, ventro-laterales Protocerebrum. **(A)** MCD8-GFP-Expression im adulten Zentralgehirn in Anterioransicht. Dorsal ist oben. Mit Otp-Immunfluoreszenzfärbung in Rot und Brp-Immunfluoreszenzfärbung in Blau. **(B)** H2B-mRFP1-Expression im adulten Zentralgehirn in Anterioransicht. Dorsal ist oben. Mit Otp-Immunfluoreszenzfärbung in Grün. **(C)** Wildtypischer, adulter Enddarm mit Otp-Immunfluoreszenzfärbung in Grün. Anterior ist links. **(D)** H2B-mRFP1-Expression im adulten Enddarm. Anterior ist links.

Diese Ergebnisse runden die Untersuchung der beiden Transkriptvarianten von *otp* in den drei *Drosophila*-Stadien Embryo, Larve und Fliege ab.

## 4.2 Untersuchung der Regulation von *otp*

In den bisherigen Untersuchungen der Transkriptvariante *otp*-RE im Embryo fällt immer wieder auf, dass die *otp*-Expression im embryonalen Nervensystem zwischen den Segmenten A2 und A3 eine Veränderung erfährt. Diese Veränderung ist sowohl innerhalb einer *in situ* Hybridisierung oder einer Reporter-gen-Expression zu sehen als auch im direkten Vergleich der *in situ* Hybridisierung mit einer Otp-Immunfluoreszenzfärbung (siehe Abb. 4.5 C–F). Hier ist zu beobachten, dass die RNA-Expression ab Segment A3 zwar vorhanden, aber deutlich schwächer ausgeprägt als im anterioren Bereich vorliegt, während ab diesem Punkt keine Protein-Expression mehr nachweisbar ist. Aufgrund dieser Beobachtung liegt die Vermutung einer posttranskriptionellen Regulation nahe.

### 4.2.1 Untersuchung der Interaktion der microRNA miR-252 mit *otp*

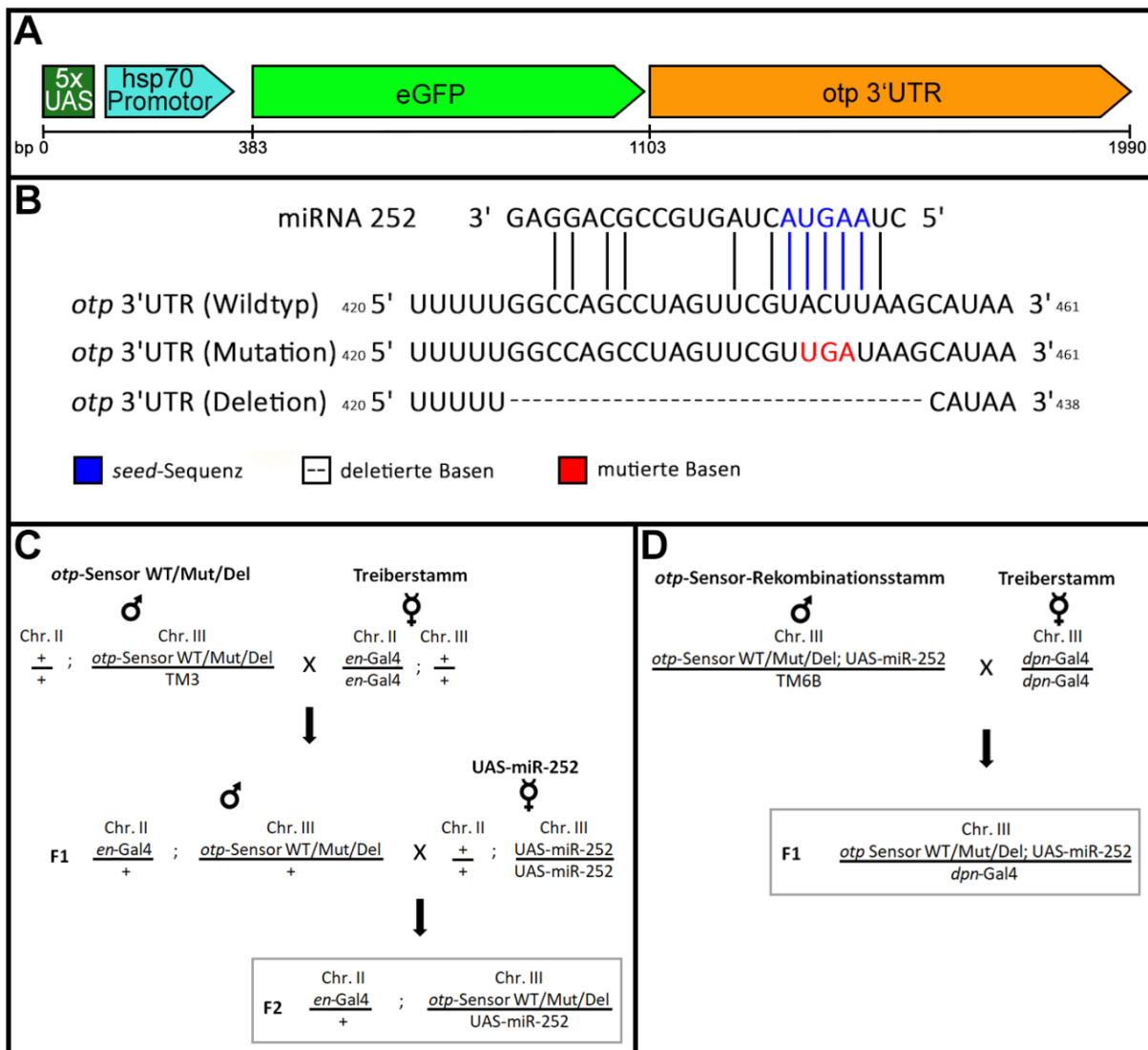
In einer vorherigen Arbeit konnte gezeigt werden, dass die microRNA (miRNA) miR-252 mit der 3'UTR von *otp* interagiert (Hildebrandt, 2015) und deshalb für die posttranskriptionelle Regulation von *otp* verantwortlich sein könnte. Daraufhin wurden drei unterschiedliche *otp*-Sensorstrukturen kloniert und damit transgene Fliegenstämme etabliert (Hildebrandt, 2017), um die potentielle Bindestelle in der 3'UTR von *otp* zu bestätigen. Die *otp*-Sensorstrukturen bestehen aus 5xUAS-Bindestellen in Verbindung mit einem hsp70-Minimalpromotor, was in einem starken, durch Gal4 induzierbaren Promotor resultiert, sowie einer eGFP-Sequenz und der wildtypischen oder modifizierten *otp* 3'UTR (Abb. 4.12 A). Bei gleichzeitiger Fehlexpression des jeweiligen *otp*-Sensoronstrukts und eines UAS-miR-252-Konstrukts kann anhand der GFP-Intensität im Gewebe ermittelt werden, ob die miR-252 die *otp* 3'UTR an der potentiellen Bindestelle bindet. Findet eine Bindung statt, führt das dazu, dass die weitere GFP-Proteinexpression inhibiert wird, während sie bei Nicht-Binden der miRNA ungestört vonstattengeht.

Die drei Sensorstrukturen unterscheiden sich im Bereich der potentiellen Bindestelle von miR-252 in der 3'UTR von *otp* (Abb. 4.12 B). Es handelt sich um ein wildtypisches Sensorkonstrukt sowie je ein Sensorkonstrukt mit Mutation bzw. Deletion. Die sogenannte *seed*-Sequenz der miRNA (Abb. 4.12 B, blau) ist essentiell für die Bindung der miRNA an die Ziel-mRNA, weshalb die beiden Modifizierungen innerhalb dieses Bereiches vorgenommen wurden. Im Sensorkonstrukt mit Mutation wurden drei Basen innerhalb der durch die *seed*-Sequenz gebundenen mRNA-Sequenz mutiert (Abb. 4.12 B, rot), und im Sensorkonstrukt mit Deletion fehlen 23 bp über die gesamte Bindestelle von miR-252 (Abb. 4.12 B, gestrichelt).

Zur Untersuchung und Verifizierung der Interaktion von miR-252 mit *otp* wurden die beiden Treiberstämme *engrailed (en)*-Gal4 und *deadpan (dpn)*-Gal4 verwendet, mithilfe derer das jeweilige *otp*-Sensor-konstrukt gemeinsam mit einem UAS-miR-252-Konstrukt fehlexprimiert wurde. *En* wird innerhalb der posterioren Kompartimente exprimiert und eignet sich damit als Treiberstamm zur Fehlexpression in Flügel-Imaginalscheiben. Die *dpn*-Expression ist im Gehirn zu beobachten. So konnte die Untersuchung der Interaktion von miR-252 und *otp* in zwei verschiedenen Geweben durchgeführt werden.

Da das *en*-Gal4-Konstrukt auf dem zweiten Chromosom liegt, während sich das *dpn*-Gal4-Konstrukt auf dem dritten Chromosom, und damit auf demselben Chromosom, wie das *otp*-Sensor-konstrukt, befindet, musste nach zwei unterschiedlichen Kreuzungsschemata vorgegangen werden. Zur Kreuzung mit *en*-Gal4 (Abb. 4.12 C) wurden männliche Fliegen der *otp*-Sensorstämme mit Jungfrauen des homozygoten Treiberstammes *en*-Gal4 gekreuzt, woraufhin männliche Nachkommen mithilfe ihrer sichtbaren GFP-Expression selektiert wurden, die sowohl *en*-Gal4 als auch das jeweilige *otp*-Sensor-konstrukt tragen. Diese wurden mit Jungfrauen des homozygoten Testerstammes UAS-miR-252 gekreuzt, woraufhin in der zweiten Generation Larven vorliegen, die alle drei Komponenten zur Fehlexpression von *otp*-Sensor-konstrukt und UAS-miR-252-Konstrukt im posterioren Bereich der Flügel-Imaginalscheiben enthalten und die Fehlexpression ausprägen. Diese wurden zur weiteren Untersuchung selektiert.

Zur Kreuzung mit *dpn*-Gal4 (Abb. 4.12 D) wurde zunächst ein Stamm etabliert, der das jeweilige *otp*-Sensor-konstrukt rekombiniert mit dem UAS-miR-252-Konstrukt auf dem dritten Chromosom enthält, da alle drei zur Untersuchung benötigten Komponenten auf dem dritten Chromosom vorliegen (s. 3.2.25). Männliche Tiere dieser Rekombinationsstämme wurden mit Jungfrauen des Treiberstammes *dpn*-Gal4 gekreuzt, sodass bereits die Nachkommen der ersten Generation alle drei Komponenten zur Fehlexpression des jeweiligen *otp*-Sensor-konstrukts zusammen mit dem UAS-miR-252-Konstrukt im Gehirn enthalten, die Fehlexpression ausprägen und selektiert werden konnten. Die jeweils zur Untersuchung herangezogene Generation ist innerhalb des jeweiligen Kreuzungsschemas durch einen grauen Kasten markiert.



**Abbildung 4.12: *Otp*-Sensorkonstrukte und Kreuzungsschemata zur Untersuchung der Fehlexpression von *otp*-Sensor und UAS-miR-252 mithilfe der Treiberstämme *engrailed* (*en*)-Gal4 und *deadpan* (*dpm*)-Gal4. (A) *Otp*-Sensor aus UAS-Bindestellen (dunkelgrün), hsp70-Minimalpromotor (türkis), eGFP (grün) und *otp* 3'UTR (orange), wie er innerhalb des Sensorkonstrukts vorliegt. (B) RNA-Sequenzen der wildtypischen und der modifizierten *otp* 3'UTR im Bereich der Bindestelle der miRNA miR-252. Striche in der Sequenz deuten auf deletierte Basen hin, die rote Markierung zeigt die Mutation. In Blau ist die *seed*-Sequenz der miRNA markiert. (C+D) Kreuzungsschemata zur Untersuchung der Fehlexpression der *otp*-Sensoren und UAS-miR-252 mithilfe der Treiberstämme *en*-Gal4 (C) und *dpm*-Gal4 (D). Gezeigt sind ausschließlich Genotypen, die zu weiteren Kreuzungen verwendet wurden. Die römischen Zahlen II und III bezeichnen das 2. bzw. 3. Chromosom, und das + bedeutet, dass das jeweilige Chromosom wildtypisch vorliegt. TM3 bzw. TM6B bezeichnet das drittchromosomale Balancerchromosom mit dem TM3-Marker *Stubble* (*Sb*) bzw. dem TM6B-Marker *Tubby* (*Tb*). Der graue Kasten markiert jeweils die Generation, deren Larven zur phänotypischen Analyse präpariert wurden.**

Die selektierten Larven der entsprechenden Generationen wurden anschließend auf zwei verschiedene Weisen auf die GFP-Intensität überprüft (Abb. 4.13). Es wurden je 20 Larven pro Kreuzung zur Präparation und Fixierung der Flügel-Imaginalscheiben aus den Kreuzungen mit *en*-Gal4 bzw. der Gehirne aus den Kreuzungen mit *dpm*-Gal4 verwendet (s. 3.2.29), die anschließend auf Objektträger gebracht und konfokalmikroskopisch aufgenommen wurden (s. 3.2.35).

Abbildung 4.13 zeigt je eine repräsentative Flügel-Imaginalscheibe (Abb. 4.13 A–C) bzw. ein repräsentatives Gehirn (Abb. 4.13 F–H) für die verschiedenen *otp*-Sensorstrukturen. Des Weiteren wurden je 20 Aufnahmen pro Kreuzung mithilfe der Software ImageJ auf ihre relative Fluoreszenzintensität ausgewertet, was in den Abbildungsteilen D bzw. I als Balkendiagramme gezeigt ist. In den Mikroskopaufnahmen sowie den Balkendiagrammen ist unabhängig des Treiberstammes dieselbe Tendenz erkennbar. Die Fluoreszenzintensität ist am schwächsten in den Kreuzungen mit dem Sensorstruktur mit wildtypischer *otp* 3'UTR (WT), wird stärker in den Kreuzungen mit dem Sensorstruktur mit *otp* 3'UTR mit Mutation (Mut) und ist am stärksten in den Kreuzungen mit dem Sensorstruktur mit *otp* 3'UTR mit Deletion (Del) ausgeprägt. Dabei ist zu beobachten, dass sich dieser Anstieg der relativen Fluoreszenzintensität in Kreuzungen mit *en*-Gal4 schwächer ausprägt und sich von 1 (WT) über 1,1 (Mut) bis hin zu 1,3 (Del) erstreckt (Abb. 4.13 D), während er in Kreuzungen mit *dpn*-Gal4 steiler ausfällt und von 1 (WT) über 1,3 (Mut) zu 2,2 (Del) ansteigt (Abb. 4.13 I).

Aus weiteren 20 Larven pro Kreuzung wurde RNA isoliert (s. 3.2.4.1), die über eine Reverse-Transkriptions-Reaktion (RT) in cDNA umgeschrieben (s. 3.2.4.2) und zur qPCR eingesetzt wurde (s. 3.2.3.3). Hierbei wurde ein eGFP-bindendes Primerpaar verwendet. Als Referenzgen diente  *$\alpha$ -Tubulin* (vgl. Ponton *et al.*, 2011), das während der Auswertung mithilfe der  $\Delta\Delta$ Ct-Methode hinzugezogen wurde (s. 3.2.3.4). Normiert wurde hierbei jeweils auf die Kreuzungen mit dem Sensorstruktur mit wildtypischer *otp* 3'UTR (WT). Die Ergebnisse der qPCR-Auswertung sind in Abbildungsteil E für die Kreuzungen mit *en*-Gal4 und in Abbildungsteil J für die Kreuzungen mit *dpn*-Gal4 in Form von Balkendiagrammen gezeigt. In den Kreuzungen mit *en*-Gal4 zeigt die Kreuzung mit dem Sensorstruktur mit *otp* 3'UTR mit Mutation (Mut) den größten relativen Expressionsunterschied (RQ = 3,6), während die Kreuzung mit dem Sensorstruktur mit Deletion in der *otp* 3'UTR (Del) einen relativen Expressionsunterschied von 2,7 aufweist. In den Kreuzungen mit *dpn*-Gal4 sind nur schwache Expressionsunterschiede zu erkennen. Sowohl die Kreuzung mit dem Sensorstruktur mit Mutation in der 3'UTR von *otp* (Mut) als auch die Kreuzung mit dem Sensorstruktur mit *otp* 3'UTR mit Deletion (Del) weisen einen relativen Expressionsunterschied von 1,3 auf. Diese Experimente verifizieren, dass die miRNA miR-252 mit der 3'UTR von *otp* über die angedachte vermutete Bindestelle interagiert.

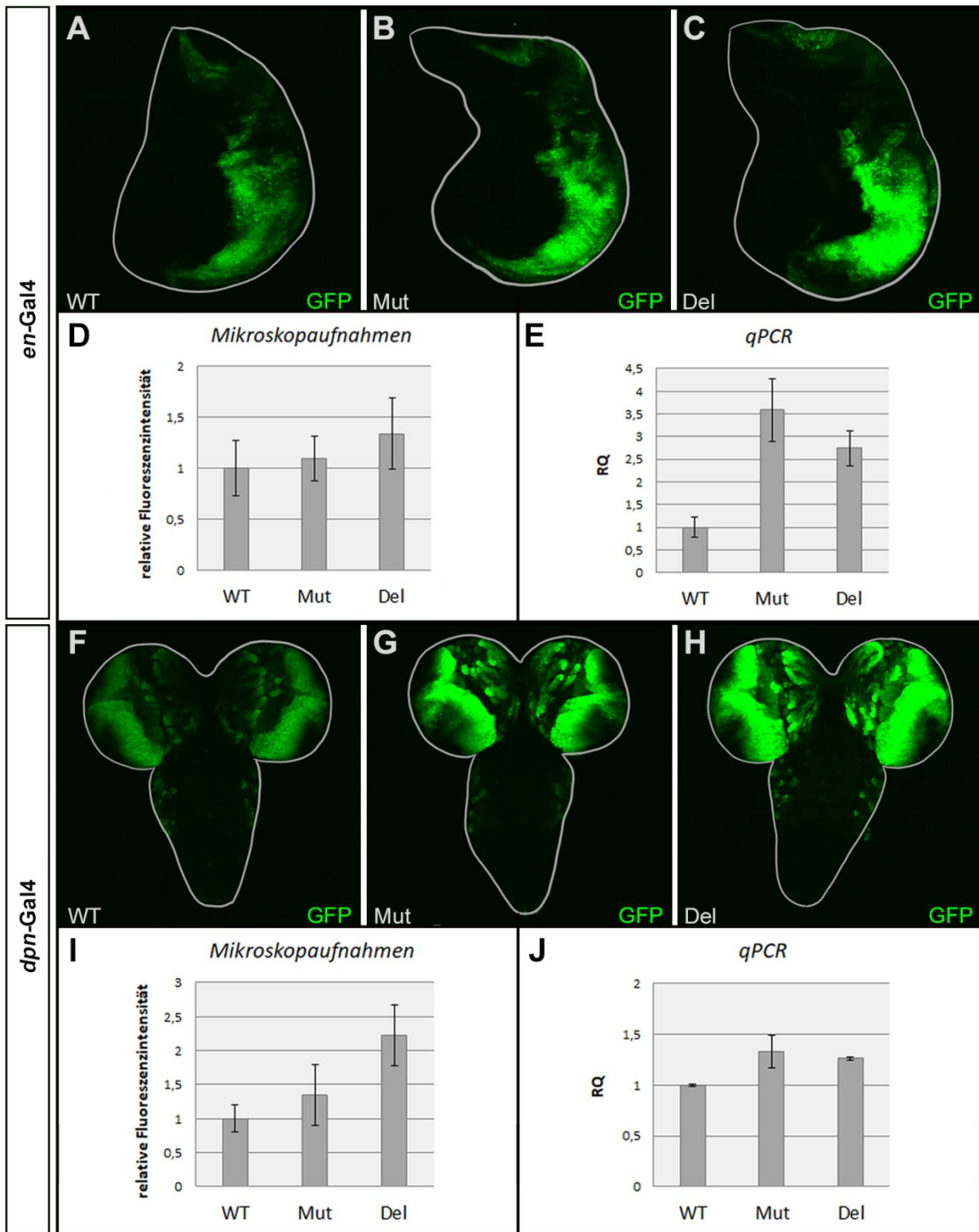


Abbildung 4.13: Untersuchung der Fehlexpression der *otp*-Sensorstrukture (wildtypisch bzw. mit Mutation oder Deletion innerhalb der *otp* 3'UTR) zusammen mit UAS-miR-252 mithilfe der Treiberstämme *engrailed* (*en*)-Gal4 (A–E) und *deadpan* (*dpn*)-Gal4 (F–J) in larvalen Geweben durch Konfokalmikroskopie und qPCR. Die GFP-Expression ist in Grün dargestellt. Zur besseren Orientierung wurden die Gewebe nachträglich umrandet. Die Aufnahmen wurden unter denselben Einstellungen des Konfokalmikroskops getätigt und zur Erstellung der Abbildung wurden dieselben ImageJ-Bearbeitungsparameter verwendet. (A–C) Konfokalmikroskopische Aufnahmen je einer repräsentativen Flügel-Imaginalscheibe der F2-Generation der Kreuzungen des (A) wildtypischen, (B) Mutation-enthaltenden und (C) Deletion-enthaltenden *otp*-Sensorkonstrukts und UAS-miR-252 mit *en*-Gal4. Die Flügel-Imaginalscheiben sind in Lateralansicht gezeigt, anterior ist links, dorsal oben. (F–H) Konfokalmikroskopische Aufnahmen je eines repräsentativen L3-Gehirns der F1-Generation der Kreuzungen *otp*-Sensor ((F) wildtypisch/(G) mit Mutation/(H) mit Deletion) und UAS-miR-252 mit *dpn*-Gal4. Die Gehirne befinden sich in Dorsalansicht, anterior ist oben. (D+I) Mittelwerte der Fluoreszenzintensität von GFP innerhalb der mit denselben Einstellungen konfokalmikroskopisch aufgenommenen und unbearbeiteten

L3-Imaginalscheiben (D) bzw. -Gehirne (I) der Filialgenerationen der verschiedenen Kreuzungen (n = 20 Imaginalscheiben bzw. Gehirne pro Kreuzung), ermittelt mithilfe von ImageJ und normiert auf die Kreuzung mit dem wildtypischen *otp*-Sensor-konstrukt. (E+J) Relativer Expressionsunterschied (RQ) der GFP-RNA in L3-Larven der verschiedenen Kreuzungen (n = 20 Larven der jeweiligen Filialgeneration pro Kreuzung), ermittelt durch qPCR und normiert auf die Kreuzung mit dem wildtypischen *otp*-Sensor-konstrukt.

#### 4.2.2 Analyse der Auswirkung eines miR-252 *Knockouts* auf die *Otp*-Expression

Um die Auswirkungen des Fehlens von miR-252 auf *otp in vivo* zu überprüfen, wurden Immunfluoreszenzfärbungen (s. 3.2.31) auf Embryonen sowie larvale und adulte Gehirne eines miR-252 *Knockout* (KO)-Stammes durchgeführt (Abb. 4.14 A'–F'). Dieser wurde durch *Genetargeting* hergestellt, wobei die genomische miR-252-Sequenz mittels homologer Rekombination entfernt wurde (Chen *et al.*, 2014). Die *Otp*-Immunfluoreszenzfärbungen auf den miR-252 KO-Stamm wurden mit analog gefärbten Wildtyp-Geweben verglichen (Abb. 4.14 A–F). *Otp* ist jeweils in Rot zu sehen, außerdem wurden, je nach Stadium, unterschiedliche Nervensystem-Marker in Grün gefärbt. Embryonen (Abb. 4.14 A–C und A'–C') wurden mit einem Marker für neurale Glykoproteine, Anti-HRP, co-gefärbt, larvale Gehirne (Abb. 4.14 D+E und D'+E') mit Anti-Nrt, das sekundäre Neurone markiert, und adulte Gehirne (Abb. 4.14 F+F') mit Anti-Brp, wodurch das Neuropil angefärbt wird. Da die synaptische Dichte innerhalb der Kompartimente des adulten Gehirns hoch und an Kompartimentgrenzen niedrig ist, sind die Kompartimente durch die Anti-Brp-Färbung gut darstellbar.

Die embryonalen wildtypischen bzw. miR-252 KO-Gehirne (Abb. 4.14 A+A') scheinen im Vergleich das gleiche, wildtypische *Otp*-Expressionsmuster aufzuweisen, bei dem pro Hemisphäre die drei *Otp*-Expressionsdomänen zu sehen sind (vgl. Abb. 4.1). Auch der Vergleich des anterioren Bereichs des embryonalen Nervensystems in lateraler (Abb. 4.14 B+B') und ventraler (Abb. 4.14 C+C') Ansicht bleibt unauffällig, und in der *Otp*-Expression ist kein Unterschied zu erkennen. Sowohl im WT-Embryo als auch im miR-252 KO-Embryo stoppt die *Otp*-Expression ab Segment A3. Auch in der larvalen Hemisphäre (Abb. 4.14 D+D') und im larvalen Hirnstamm (Abb. 4.14 E+E') scheint sich das Expressionsmuster zwischen WT und miR-252 KO zu gleichen. Einzig das adulte miR-252 KO-Gehirn (Abb. 4.14 F') zeigt im dorsalen Bereich einen Unterschied zu dem adulten WT-Gehirn (Abb. 4.14 F). Während im WT-Gehirn ein Muster dorsal des lateralen Horns (LH) und lateralen *superior* Protocerebrum (SLP) nachweisbar ist (Abb. 4.14 F, weiße Pfeile), bei dem es sich wahrscheinlich um die Lineage DPLI3 handelt (Volker Hartenstein, persönliche Mitteilung; Milyaev *et al.*, 2012), fehlt dieses Muster im miR-252 KO-Gehirn (Abb. 4.14 F', orangefarbene Pfeile).



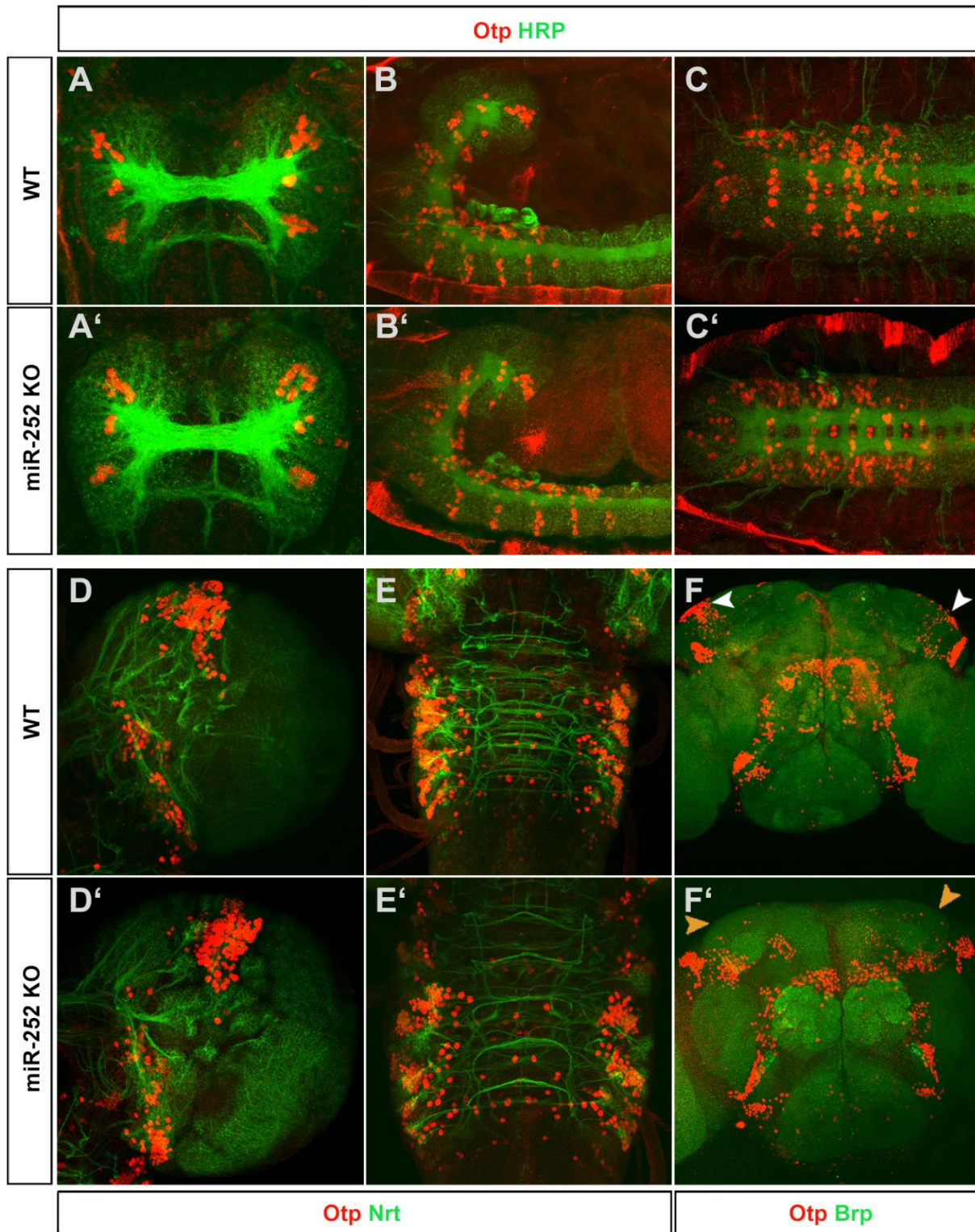


Abbildung 4.14: Otp-Immunfluoreszenzfärbung an *Drosophila*-Embryonen sowie larvalen und adulten *Drosophila*-Gehirnen des Wildtyps (WT) (A–F) und des Stammes miR-252 *Knockout* (KO) (A'–F'). Otp ist in Rot dargestellt. (A+A') Embryonales Gehirn (Stadium 15) in Dorsalansicht, anterior ist unten. Neurale Glykoproteine (anti-HRP) sind in Grün dargestellt. (B+B') Anteriorer Teil des embryonalen Nervensystems (Stadium 14) in Lateralansicht, anterior ist links. In Grün sind neurale Glykoproteine (anti-HRP) gefärbt. (C+C') Anteriorer Teil des embryonalen Nervensystems (Stadium 14) in Ventralansicht mit anti-HRP-Färbung in Grün, anterior ist links. (D+D') Hemisphäre eines larvalen Gehirns (L3) in Dorsalansicht mit Nrt-Färbung in Grün, anterior ist oben. (E+E') Anteriorer Teil des Hirnstammes eines larvalen Gehirns (L3) in Dorsalansicht, anterior ist oben. In Grün ist Nrt dargestellt. (F+F') Adultes Zentralgehirn in Anterioransicht mit Brp-Färbung in Grün, dorsal ist oben. Weiße Pfeile, Otp-positive Lineage DPLI3 im wildtypischen Gehirn; orangefarbene Pfeile, fehlende DPLI3-Lineage im miR-252 KO-Gehirn.

Zusammenfassend zeigen die Experimente, dass miR-252 über die vermutete Bindestelle mit der 3'UTR von *otp* interagiert, allerdings bleibt bei der Untersuchung der Embryonen des miR-252 KO-Stammes der vermutete Effekt einer *Otp*-Expression, die sich über das gesamte ventrale embryonale Nervensystem erstreckt, aus. Hier ist lediglich eine Veränderung der *Otp*-Expression im dorsalen Bereich des adulten Gehirns sichtbar.

### 4.3 Untersuchung der Expression und Regulation der Gene *Drosophila Retinal Homeobox (DRx)*, *homeobrain (hbn)* und *earmuff (erm)*

Die Transkriptionsfaktoren *Drosophila Retinal Homeobox (DRx)*, *Homeobrain (Hbn)* und *Earmuff (Erm)* sind, genau wie *Otp*, von großer Wichtigkeit für die Zellproliferation während der Gehirnentwicklung von *Drosophila melanogaster*. Aus diesem Grund ist es von Bedeutung, die Expression und Regulation solcher Gene zu analysieren, was beispielsweise durch die Herstellung verschiedener Gal4-Treiberstämme oder die Deletion regulatorischer Elemente möglich ist.

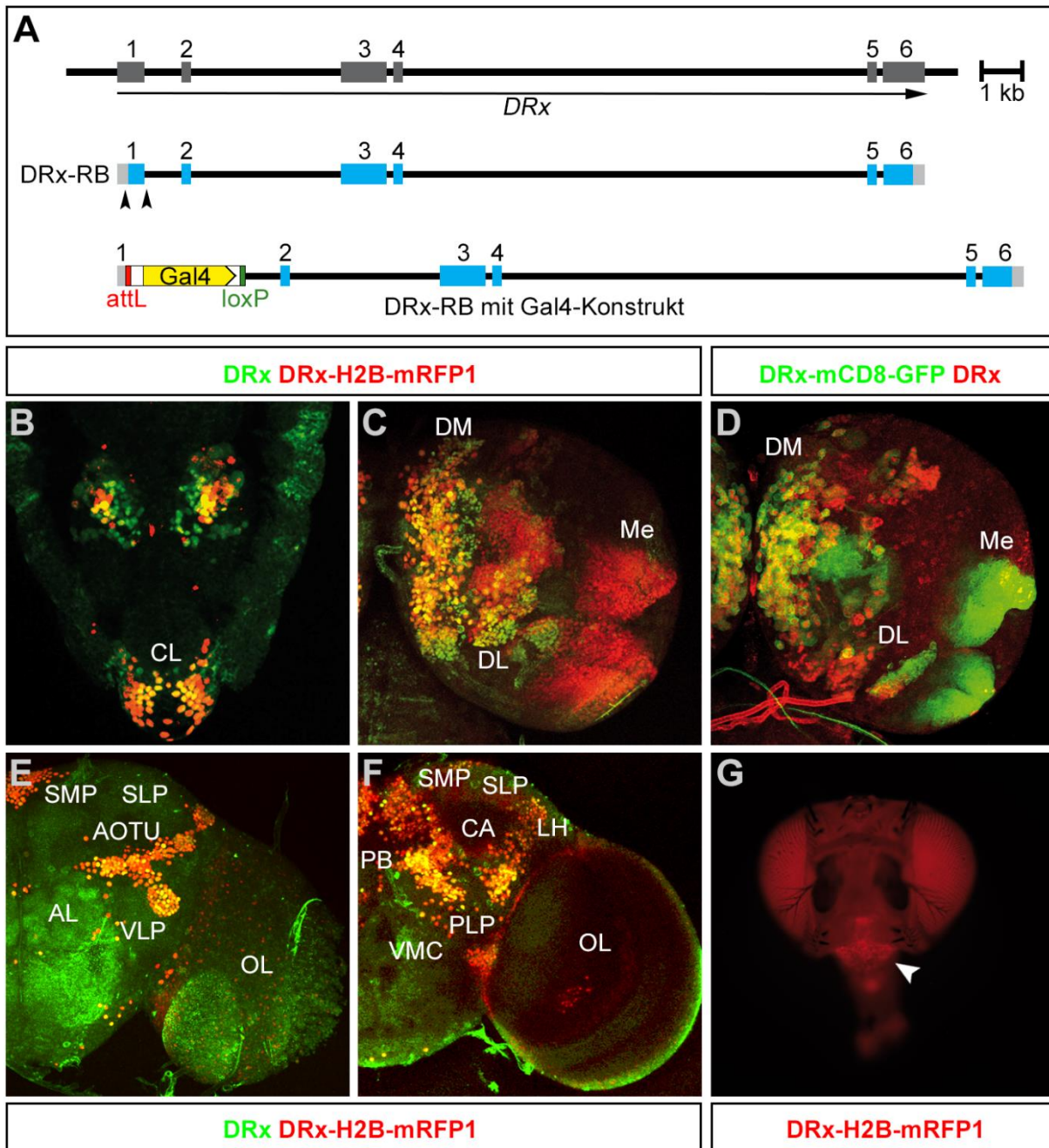
#### 4.3.1 Herstellung und Untersuchung von *DRx*-, *hbn*- und *erm*-Gal4-Treiberstämmen

Um transgene Fliegenstämme zu erhalten, mithilfe derer sich die nahezu kompletten Expressionsmuster von jeweils *DRx*, *hbn* oder *erm* darstellen lassen, wurden *Genetargeting*-Experimente durchgeführt, die zur Deletion der Bereiche um die Startcodons von *DRx*, *hbn* oder *erm* führten (Klöppel *et al.*, 2021; Bachelorarbeit Hartwig, 2014; Hildebrandt *et al.*, 2022b; Masterarbeit Minet, 2015; Hildebrandt *et al.*, 2021), um anschließend dort Gal4 zu integrieren. Im Falle des *DRx*- und des *erm*-*Genetargeting*-Stammes wurde die Keimbahntransformation von *w<sup>1118</sup>*-Fliegen und die Balancierung der transgenen Fliegen von der Firma BestGene (Chino Hills, Kalifornien, USA) ausgeführt, die anschließenden Kreuzungen zur Herstellung der resultierenden *Genetargeting*-Stämme wurden innerhalb der Arbeitsgruppe durchgeführt. Der *hbn*-*Genetargeting*-Stamm wurde gänzlich in der Arbeitsgruppe hergestellt. Anschließend war es innerhalb der Arbeitsgruppe durch die über den verwendeten *Genetargeting*-Vektor pTV[cherry] (Baena-Lopez *et al.*, 2013) (s. Abb. 2.3) an dieser Stelle eingefügte attP-Site möglich, eine Gal4-Sequenz mithilfe des Vektors RIV<sup>Gal4</sup> (Baena-Lopez *et al.*, 2013) über eine PhiC31-vermittelte Transformation innerhalb der Deletion einzufügen (s. 3.2.26). Idealerweise sollten mithilfe des UAS/Gal4-Systems und der resultierenden Stämme anschließend alle Enhancer des jeweiligen Gens Gal4 aktivieren, sodass die Stämme in Zukunft für Überexpressions-, Herunterregulations- oder Rettungsexperimente verwendet werden können.

*DRx* umfasst einen genomischen Bereich von ca. 20 kb, aus dem das Transkript DRx-RB, bestehend aus 6 Exons, abgelesen wird (Abb. 4.15 A). Der *DRx-Genetargeting*-Stamm enthält eine 394 bp große Deletion, die 10 bp *upstream* des ATGs beginnt und die Donor-*Splicesite* des folgenden Introns noch mit in die Deletion einschließt (Abb. 4.15 A, schwarze Pfeile). Somit umfasst die Deletion die ersten 123 AS von *DRx* (Klöppel *et al.*, 2021). Trotz der Deletion des ATGs und entgegen der Erwartungen stellte sich der *DRx-Genetargeting*-Stamm ( $DRx^{GT}$ ) als nicht letal heraus und zeigte eine nahezu wildtypische Expression (nicht gezeigt, Klöppel *et al.*, 2021). Möglicherweise wird hier auf ein *downstream* zum eigentlich verwendeten ATG liegendes zweites ATG zurückgegriffen, das zu einem DRx-Protein mit verkürztem N-Terminus führt, aber dennoch funktionell sein könnte. Aufgrund dieser Tatsache wird der nach der Reintegration von Gal4 (s. 3.2.26) innerhalb der Deletion entstandene Treiberstamm als  $DRx^{Gal4}$  und nicht als  $DRx^{KOGal4}$  bezeichnet.

Dieser Stamm mit einem Konstrukt aus einer attL-*Site*, dem Gal4-Gen und einer loxP-*Site* (Abb. 4.15 A) wurde anschließend verwendet, um die Gal4-Expression mit dem kernlokalisierten Reporter H2B-mRFP1 bzw. dem membrangebundenen Reporter mCD8-GFP im Embryo, der Larve und im Adultstadium zu visualisieren und Co-Lokalisationen mit DRx zu überprüfen (Abb. 4.15 B–G). Im Embryo ist eine Co-Expression von DRx und H2B-mRFP1 in den Gehirnhemisphären und in der clypeolabralen Region (CL), aus der Clypeus und Labrum entstehen, zu beobachten (Abb. 4.15 B). Einige Zellen exprimieren in diesem Embryonalstadium entweder nur DRx oder das Reporterprotein, was darauf zurückzuführen sein könnte, dass eine zeitliche Verzögerung der RFP-Expression verglichen zur DRx-Expression vorliegt. Hierbei könnte das DRx-Protein wieder abgebaut werden, während RFP fortbesteht, ein Effekt, der oft bei Reporterexperimenten zu beobachten ist. Im larvalen Gehirn tritt eine starke Co-Expression von DRx und Reporterprotein in den dorsomedialen (DM) und dorsolateralen (DL) Lineages auf, während die Medulla deutlich mehr Reporterprotein als DRx aufweist (Abb. 4.15 C und D).

Im adulten Gehirn ist eine Co-Expression in allen Regionen, in denen DRx exprimiert wird, zu beobachten (Abb. 4.15 E und F), außer in der Region der protocerebralen Brücke (PB) im posterioren Bereich des Gehirns (Abb. 4.15 F). Hier exprimieren deutlich mehr Zellen das Reporterprotein. In der lebenden Fliege ist die RFP-Reporterexpression im Clypeus ersichtlich (Abb. 4.15 G, weißer Pfeil), der die Verbindung des Labrums, dem Mundbereich, zum Kopf darstellt. Für die Entwicklung dieser Struktur ist DRx von großer Bedeutung, da der Clypeus in *DRx*-Mutanten fehlt (Davis *et al.*, 2003). Somit gleicht das mithilfe des Stammes  $DRx^{Gal4}$  hervorgerufene Expressionsmuster der wildtypischen DRx-Expression in allen Entwicklungsstadien.



**Abbildung 4.15: Untersuchung des neu hergestellten Treiberstammes DRx<sup>Gal4</sup> mithilfe von H2B-mRFP1- bzw. mCD8-GFP-Reporterexpressionen.** (A) Genomische Region von *DRx* sowie das Transkript DRx-RB mit der *Genetargeting*-Deletionsregion (schwarze Pfeile) und der Lokalisation von Gal4 (gelb) nach der Gal4-Reintegration innerhalb der Deletion des *Genetargeting*-Stammes. Exons sind als Kästchen gezeigt, translatierte Bereiche in Blau. Das Gal4-Konstrukt besteht nach der Reintegration aus der *attL*-Site (rot), dem Gal4-Gen (gelb) und einer *loxP*-Site (grün). (B) H2B-mRFP1-Expression in Rot mit DRx-Immunfluoreszenzfärbung in Grün im anterioren Bereich des Embryos in Dorsalansicht, anterior ist unten. CL, clypeolabrale Region. (C und D) H2B-mRFP1-Expression in Rot mit DRx-Immunfluoreszenzfärbung in Grün (C) bzw. mCD8-GFP-Expression in Grün mit DRx-Immunfluoreszenzfärbung in Rot (D) in einer rechten larvalen Gehirnhemisphäre in Dorsalansicht, anterior ist oben. DL, dorsolaterale Lineages; DM, dorsomediale Lineages; Me, Medulla. (E und F) H2B-mRFP1-Expression in Rot mit DRx-Immunfluoreszenzfärbung in Grün im anterioren (E) und posterioren (F) Bereich der linken Hälfte eines adulten Gehirns, dorsal ist oben. AL, antennale Lobe; AOTU, anteriores optisches *Tubercle*; CA, Calyx; LH, laterales Horn; OL, optische Lobe; PB, protocerebrale Brücke; PLP, posterolaterales Protocerebrum; SLP, laterales superior Protocerebrum; SMP, mediales superior Protocerebrum; VLP, ventrolaterales Protocerebrum; VMC, ventromediales Cerebrum. (G) H2B-mRFP1-Expression im Clypeus (weißer Pfeil) einer adulten Fliege in Anterioransicht, dorsal ist oben.

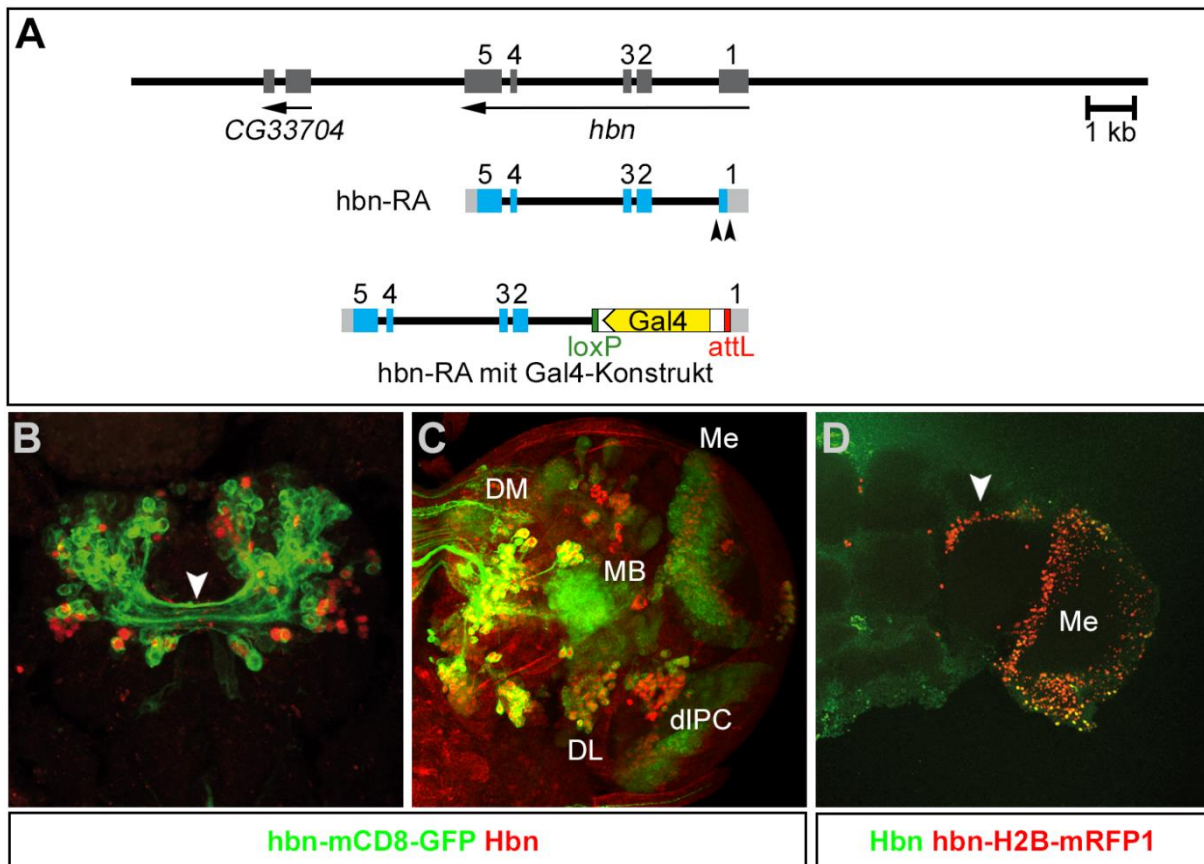
Das Gen *hbn* umfasst einen genomischen Bereich von etwa 6 kb und besteht aus 5 Exons (Abb. 4.16 A). Bislang stellt das Transkript *hbn*-RA die einzige bekannte Transkriptvariante von *hbn* dar (Abb. 4.16 A) (Flybase FB2022\_04). Die durch *Genetargeting* hervorgerufene Deletion beginnt 13 bp *upstream* des ATGs und endet im folgenden Intron, um die *Donor-Splicesite* mit einzuschließen. Sie umfasst 171 bp, was in einer Deletion der ersten 51 AS von Hbn resultiert (Abb. 4.16 A, schwarze Pfeile) (Bachelorarbeit Hartwig, 2014; Hildebrandt et al., 2022b).

Der nach der Reintegration von Gal4 (s. 3.2.26) in diesen *Genetargeting*-Stamm entstandene Treiberstamm *hbn*<sup>KOGal4</sup> besitzt ein Konstrukt aus einer attL-Site, dem Gal4-Gen und einer loxP-Site innerhalb der Deletion (Abb. 4.16 A) und wurde anschließend zur Überprüfung der Gal4-Expression im embryonalen, larvalen und adulten Gehirn verwendet (Abb. 4.16 B–D). Hierbei dienten das membrangebundene Reporterprotein mCD8-GFP und das kernlokalisierte Reporterprotein H2B-mRFP1 der Visualisierung.

Im embryonalen Gehirn ist größtenteils eine Co-Expression des GFP-Reporters und Hbn zu beobachten (Abb. 4.16 B). Aufgrund des membrangebundenen GFPs sind die primären Axontrakte der Hbn-positiven Zellen zu sehen, die auch Axontrakte umfassen, die die supraoesophageale Gehirnkommisur (SEK) bilden (Abb. 4.16 B, weißer Pfeil). Für die Bildung dieser Struktur ist die Hbn-Expression essentiell (Kolb et al., 2021).

In der larvalen Gehirnhemisphäre ist mCD8-GFP in den DM und DL Lineages, im *Mushroom Body* (MB), dem dorsalen inneren Proliferationszentrum (dIPC) und der Medulla (Me) zu beobachten, wobei zum Großteil eine Co-Expression mit Hbn vorliegt (Abb. 4.16 C). Lediglich in der Medulla wird GFP offensichtlich stärker exprimiert als Hbn, was vermutlich auf einem längeren Fortbestehen der Reporterexpression im Vergleich zur Hbn-Expression basiert (Abb. 4.16 C).

Im adulten Gehirn zeigt sich eine Co-Expression von Hbn und H2B-mRFP1 in der Medulla (Me) und einer benachbarten Region im Zentralgehirn (Abb. 4.16 D, weißer Pfeil). Augenscheinlich stellt der neu hergestellte Treiberstamm *hbn*<sup>KOGal4</sup> das gesamte Hbn-Expressionsmuster über alle Entwicklungsstadien hinweg dar. Eine Analyse der *hbn*-Expression im homozygoten, *hbn*-mutanten Hintergrund ist aufgrund der embryonalen Letalität des Stammes *hbn*<sup>KOGal4</sup> nur im Embryonalstadium möglich.

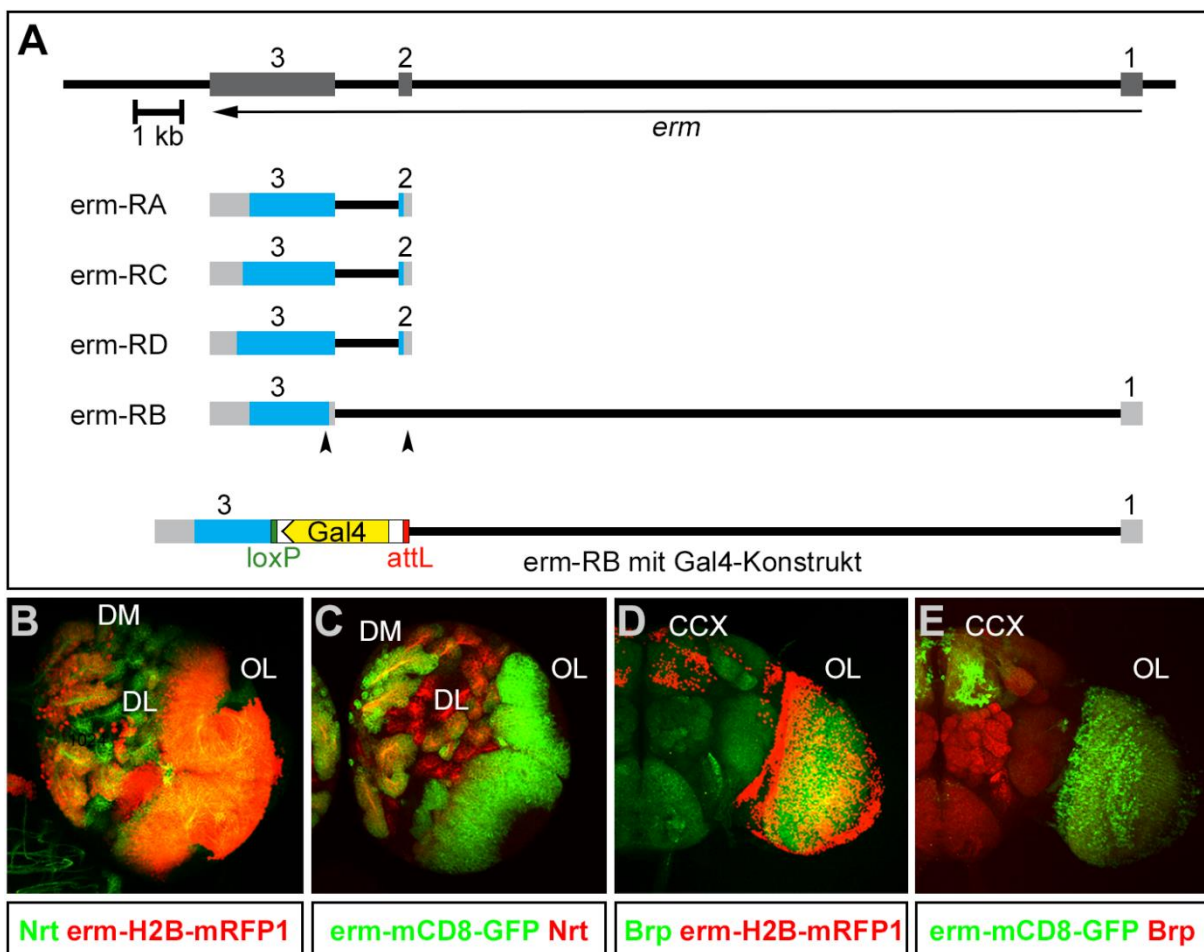


**Abbildung 4.16: Untersuchung des neu hergestellten Treiberstammes  $hbn^{KOGal4}$  mithilfe von H2B-mRFP1- bzw. mCD8-GFP-Reporterexpressionen.** (A) Genomische Region von *hbn* mit dem benachbarten Gen *CG33704* sowie das Transkript *hbn-RA* mit Lokalisation der *Genetargeting*-Deletionsregion (schwarze Pfeile) und Position von Gal4 (gelb) nach der Gal4-Reintegration innerhalb der Deletion des *Genetargeting*-Stammes. Die Exons sind als Kästchen dargestellt, translatierte Bereiche in Blau. Das Gal4-Konstrukt besteht nach abgeschlossener Reintegration aus der *attL*-Site (rot), dem Gal4-Gen (gelb) und einer *loxP*-Site (grün). (B und C) MCD8-GFP-Expression in Grün mit Hbn-Immunfluoreszenzfärbung in Rot im embryonalen Gehirn in Dorsalansicht, anterior ist unten (B), und in einer rechten larvalen Hemisphäre in Dorsalansicht, anterior ist oben (C). Der weiße Pfeil zeigt auf Axone der supraoesophagealen Kommissur (SEK), die die Gehirnhemisphären verbindet. dIPC, dorsales inneres Proliferationszentrum; DL, dorsolaterale Lineages; DM, dorsomediale Lineages; MB, *Mushroom Body*; Me, Medulla. (D) H2B-mRFP1-Expression in Rot mit Hbn-Immunfluoreszenzfärbung in Grün in der linken Hälfte des adulten Gehirns in Anterioransicht, dorsal ist oben. Der weiße Pfeil zeigt auf den Hbn-exprimierenden Bereich im Zentralgehirn, benachbart zur optischen Lobe. Me, Medulla.

*Erm* umfasst drei Exons innerhalb einer genomischen Region von etwa 20 kb. Es sind vier Transkriptvarianten bekannt, aus denen vier Proteinformen, die in den N- und C-Termini variieren, translatiert werden (Flybase FB2022\_04). Dabei wird für die Transkriptvarianten *erm-RA*, *erm-RC* und *erm-RD* das Start-Codon in Exon 2 verwendet, während für die Transkriptvariante *erm-RB* auf das ATG in Exon 3 zurückgegriffen wird (Abb. 4.17 A). Die durch *Genetargeting* in *erm* eingebrachte Deletion umfasst 1507 bp und startet 9 bp *upstream* des ATGs in Exon 2, beinhaltet aber auch das Intron zwischen den Exons 2 und 3 sowie das ATG in Exon 3, um beide Startcodons zu deletieren (Abb. 4.17 A, schwarze Pfeile) (Masterarbeit Minet, 2015; Hildebrandt et al., 2021). Nach der Reintegration von Gal4 (s. 3.2.26) liegt ein Konstrukt aus einer *attL*-Site, einem Gal4-Gen und einer *loxP*-Site in der Deletion lokalisiert vor (Abb. 4.17 A). Der dadurch entstehende  $erm^{KOGal4}$ -

Treiberstamm wurde anschließend verwendet, um die Gal4-Expression in Gehirnen verschiedener Entwicklungsstadien zu visualisieren (Abb. 4.17 B–E).

Im Embryo zeigt die Reportereexpression ein Muster analog zur mRNA-Expression (Pfeiffer *et al.*, 2008; Hildebrandt *et al.*, 2021) (nicht gezeigt). In der larvalen Gehirnhemisphäre ist sowohl die kernlokalisierte H2B-mRFP1- (Abb. 4.17 B) als auch die membrangebundene mCD8-GFP-Expression (Abb. 4.17 C) großflächig innerhalb der optischen Lobe (OL) und in den Typ II DM und DL Lineages zu beobachten. Im adulten Gehirn zeigen sich beide Reporter mit einem Expressionsmuster in den OL und im Zentralkomplex (CCX) (Abb. 4.17 D und E). Der neu hergestellte Treiberstamm *erm*<sup>KOGal4</sup> stellt somit die Expression von *erm* in allen Entwicklungsstadien dar.



**Abbildung 4.17: Untersuchung des neu hergestellten Treiberstammes *erm*<sup>KOGal4</sup> mithilfe von H2B-mRFP1- bzw. mCD8-GFP-Reporterexpressionen.** (A) Genomische Region von *erm* sowie die Transkriptvarianten *erm*-RA, *erm*-RC, *erm*-RD und *erm*-RB mit der *Genetargeting*-Deletionsregion (schwarze Pfeile) und der Lokalisation von Gal4 (gelb) nach der Gal4-Reintegration innerhalb der Deletion des *Genetargeting*-Stammes, hier exemplarisch gezeigt für das Transkript *erm*-RB. Die Kästchen stellen Exons dar, translatierte Bereiche sind in Blau gezeigt. Das Gal4-Konstrukt besteht nach der Reintegration aus der *attL*-Site (rot), dem Gal4-Gen (gelb) und einer *loxP*-Site (grün). (B und C) H2B-mRFP1-Expression in Rot mit Nrt-Immunfluoreszenzfärbung in Grün (B) bzw. mCD8-GFP-Expression in Grün mit Nrt-Immunfluoreszenzfärbung in Rot (C) in einer rechten larvalen Gehirnhemisphäre in Dorsalansicht, anterior ist oben. DL, dorsolaterale Lineages; DM, dorsomediale Lineages; OL, optische Lobe. (D und E) H2B-mRFP1-Expression in Rot mit Brp-Immunfluoreszenzfärbung in Grün (D) bzw. mCD8-GFP-Expression in Grün mit Brp-Immunfluoreszenzfärbung in Rot (E) in der linken Hälfte eines adulten Gehirns in Anterioransicht, dorsal ist oben. CCX, Zentralkomplex; OL, optische Lobe.

### 4.3.2 Analyse spezifischer *DRx*-, *hbn*- und *erm*-Enhancer

Die Enhancer, die sich in der vorher durchgeführten Enhancer-Analyse als verantwortlich für den Großteil der Expressionsmuster von *DRx*, *hbn* und *erm* herausstellten, wurden mithilfe von *Genetargeting* über homologe Rekombination deletiert, um sie weiter funktionell zu untersuchen (Bachelorarbeit Bley, 2017; Bachelorarbeit Fürst, 2019; Klöppel *et al.*, 2021; Bachelorarbeit Federspiel, 2016; Bachelorarbeit Wittling, 2017; Bachelorarbeit Findji, 2018; Hildebrandt *et al.*, 2022b; Bachelorarbeit Kübel, 2019; Hildebrandt *et al.*, 2021). Die Durchführung der Keimbahntransformation von *w<sup>1118</sup>*-Fliegen und die Blancierung der transgenen Fliegen wurde hierbei von der Firma BestGene (Chino Hills, Kalifornien, USA) ausgeführt. Nach den Kreuzungen zur Herstellung der resultierenden Enhancer-*Genetargeting*-Stämme in der Arbeitsgruppe wurden innerhalb dieser Arbeit die unterschiedlichen Entwicklungsstadien der *Genetargeting*-Stämme in Immunfluoreszenzfärbungen (s. 3.2.31) auf die Effekte der jeweiligen Deletion auf die Genexpression untersucht, was Rückschlüsse auf die Funktion der Enhancer ermöglicht.

Die Enhancer 77F09, 77F06 und 77F11, die im größten Intron von *DRx* nebeneinander und überlappend lokalisiert sind, sind für die prominentesten Expressionsmuster von *DRx* im embryonalen Gehirn sowie in den DM und DL Lineages und der Lobula im larvalen Gehirn verantwortlich (Klöppel *et al.*, 2021). Aus diesem Grund wurden *Genetargeting*-Stämme mit Deletionen jeweils eines dieser drei Enhancer erzeugt (Abb. 4.18 A) (Bachelorarbeit Bley, 2017; Bachelorarbeit Fürst, 2019; Klöppel *et al.*, 2021) und mithilfe von Immunfluoreszenzfärbungen auf Abweichungen der *DRx*-Expression im Vergleich zum Wildtyp untersucht (Abb. 4.18 B–H'). Die *Genetargeting*-Stämme 77F06<sup>KO</sup> und 77F11<sup>KO</sup> stellten sich als nicht letal heraus, sodass verschiedene Entwicklungsstadien untersucht werden konnten.

Der Stamm 77F09<sup>KO</sup> allerdings wies embryonale Letalität auf, deren Ursache auf einer Mutation innerhalb eines anderen, offensichtlich essentiellen Gens basiert. Die Mutation wurde vermutlich versehentlich durch die zufällige Integration des Vektorkonstrukts zu Beginn des *Genetargeting*-Experiments eingefügt, das zunächst ungerichtet und zufällig an eine Stelle im Genom transponiert, bevor ein Teil des Konstrukts aufgrund der Homologiearme homolog in die vorhergesehene Stelle rekombiniert wird. Ein Rest des ursprünglichen Vektorkonstrukts bleibt allerdings in der zufälligen Position der initialen Integration lokalisiert und kann zu Letalität führen, wenn die zufällige Position essentiell für das Überleben des Organismus ist. Somit sollte zur Durchführung der homologen Rekombination stets auf einen nicht letalen Transformantenstamm zurückgegriffen werden, was bei der Herstellung von 77F09<sup>KO</sup> nicht beachtet wurde. Damit stellt die embryonale Letalität dieses

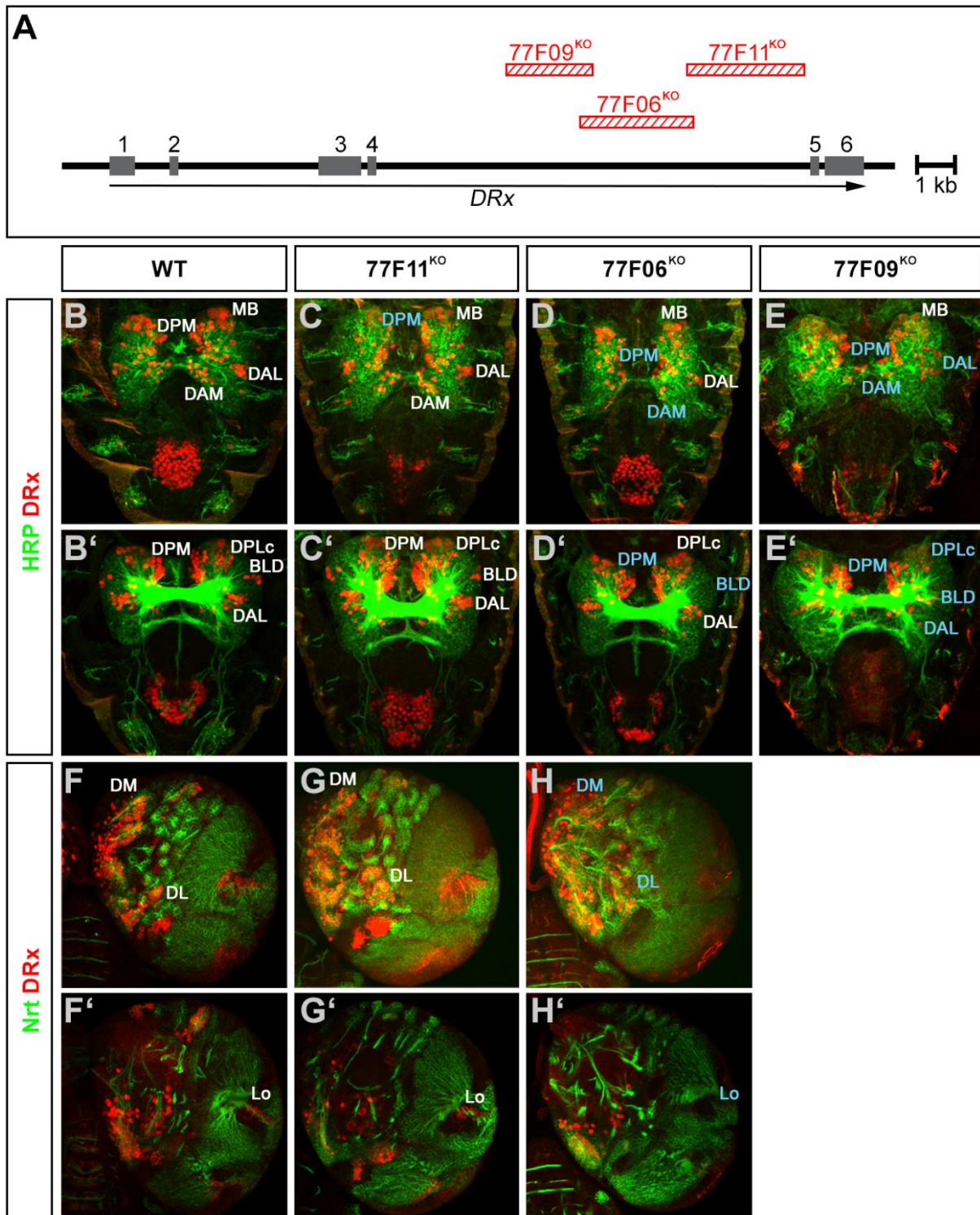


Stammes einen Positionseffekt dar. Aus diesem Grund konnten im Falle der Deletion des *DRx*-Enhancers 77F09 lediglich Embryonen untersucht werden.

Für alle drei Stämme wurde das *DRx*-Expressionsmuster im Embryo in einer mehr dorsalen Ebene (Abb. 4.18 B–E) sowie in einer mehr ventralen Ebene auf Höhe der supraoesophagealen Kommissur (SEK) (Abb. 4.18 B'–E') untersucht. Im larvalen Gehirn wurde eine Ebene gewählt, die die Region der Typ II DM und DL Lineages fokussiert (Abb. 4.18 F–H), sowie eine Ebene, in der die Lobula gut zu sehen ist (Abb. 4.18 F'–H'). Sowohl Embryonen (Abb. 4.18 C und C') als auch die larvalen Gehirnhemisphären (Abb. 4.18 G und G') des Stammes 77F11<sup>KO</sup> zeigen größtenteils ein vergleichbares *DRx*-Expressionsmuster zum Wildtyp (Abb. 4.18 B und B' bzw. F und F'). Lediglich im Embryo ist eine geringe Reduktion der Expression in einer als DPM (dorso posterior medial) bezeichneten Zentralregion des Gehirns in der Nähe der MB-Region zu erkennen (Abb. 4.18 C, hellblaue Beschriftung).

Im Vergleich hierzu zeigt der Stamm 77F06<sup>KO</sup> deutlichere Reduktionen der *DRx*-Expression, die in der DAM (dorso anterior medialen)-Region, die mit der supraoesophagealen Kommissur assoziiert ist, der medial gelegenen DPM-Region und der lateral gelegenen BLD (basal lateral dorsalen)-Region lokalisiert sind (Abb. 4.18 D und D', hellblaue Beschriftung). In der larvalen Hemisphäre sind weniger *DRx*-positive Zellen in den DM und DL Lineages zu beobachten und die Lineages wirken desorganisiert (Abb. 4.18 H, hellblaue Beschriftung). Zudem ist keine *DRx*-Expression in der Lobula zu sehen (Abb. 4.18 H', hellblaue Beschriftung).

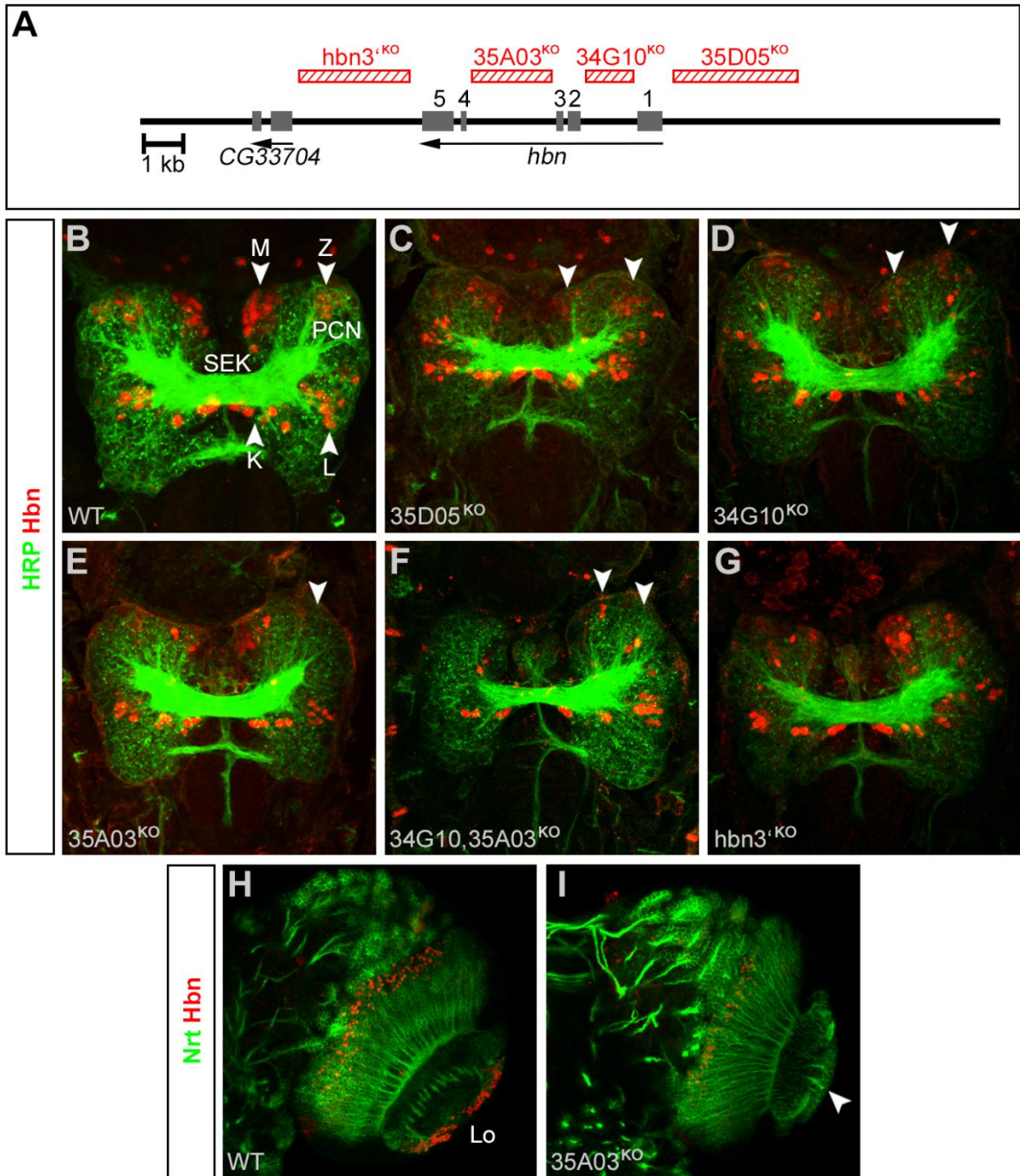
Homozygote Embryonen des *Genetargeting*-Stammes 77F09<sup>KO</sup> zeigen keine *DRx*-Expression in der BLD Domäne und eine mehr oder weniger reduzierte *DRx*-Expression in allen anderen Domänen außer der MB-Region (Abb. 4.18 E und E', hellblaue Beschriftung). Die Stämme 77F06<sup>KO</sup> und 77F09<sup>KO</sup> zeigen also ähnliche Effekte im embryonalen Gehirn. Da die Deletionen dieser Stämme teilweise überlappen (Abb. 4.18 A), könnten diese Effekte der überlappenden Region zugeordnet werden.



**Abbildung 4.18: Untersuchung der mittels *Genetargeting* generierten *DRx*-Enhancer-Deletionsstämme 77F11<sup>KO</sup>, 77F06<sup>KO</sup> und 77F09<sup>KO</sup> durch Immunfluoreszenzfärbung. (A)** Genomische Region von *DRx* mit Position der jeweiligen Deletion der einzelnen Stämme in Rot. Exons sind als Kästchen dargestellt. **(B–E)** HRP (grün)- und DRx (rot)-Immunfluoreszenzfärbung des anterioren Bereichs von Embryonen des Wildtyps (WT) **(B und B')** sowie der *Genetargeting*-Stämme 77F11<sup>KO</sup> **(C und C')**, 77F06<sup>KO</sup> **(D und D')** und 77F09<sup>KO</sup> **(E und E')** jeweils in einer dorsalen Ebene **(B–E)** sowie in einer ventralen Ebene, die die supraoesophageale Gehirnkommisur (SEK) zeigt **(B'–E')**. Bereiche mit reduzierter DRx-Expression sind in Hellblau beschriftet. BLD, basal lateral dorsal; DAL, dorso anterior lateral; DAM, dorso anterior medial; DPLc, dorso posterior lateral (zentral); DPM, dorso posterior medial; MB, *Mushroom Body*. **(F–H')** Rechte larvale Hemisphäre des Wildtyps (WT) **(F und F')** sowie der *DRx*-Enhancer-Deletionsstämme 77F11<sup>KO</sup> **(G und G')** und 77F06<sup>KO</sup> **(H und H')** mit Nrt (grün)- und DRx (rot)-Immunfluoreszenzfärbung in einer Ebene, die die Region der Typ II Lineages zeigt **(F–H)**, sowie einer Ebene, die die Lobula fokussiert **(F'–H')**. Bereiche mit reduzierter DRx-Expression sind in Hellblau beschriftet. DL, dorsolaterale Lineages; DM, dorsomediale Lineages; Lo, Lobula.

Die Enhancer 35D05, 34G10 und 35A03 sowie die *hbn* 3' Enhancer-Region sind für die größten Teile des Hbn-Expressionsmusters verantwortlich. Sie führen zu einer Hbn-Expression in spezifischen Regionen des embryonalen Gehirns, wie beispielsweise der MB-Region und der supraoesophagealen Gehirnkommisur, sowie einer Hbn-Expression in den Typ II Lineages, der Medulla und der Lobula im larvalen Gehirn (Hildebrandt *et al.*, 2022b). Aus diesem Grund wurden *Genetargeting*-Stämme mit Deletionen der einzelnen Enhancer und ein *Genetargeting*-Stamm mit kombinierter Deletion der beiden Enhancer 34G10 und 35A03 erstellt (Abb. 4.19 A) (Bachelorarbeit Federspiel, 2016; Bachelorarbeit Wittling, 2017; Bachelorarbeit Findji, 2018; Hildebrandt *et al.*, 2022b). Zur Herstellung des Stammes 34G10,35A03<sup>KO</sup> mussten im Anschluss an die durch das *Genetargeting* hervorgerufene Deletion die zwischen den beiden Enhancern lokalisierten Exon-Sequenzen in die Deletion reintegriert werden, um eine Deletion beider Enhancer, aber ein funktionelles Hbn-Protein zu ermöglichen (s. 3.2.18).

Mithilfe von Immunfluoreszenzfärbungen wurden alle Enhancer-Deletionsstämme auf Abweichungen der Hbn-Expression im Vergleich zum Wildtyp untersucht (Abb. 4.19 B–I). Hierzu wurde im Embryo eine Gehirnebene gewählt, in der die supraoesophageale Gehirnkommisur (SEK) und die protocerebralen Konnektive (PCN) zu sehen sind (Abb. 4.19 B–G). Das wildtypische embryonale Gehirn zeigt auf dieser Ebene eine Hbn-Expression in einer medialen (M) und einer zentralen Domäne (Z) sowie in einer lateralen Region (L) und direkt assoziiert mit der Kommissur (K) (Abb. 4.19 B). Alle *Genetargeting*-Stämme weisen eine deutlich dünnere Kommissur als der Wildtyp auf und die PCN scheinen reduziert (Abb. 4.19 C–G), was typische *hbn*-Mutantenphänotypen darstellt (Kolb *et al.*, 2021). Im embryonalen Gehirn des Stammes 35D05<sup>KO</sup> ist eine Reduktion in den medialen und zentralen Regionen zu beobachten (Abb. 4.19 C, weiße Pfeile), in denen der Enhancer 35D05 die Hbn-Expression aktiviert, und die Gehirnhemisphären wirken etwas kleiner. Der Stamm 34G10<sup>KO</sup> weist eine reduzierte Hbn-Expression in den medialen und zentralen Gehirnregionen des embryonalen Gehirns auf und dem Stamm 35A03<sup>KO</sup> fehlt die Hbn-Expression in der zentralen Domäne (Abb. 4.19 D und E, weiße Pfeile). Im Kombinationsstamm 34G10,35A03<sup>KO</sup> mit Deletionen der beiden Enhancer 34G10 und 35A03 ist nahezu keine Hbn-Expression in den medialen und zentralen Gehirnregionen zu beobachten (Abb. 4.19 F, weiße Pfeile) sowie die stärkste Reduktion der supraoesophagealen Kommissur der betrachteten Enhancer-*Genetargeting*-Stämme. Dagegen weisen die embryonalen *hbn*3<sup>KO</sup>-Gehirne nur eine geringfügige Reduktion der Hbn-Expression auf (Abb. 4.19 G). Innerhalb dieses Experiments stellte sich der *Genetargeting*-Stamm 35A03<sup>KO</sup> als einziger Stamm dar, der eine offensichtliche Abweichung des Hbn-Expressionsmusters in der larvalen Gehirnhemisphäre zeigte. Der Enhancer 35A03 steuert die Expression von Hbn in der Lobula (Abb. 4.19 H), und diese Expression fehlt im larvalen Gehirn des Stammes 35A03<sup>KO</sup> (Abb. 4.19 I, weißer Pfeil).



**Abbildung 4.19: Untersuchung der *hbn*-Enhancer-Genetargeting-Stämme  $35D05^{KO}$ ,  $34G10^{KO}$ ,  $35A03^{KO}$ ,  $34G10,35A03^{KO}$  und  $hbn3^{KO}$  mit Deletion des jeweiligen Enhancers bzw. im Falle von  $34G10,35A03^{KO}$  der jeweiligen Enhancer mittels Immunfluoreszenzfärbungen. (A) Genomische Region von *hbn* und des benachbarten Gens *CG33704* mit Lokalisation der jeweiligen Deletion der einzelnen Stämme in Rot. Exons sind als Kästchen gezeigt. (B–G) HRP (grün)- und Hbn (rot)-Immunfluoreszenzfärbungen der embryonalen Gehirne des Wildtyps (WT) (B) sowie der *Genetargeting*-Stämme  $35D05^{KO}$  (C),  $34G10^{KO}$  (D),  $35A03^{KO}$  (E),  $34G10,35A03^{KO}$  (F) und  $hbn3^{KO}$  (G). (B) Die weißen Pfeile zeigen auf die Hbn-Expressionsdomänen im medialen (M), zentralen (Z) und lateralen (L) Bereich sowie direkt assoziiert mit der Kommissur (K). PCN, protocerebrale Konnektive; SEK, supraoesophageale Kommissur. (C–F) Die weißen Pfeile zeigen auf Bereiche mit reduzierter Hbn-Expression. (H, I) Rechte, larvale Gehirnhemisphären des Wildtyps (H) und des *hbn*-Enhancer-Deletionsstammes  $35A03^{KO}$  (I) mit Nrt (grün)- und Hbn (rot)-Immunfluoreszenzfärbung. Der weiße Pfeil zeigt auf die reduzierte Hbn-Expression in der Lobula (Lo).**

Für die Erm-Expression sind die Enhancer R9D10 und R9D11 von spezieller Bedeutung, da sie besonders wichtig für die Expression in den larvalen INPs sind (Pfeiffer *et al.*, 2008; Janssens *et al.*, 2017) und die Bindestellen des bHLH-O Proteins Deadpan (Dpn) und der Enhancer of split (E(spl))-Proteine beinhalten, die in Neuroblasten die *erm*-Expression unterbinden (Abb. 4.20 A, gelbe Kreise) (Li *et al.*, 2017). In einer vorhergehenden Untersuchung zeigte neben R9D10 und R9D11 auch der Enhancerbereich R9D08 eine Beteiligung an den größten Teilen des Erm-Expressionsmusters, sodass *Genetargeting*-Stämme mit Deletionen von jeweils einem dieser drei Enhancer hergestellt wurden (Abb. 4.20 A) (Bachelorarbeit Kübel, 2019; Hildebrandt *et al.*, 2021). Des Weiteren wurde ein zusätzlicher *Genetargeting*-Stamm mit einer Deletion des 3'-Bereichs von R9D11 generiert, um nur die Region der Bindestellen der Proteine, die Erm regulieren, zu deletieren (Abb. 4.20 A, R9D11S<sup>KO</sup>) (Hildebrandt *et al.*, 2021). R9D08<sup>KO</sup> zeigte sich als nicht letal und R9D10<sup>KO</sup> stellte sich als größtenteils larval letal mit einigen wenigen überlebenden *Escaper*-Fliegen heraus, während R9D11<sup>KO</sup> und R9D11S<sup>KO</sup> larvale Letalität aufwiesen. Da kein im larvalen Gehirn funktionierender Erm-Antikörper zur Verfügung stand, wurden die larvalen Gehirne der *erm*-Enhancer-*Genetargeting*-Stämme mit Nrt, das sekundäre Neurone nachweist, und DRx, das in den Typ II Lineages (Kraft *et al.*, 2016; Klöppel *et al.*, 2021) sowie den optischen Loben (Erclik *et al.*, 2017) exprimiert wird, immunfluoreszent angefärbt (Abb. 4.19 C–F) und mit einem wildtypischen Gehirn verglichen (Abb. 4.20 B).

Die larvale Gehirnhemisphäre des Stammes R9D08<sup>KO</sup> zeigt keinen offensichtlichen Unterschied zum wildtypischen Gehirn (Abb. 4.20 C). Lediglich die Lineages scheinen etwas desorganisiert und die DRx-Expression im Bereich der MBs fehlt (Abb. 4.20 C, weißer Pfeil). Larvale R9D10<sup>KO</sup>-Gehirne weisen eine vergrößerte Hemisphäre mit einer Zunahme an Lineages und eine extrem verstärkte DRx-Expression, auch innerhalb der optischen Lobe, auf (Abb. 4.20 D). Auch für die *Genetargeting*-Stämme R9D11<sup>KO</sup> und R9D11S<sup>KO</sup> sind stark vergrößerte larvale Gehirnhemisphären mit deutlich desorganisierten Lineages und verstärkter DRx-Expression zu beobachten (Abb. 4.20 E und F). Die Vergrößerung der larvalen Hemisphären der Stämme R9D10<sup>KO</sup>, R9D11<sup>KO</sup> und R9D11S<sup>KO</sup> liegt im Vergleich mit dem Wildtyp zwischen 20 % und 30 %.

Da trotz größtenteils larvaler Letalität einige R9D10<sup>KO</sup>-Tiere das Adultstadium erreichten, konnten einige adulte Gehirne mithilfe einer Brp-Immunfluoreszenzfärbung untersucht werden (Abb. 4.20 H). Im Vergleich mit einem wildtypischen adulten Gehirn (Abb. 4.20 G) ist hier eine deutliche Vergrößerung der Region des SLPs (lateralen *superior* Protocerebrums) zu beobachten (Abb. 4.20 H). Auch schwächere, in diesen Untersuchungen nicht aufgedeckte Phänotypen könnten sowohl in den betrachteten adulten, aber auch in den larvalen Gehirnen vorhanden sein und in Zukunft mithilfe von spezifischeren Markerproteinen untersucht werden.

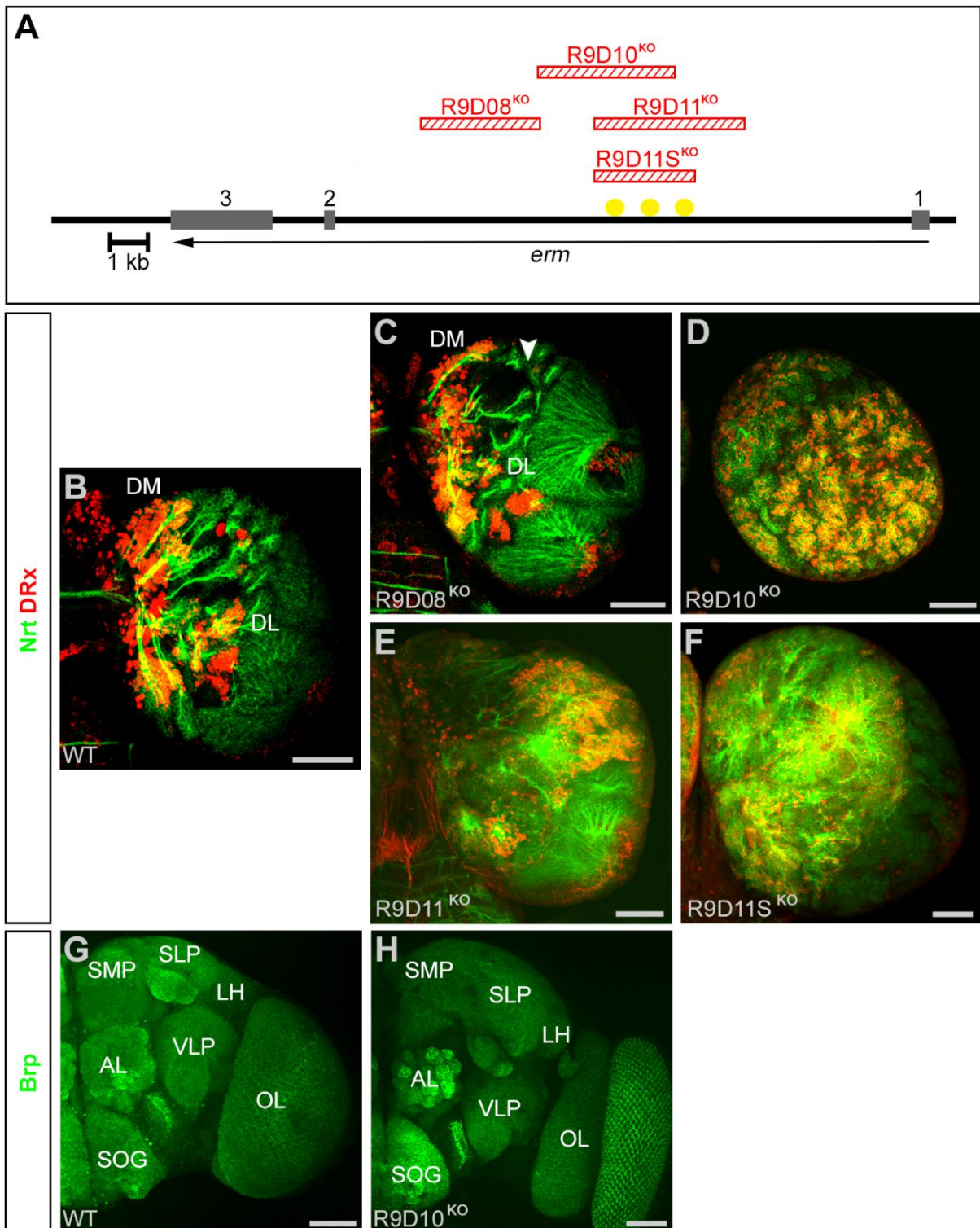


Abbildung 4.20: Untersuchung der durch *Genetargeting* hergestellten *erm*-Enhancer-Deletionsstämme R9D08<sup>KO</sup>, R9D10<sup>KO</sup>, R9D11<sup>KO</sup> und R9D11S<sup>KO</sup> mithilfe von Immunfluoreszenzfärbungen. **(A)** Genomische Region von *erm* mit Lokalisation der jeweiligen Deletion der einzelnen Stämme in Rot. Exons sind als Kästchen dargestellt, die Bindestellen für *erm*-regulierende Proteine als gelbe Kreise. **(B–F)** Rechte larvale Hemisphäre des Wildtyps (WT) **(B)** sowie der *Genetargeting*-Stämme R9D08<sup>KO</sup> **(C)**, R9D10<sup>KO</sup> **(D)**, R9D11<sup>KO</sup> **(E)** und R9D11S<sup>KO</sup> **(F)** mit Nrt (grün)- und DRx (rot)-Immunfluoreszenzfärbungen. DL, dorsolaterale Lineages; DM, dorsomediale Lineages. Maßstab 50 μm. **(G und H)** Brp-Immunfluoreszenzfärbung (grün) auf adulte Gehirne des Wildtyps **(G)** und des *erm*-Enhancer-Deletionsstammes R9D10<sup>KO</sup>. AL, antennale Lobe; LH, laterales Horn; SLP, laterales superior Protocerebrum; SMP, mediales superior Protocerebrum; SOG, subesophageales Ganglion; VLP, ventrolaterales Protocerebrum. Maßstab 50 μm.

Zusammenfassend zeigen die Untersuchungen der Enhancer-*Genetargeting*-Stämme die Wichtigkeit einer jeden in dieser Arbeit betrachteten Enhancer-Region für die Entwicklung des Gehirns und vervollständigen die Untersuchungen der Expression und Regulation der Transkriptionsfaktoren DRX, Hbn und Erm (Klöppel *et al.*, 2021; Hildebrandt *et al.*, 2022b; Hildebrandt *et al.*, 2021).

## 5 Diskussion

Das Homeoboxgen *orthopedia* (*otp*) codiert für einen Transkriptionsfaktor und ist essentiell für die embryonale Enddarmentwicklung (Hildebrandt *et al.*, 2020). Es konnte bereits gezeigt werden, dass Otp auch im larvalen und adulten Enddarm exprimiert wird (Hildebrandt *et al.*, 2020). Neun *otp*-Transkriptvarianten sind bekannt (Flybase FB2022\_04, Thurmond *et al.*, 2019), die sich aufgrund ihrer Länge und Exonbeschaffenheit in zwei Transkriptklassen einteilen lassen. Diese beiden Transkriptklassen werden im Embryo gewebespezifisch exprimiert, wobei die kürzere Transkriptklasse nur im Enddarm und die längere nur im Nervensystem nachweisbar ist (Hildebrandt *et al.*, 2020). Neben der essentiellen Bedeutung für die Entwicklung des Enddarmes wird *otp* also auch im embryonalen Gehirn und Ventralnervensystem exprimiert, wobei eine posttranskriptionelle Regulation zu vermuten ist, da *otp* im Ventralnervensystem zwar in allen Segmenten transkribiert, aber nur in den fünf Segmenten T1 bis A2 translatiert wird (Hildebrandt *et al.*, 2020). In dieser Arbeit sollte nun die Otp-Expression im embryonalen, larvalen und adulten Gehirn beschrieben und spezifischen Zelllineages zugeordnet werden und außerdem untersucht, ob die Transkriptvarianten im Larval- und Adultstadium weiterhin gewebespezifisch exprimiert werden. Des Weiteren sollte eine mögliche posttranskriptionelle Interaktion der microRNA miR-252 mit *otp* analysiert und die beiden EMS-induzierten Mutantenstämme *otp*<sup>1024</sup> und *otp*<sup>13064</sup> mittels Sequenzierung auf molekularer Ebene überprüft werden.

Zur Vervollständigung von Untersuchungen der ebenfalls neural regulierenden Transkriptionsfaktoren *Drosophila* Retinal Homeobox (DRx), Homeobrain (Hbn) und Earmuff (Erm) sollte jeweils ein genspezifischer Gal4-Treiberstamm hergestellt werden, mit dessen Hilfe das gesamte Expressionsmuster des jeweiligen Gens darstellbar ist. Außerdem sollten unterschiedliche, genspezifische Enhancer-Deletionsstämme mittels Immunfluoreszenzfärbungen auf Abweichungen im Expressionsmuster des jeweiligen Gens analysiert werden.

### 5.1 Die Expression von Orthopedia (Otp)

Bei der Zuordnung der Otp-Expression zu spezifischen neuronalen Zelllineages durch Immunfluoreszenzfärbungen stellte sich Otp als sehr stabiler Marker für einige Lineages über alle untersuchten Entwicklungsstadien hinweg dar (s. Abb. 4.1). Lineages beschreiben die Abstammungslinie aller Zellen, die aus einer neuronalen Vorläuferzelle, einem Neuroblasten, entstanden sind. Zum Großteil sind diese Zellen Neurone, aber auch Gliazellen entstehen aus Neuroblasten. Im adulten Gehirn bilden die Synapsen und terminalen Neuritenverzweigungen der



Neurone Neuropil-Kompartimente, welche vor allem durch Gliazellschichten und Gehirnfaszikel, die durch die sekundären Axontrakte (SATs) der Lineages gebildet werden, voneinander abgegrenzt werden (s. Abb. 2.7) (Pereanu und Hartenstein, 2006). Die SATs verbinden außerdem die Kompartimente untereinander und dienen der Signalweiterleitung.

Die Lineages DPL1–3 (laterale dorso-posteriore Lineages, laterale Subgruppe 1–3), DPLc4 (laterale dorso-posteriore Lineages, zentrale Subgruppe 4) und BLAd (anteriore baso-laterale Lineages, dorsale Subgruppe) sowie die olfaktorischen Interneuron-Lineages BALc (baso-anteriore Lineages, caudo-laterale Subgruppe), BAMv3 (baso-anteriore Lineages, ventro-mediale Subgruppe 3) und BALp4 (baso-anteriore Lineages, postero-laterale Subgruppe 4) weisen eine stabile *Otp*-Expression vom embryonalen über das larvale bis hin zum adulten Gehirn auf. Daneben ist im embryonalen und larvalen Gehirn die Lineage MD SA1 (mandibulare suboesophageale anteriore Domäne 1) und im larvalen und adulten Gehirn die Lineage DM5 (dorsomediale Lineage 5) *Otp*-positiv (s. Abb. 4.1).

DPL1–3 und DPLc4 bilden im lateralen Bereich des embryonalen Gehirns die beiden Expressionscluster P1 und P2 (s. Abb. 4.1 A+B). Im dorsal-anterioren Bereich der larvalen Hemisphäre formen sie ein *Otp*-positives Zellcluster (s. Abb. 4.1 F–I) benachbart zum *Mushroom Body* (MB), und im adulten Gehirn sind diese Lineages im mittleren (DPLI3) bis posterioren (DPLI1, DPLI2, DPLc4) dorsalen Bereich zu finden (s. Abb. 4.1 O+P). Die SATs der Lineages DPL1–3 betreten die postero-laterale Neuropil-Oberfläche an der Verbindung zwischen den Kompartimenten SLP (laterales *superior* Protocerebrum) und LH (laterales Horn) (Wong *et al.*, 2013). Der DPLI1-SAT verläuft medial entlang des trSP (transverses *superior* posteriores) Faszikel, das im Bereich des SLP lokalisiert ist, und verzweigt sich in den posterioren Regionen von SLP und SMP (mediales *superior* Protocerebrum) (Wong *et al.*, 2013). Eine laterale Verzweigung innerviert außerdem LH und PLP (posterolaterales Protocerebrum) (Wong *et al.*, 2013). Die SATs der Lineages DPLI2 und DPLI3 bilden gemeinsam das loSL (longitudinales *superior* laterales) Faszikel, das im Bereich des SLP zu finden ist. Die terminalen Verzweigungen innervieren die höheren Gehirnkompimente LH, SIP (intermediäres *superior* Protocerebrum), SLP und SMP, nach ventral gerichtete Verzweigungen reichen bis zu den Regionen des PLPs, posterioren VLPs (ventrolaterales Protocerebrum) und lateralen IPs (*inferior* Protocerebrum) (Lovick *et al.*, 2013; Wong *et al.*, 2013). Während DPLI2 einen dünnen, kompakten Axontrakt mit dichten Enden in einer Subdomäne des posterioren VLPs bildet, formt DPLI3 einen lockeren Trakt mit Verzweigungen entlang des gesamten Verlaufs von SLP bis hin zum posterioren VLP (Wong *et al.*, 2013). Der SAT der Lineage DPLc4 tritt an der Verbindung von SLP und SMP ins Neuropil ein und bildet Verzweigungen in SIP, SLP und SMP (Wong *et al.*, 2013).

Die vier BLAd-Lineages sind im embryonalen Gehirn lateral-ventral zur Lineage DPLc4 lokalisiert. Im larvalen Gehirn sind sie im mittleren bis ventralen dorsalen Bereich benachbart zur OL zu finden und

im adulten Gehirn in einem Bereich zwischen VLP und SLP. Dorsal formen die BLAd-SATs das trSI (intermediäres *superior transverses*) Faszikel, das vor allem die verschiedenen Bereiche des höheren Protocerebrums miteinander verbindet (Wong *et al.*, 2013). Die Lineage BLAd1 verzweigt sich in LH und SLP, BLAd2 fokussiert sich vor allem auf SMP und SIP, innerviert aber auch das posteriore SLP sowie das posteriore und medial-laterale IP, und die BLAd3/4-SATs bilden Verzweigungen im medialen SLP (Wong *et al.*, 2013).

Die sechs DM-Lineages wurden nach ihrer Lage in der dorsalen larvalen Hemisphäre von rostral (DM1) nach caudal (DM6) benannt. Bei den ihnen zugrundeliegenden Neuroblasten handelt es sich um Typ II Neuroblasten, wodurch es ihnen möglich ist, viel mehr adult-spezifische Zellen hervorzubringen als die Typ I Neuroblasten, die die meisten Lineages bilden (Bello *et al.*, 2008). So entstehen aus den sechs DM-Neuroblasten über 5000 adult-spezifische Zellen, was etwa ein Viertel der Gesamtzellen des adulten Gehirns ausmacht (Bello *et al.*, 2008). Dabei handelt es sich sowohl um Gliazellen als auch um protocerebrale Neurone, die vor allem an der Bildung des Zentralkomplexes (CCX) des adulten Gehirns beteiligt sind (Izergina *et al.*, 2009). Der CCX beinhaltet die Kompartimente EB (*Ellipsoid Body*), FB (*Fan-shaped Body*), NO (Noduli) und die PB (protocerebrale Brücke) (Pereanu *et al.*, 2010). Der SAT der im larvalen und adulten Gehirn Otp-positiven DM5-Lineage splittet sich im larvalen Gehirn in einige kommissurale Faszikel, die an der 4. Eintrittsstelle in die Kommissur eintreten, und ein Hauptfaserbündel, das das Neuropil betritt (Izergina *et al.*, 2009). Verglichen mit den anderen DM-Lineages produziert die DM5-Lineage eine ausgesprochen große Anzahl von Gliazellen, die teilweise eng mit den neuronalen Zellclustern der Lineage verbunden, aber auch weiter entfernt und mehr lateral in der larvalen Hemisphäre lokalisiert sind (Viktorin *et al.*, 2011). Im adulten Gehirn bildet die DM5-Lineage eine Glia- und Neuritenverzweigung, die sich vom Zentralgehirn in die optischen Loben ausbreitet und unter anderem auch MB, CCX und LH abdeckt (Ren *et al.*, 2016).

Im ventralen Bereich der embryonalen und larvalen Hemisphäre ist neben den olfaktorischen Interneuron-Lineages auch die zum SOG (Suboesophagealen Ganglion) gehörende Lineage MD SA1 Otp-positiv. Die SATs dieser Lineage treten durch das anteriore Portal des aSAP (anteriores Portal des anterioren SOG) in das Neuropil ein, verlaufen medial und bilden terminale Verzweigungen ventral im anterioren Bereich des SOGs (Kuert *et al.*, 2014).

Bei BALc, BAMv3 und BALp4 handelt es sich um drei von fünf Lineages, die die Interneuronen des olfaktorischen Systems von *Drosophila* ausbilden (s. Kapitel 5.2).

## 5.2 Otp-exprimierende Zelllineages im Zusammenhang mit dem olfaktorischen System

Sowohl auf anatomischer als auch auf funktioneller Ebene gleichen sich die olfaktorischen Systeme von Insekten und Säugern zum Großteil (Hildebrand und Shepherd, 1997; Strausfeld und Hildebrand, 1999; Ache und Young, 2005), sodass das numerisch vergleichsweise stark reduzierte olfaktorische System der Insekten ein sehr hilfreiches Modell für die Erforschung des Säugersystems darstellt.

Der Signalweg des olfaktorischen Insekten-Systems beginnt in den etwa 1300 olfaktorischen Rezeptorneuronen (ORN) jeder Antenne und des Maxillarpalpus, über die die olfaktorischen Informationen aufgenommen werden (Vosshall *et al.*, 2000) (Abb. 5.1 links, pink). Die adult-spezifischen ORN stammen aus zahlreichen Vorläufern in den Antennen-Imaginalscheiben der Larve. Morphologisch gleichen die ORN denen von Vertebraten. Sie sind bipolar, besitzen also Dendriten zur Aufnahme des Reizes und ein einziges Axon, das zum primären olfaktorischen Verarbeitungszentrum des Gehirns führt. Dieses stellt sich im adulten Insekten-Gehirn als die beiden AL (antennale Loben) dar, die das Insekten-Analogon des Säuger-Riechkolbens bilden und durch die eine erste Verarbeitung der Informationen sowie eine Umschaltung in höhergelegene Gehirnbereiche stattfindet. In den AL verzweigen sich die Axone der ORN in 51 abgegrenzte Neuropil-Untereinheiten, die Glomeruli genannt werden (Vosshall *et al.*, 1999) und die jeweils den synaptischen Input der spezifischen ORN erhalten, je nach Art des zugrunde liegenden Geruchsrezeptors (Vosshall, 2000).

Hier findet die Umschaltung der olfaktorischen Information auf die beiden Interneuron-Typen LN (lokale Interneurone) (Abb. 5.1 links, türkis) sowie PN (Projektionsneurone) (Abb. 5.1 links, orange, hellblau, dunkelblau, dunkelgrün) statt, die die beiden Haupt-Targetneurone der ORN innerhalb der Glomeruli bilden. LN modulieren die einkommende Information auf horizontaler Ebene durch Verschaltungen verschiedener Glomeruli untereinander und Synapsenbildung zu anderen LN sowie PN (Huang *et al.*, 2010; Yaksi und Wilson, 2010), während PN die Glomeruli der AL mit höherliegenden olfaktorischen Gehirnzentren verbinden (Jefferis *et al.*, 2001). PN stellen somit die Insekten-Analoga zu den Säuger-Mitral- und -Büschelzellen dar. Sowohl LN als auch PN können noch weiter in neuronale Subtypen eingeteilt werden, die sich in Neurotransmittertyp, neurophysiologischen Eigenschaften oder im Innervierungs-Muster der Glomeruli unterscheiden (Carlsson *et al.*, 2010; Chou *et al.*, 2010; Das *et al.*, 2008; Lai *et al.*, 2008).

Die adult-spezifischen ORN sowie die PN und LN bilden also den adulten olfaktorischen Schaltkreis der AL zur Weiterleitung der olfaktorischen Information in die höhergelegenen Verarbeitungsbereiche MB und LH. Die MBs stellen ein wichtiges Insekten-Gehirnzentrum dar, das in

olfaktorisches Lernen und andere Formen des Lernens (Heisenberg, 2003; Davis, 2005), lokomotorische Kontrolle (Martin *et al.*, 1998), männliches Balzverhalten (Sakai und Kitamoto, 2006) sowie die Schlafregulation (Joiner *et al.*, 2006) involviert ist. Somit bilden die MBs das Insekten-Analogon des Säuger-Piriformcortex. Die Haupt-Eingangsregion von Signalen in die MBs ist die Calyx-Region (CA), wo die terminalen Regionen der PN Synapsen mit etwa 2500 intrinsischen MB-Neuronen, den Kenyonzellen, ausbilden (Ito *et al.*, 1997; Crittenden *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 1999). Auch die CA bestehen aus Glomeruli, die die dendritischen Verzweigungen und Synapsen der Kenyonzellen beinhalten (Yasuyama *et al.*, 2002). Das LH ist das Hauptziel der olfaktorischen Informationen und vor allem in die erfahrungsunabhängige Geruchserkennung involviert (De Belle und Heisenberg, 1994; Heimbeck *et al.*, 2001; Tanaka *et al.*, 2004). Es stellt das Insekten-Analogon der Säuger-Amygdala dar. In MB und LH finden die Verbindungen zwischen PN und weiterführenden olfaktorischen Neuronen zur Verarbeitung der Informationen statt (Tanaka *et al.*, 2004).

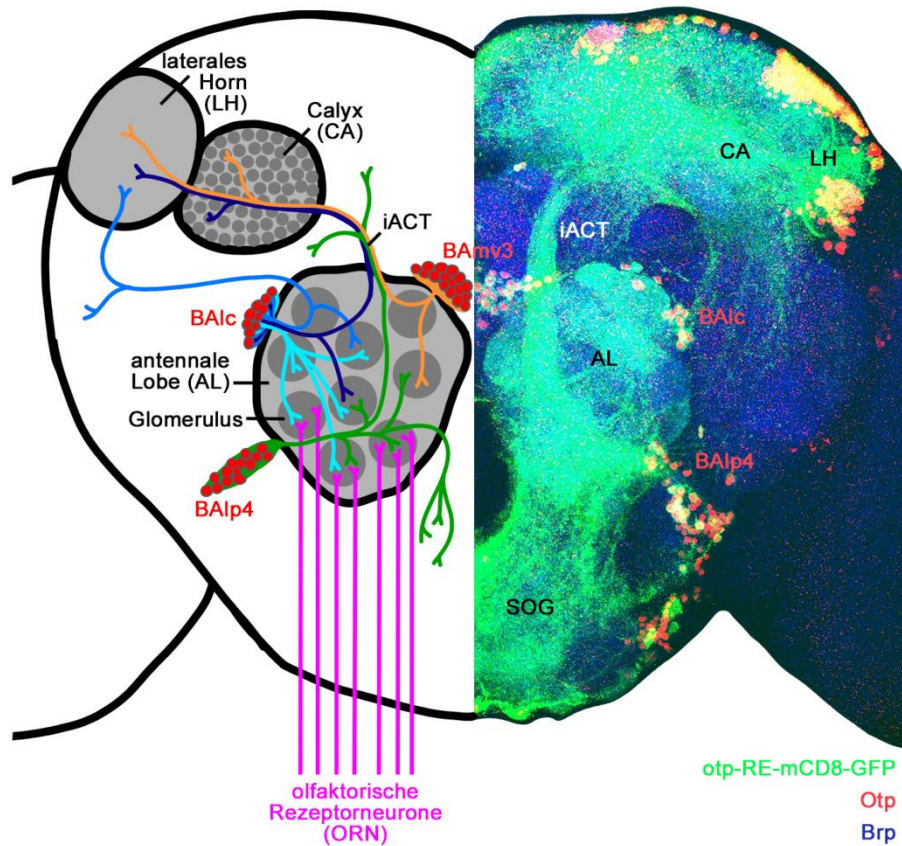
Gemessen an der Zahl der beteiligten Zellen ist das larvale olfaktorische System im Vergleich sehr viel einfacher aufgebaut als das adulte System. Allerdings gleicht sich der zentrale olfaktorische Schaltkreis in beiden Entwicklungsstadien. Die olfaktorische Information aus 21 ORN, die im dorsalen Organ des Antennomaxillar-Complex liegen, wird in 21 AL-Glomeruli auf 21 PN umgeschaltet, die zu den CA-Glomeruli und dem LH führen (Python und Stocker, 2002; Fishilevich *et al.*, 2005; Ramaekers *et al.*, 2005, Heimbeck *et al.*, 1999). Analog zu dem adulten AL-Schaltkreis sind auch in den larvalen AL LN für laterale Verbindungen zuständig (Python und Stocker, 2002), die putativ multiglomerulare Verbindungen ausbilden (Ramaekers *et al.*, 2005). Larvale PN sind zum Großteil auf einen (uniglomerular) oder höchstens zwei (biglomerular) Glomeruli ausgerichtet (Marin *et al.*, 2005; Ramaekers *et al.*, 2005), wobei jeder Glomerulus durch ein oder auch mehrere PN innerviert wird (Ramaekers *et al.*, 2005). Auch die CA-Glomeruli liegen im larvalen Stadium noch in ihrer Anzahl reduziert vor (Marin *et al.*, 2005), dennoch bilden die PN hier analog zum adulten System mit den Kenyonzellen Synapsen (Masuda-Nakagawa *et al.*, 2009; 2005).

Sowohl die larvalen als auch die adult-spezifischen PN und LN der AL entstehen Lineage-spezifisch aus den vier Neuroblasten adNB (anterodorsaler Neuroblast), INB (lateral Neuroblast), vNB (ventraler Neuroblast) und vINB (ventrolateraler Neuroblast) sowie einem weiteren Neuroblasten (Das *et al.*, 2013, 2011, 2008; Jefferis *et al.*, 2001; Lai *et al.*, 2008). Jeder Neuroblast generiert eine unveränderliche Lineage, die Neurone einer oder mehrerer Interneuron-Typen hervorbringt. Aus adNB entstammt die Lineage BAMv3, aus INB die Lineage BALc, vNB bildet die Lineage BALa1 (basoanteriore anterior-laterale Lineage 1), vINB die Lineage BALa2 (basoanteriore anterior-laterale Lineage 2), und ein fünfter Neuroblast ist für die Ausbildung der Lineage BALp4 verantwortlich. BALa2 besteht vor allem aus einer Vielfalt von LN, die sich zum Großteil in der Region der AL konzentrieren

(Das *et al.*, 2013). BALa1, BALc, BAmv3 und BALp4 bilden im adulten Gehirn alle PN, die die AL mit dem höheren Protocerebrum verbinden (Das *et al.*, 2013, Lai *et al.*, 2008; Wong *et al.*, 2013), wobei BALc und BAmv3 die AL mit dem MB und dem LH verknüpfen, während BALa1 die Informationen direkt zum LH führt, ohne den MB zu passieren (Das *et al.*, 2013). Diese vier Lineages werden aufgrund der Geometrie ihrer PN als PD (proximal-distale) Lineages bezeichnet, da sich die dendritischen Verzweigungen des jeweiligen SATs an dessen proximalem Ende in der AL befinden, während die axonalen Verzweigungen am distalen Ende des SATs in den höherliegenden Gehirnbereichen zu finden sind (Larsen *et al.*, 2009). Dazwischen weisen die SATs nirgendwo Verzweigungen auf (Larsen *et al.*, 2009). Zunächst schließen sich die SATs der vier Lineages zusammen, bevor der SAT von BALa1 das Bündel wieder verlässt, um über den medialen antennocerebralen Trakt (mACT) direkt zum LH zu projizieren (Das *et al.*, 2013). Die SATs von BALc (Abb. 5.1 links, dunkelblau), BAmv3 (Abb. 5.1 links, orange) und BALp4 (Abb. 5.1 links, grün) bilden den inneren antennocerebralen Trakt (iACT), der über den MB zum LH führt, wobei der SAT von BALp4 bereits vor dem Eintreffen im CA terminale Verbindungen im Protocerebrum ausbildet (Das *et al.*, 2013). Da die BALp4 LN auch prominente Verzweigungen in das den AL benachbarte SOG ausbildet, ist es wahrscheinlich, dass die BALp4 PN nicht nur olfaktorische, sondern auch gustatorische Informationen in die höhergelegenen Gehirnregionen überbringen (Das *et al.*, 2013). Auch ein Teil der BALc PN, die ventrale BALc-Hemilineage, konzentriert sich nicht auf den typischen olfaktorischen Signalweg, sondern verzweigt sich größtenteils AL-unabhängig als loVI (intermediales ventral-longitudinales Faszikel) ventro-posterior zum AMMC (Antenno-Mechanosensorik- und -Motorzentrum), in dem mechanische Reize in neurale Signale übersetzt werden (Lovick *et al.*, 2013) (in Abb. 5.1 aus Übersichtlichkeits-Gründen nicht gezeigt).

Obwohl die larvalen und adult-spezifischen PN und LN der AL jeweils denselben Neuroblasten entstammen, gibt es teilweise Unterschiede in der Zusammensetzung der jeweiligen larvalen primären und adulten sekundären Lineage (Das *et al.*, 2013). So führen beispielsweise die primären larvalen BALc-LN auch ins benachbarte SOG Neuropil, während die sekundären adult-spezifischen BALc-LN auf die AL beschränkt sind (Abb. 5.1 links, türkis). Die primären BALc-PN sind oligoglomerular und leiten die Informationen über den iACT zum CPI (centro-posteriore intermediäres)-Kompartiment, das das *Peduncle* des MBs umgibt, wohingegen die sekundären BALc-PN uniglomerular vorliegen, deren Axone über den iACT zum MB und LH führen (Abb. 5.1 links, dunkelblau). vNB/BALc generiert allerdings in Larve und Fliege eine Vielfalt an LN, die sich in Aufbau und Transmitterexpression gleichen und einige atypische PN, die dem äußeren antennocerebralen Trakt (oACT) zum LH folgen (Abb. 5.1 links, hellblau). Die primären und sekundären, meist uniglomerularen PN (Yu *et al.*, 2010) der adNB/BAmv3 Lineage sind nahezu identisch und folgen dem iACT zum CA und LH (Abb. 5.1 links, orange). 19 der 21 larvalen olfaktorischen PN entstammen adNB.

Die PN der Lineage BA1p4 gleichen sich morphologisch in Larve und Fliege und verbinden die AL sowohl mit dem benachbarten SOG als auch mit einem Bereich des Protocerebrums, der außerhalb von MB und LH liegt (Abb. 5.1, dunkelgrün).



**Abbildung 5.1: Beteiligung der Otp-positiven Lineages BAMv3, BALc und BALp4 am olfaktorischen System von *Drosophila melanogaster*.** Grafische Darstellung (links) und konfokalmikroskopische Aufnahme (rechts) des adulten Zentralgehirns. Anteriore Ansicht, dorsal ist oben. **Links:** Grafische Darstellung des olfaktorischen Systems mit Fokus auf die Otp-positiven Lineages BAMv3, BALc und BALp4 (rot). Die beteiligten Gehirnkompimente antennale Lobe (AL), Calyx (CA) und laterales Horn (LH) sind grau unterlegt, in Dunkelgrau sind die AL- sowie die CA-Glomeruli dargestellt. Über olfaktorische Rezeptoren aufgenommene Reize werden mittels olfaktorischer Rezeptorneurone (ORN, pink) zu den Glomeruli der AL weitergeleitet. Zahlreiche lokale Interneurone (LN) sorgen für die Verschaltung der Glomeruli untereinander, während vielzählige Projektionsneurone (PN) für die Weiterleitung der olfaktorischen Reize in höherliegende Gehirnzentren zuständig sind. Dunkelgrün, oligoglomeruläre PN der BALp4-Lineage führen teils in die Region des suboesophagealen Ganglions (SOG) und über den inneren antenno-cerebralen Trakt (iACT) in höhere Gehirnregionen; orange, uniglomeruläre PN der Lineage BAMv3 führen über den iACT in CA und LH; dunkelblau, uniglomeruläre PN der Lineage BALc führen über den iACT in CA und LH; hellblau, atypische PN der Lineage BALc führen direkt zum LH; türkis, BALc-LN verschalten die AL-Glomeruli untereinander. Die beiden weiteren, zum olfaktorischen System gehörenden, interneuronalen Lineages BALa1 und BALa2 sind nicht gezeigt. Verlauf der Lineage-Interneurone nach Das *et al.*, 2013. **Rechts:** Konfokalmikroskopische Aufnahme einer GFP-Reporter-Expression im Muster von otp-RE mithilfe der Stämme otp<sup>REGal4</sup> und UAS-mCD8-GFP. MCD8 bedeutet, dass GFP membrangebunden exprimiert wird und somit auch die Axone der Otp-positiven Zellen zu sehen sind. Mit Otp-Immunfluoreszenzfärbung in Rot zur Färbung der Otp-positiven Zellkerne und Bruchpilot (Brp)-Immunfluoreszenzfärbung in Blau, um die Gehirnkompimente sichtbar zu machen. Besonders gut zu sehen sind die AL sowie der iACT. Zahlreiche weitere Axone sind im dorsalen Gehirnbereich sowie im SOG angefärbt, da hier alle Otp-positiven Lineages des adulten Gehirns gezeigt sind.

Mithilfe des  $otp^{REGal4}$ -Stammes und des UAS-mCD8-GFP-Stammes können die Axone (Abb. 5.1 rechts, grün) der Otp-positiven Lineages (Abb. 5.1, rot) sichtbar gemacht werden. Besonders gut ist der iACT zu erkennen, den die PN von BAMv3, BALc und BALp4 bilden, um die olfaktorischen Informationen in die höheren Gehirnregionen zu leiten. Da in dieser Aufnahme alle Otp-positiven Lineages gezeigt sind, sind auch in den dorsalen Gehirnbereichen sowie dem SOG noch viele weitere Axone zu sehen.

Da Otp in drei der fünf Lineages, die die Interneurone des olfaktorischen Systems von *Drosophila* ausbilden, exprimiert wird, wäre es in Zukunft sehr interessant, eine mögliche Rolle von Otp im olfaktorischen System zu untersuchen.

### 5.3 Otp im Evo-Devo-Kontext

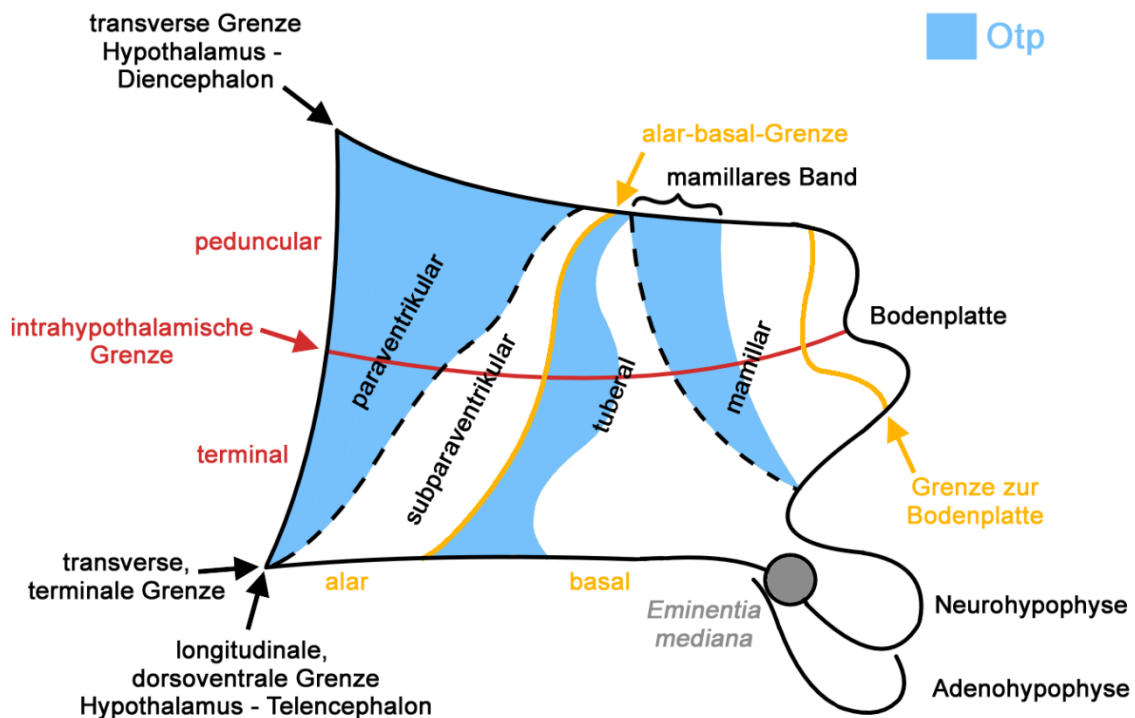
Otp stellt einen hoch konservierten Transkriptionsfaktor dar, wobei sich die Untersuchungen der Otp-Expression in Vertebraten vor allem auf das Nervensystem konzentrieren. Hier spielt Otp eine wichtige Rolle während der Entwicklung des Hypothalamus (Domínguez *et al.*, 2015). Der Hypothalamus gilt als die oberste Schaltzentrale des vegetativen und des endokrinen Systems und nimmt eine zentrale Rolle bei der Regulation der Homöostase, Entwicklungsprozessen und Verhalten ein (Saper und Lowell, 2014). Er verarbeitet als Teil des Zwischenhirns Informationen sowohl aus den übergeordneten Gehirnbereichen als auch aus der Peripherie, vergleicht diese mit den Sollwerten und leitet gegebenenfalls die Wiederherstellung dieser Werte ein. Dabei besitzt er auch die Fähigkeit, die Sollwerte neu zu berechnen und so den Organismus an veränderte Umweltbedingungen anzupassen. Zum neuroendokrinen System der Vertebraten zählt neben dem Hypothalamus auch die Hypophyse, eine endokrine Drüse, deren Hinterlappen, Neurohypophyse genannt, anatomisch als dem Hypothalamus benachbarter Teil des Zwischenhirns gilt, während ihr Vorderlappen, die Adenohypophyse, über ein Pfortadersystem mit dem Hypothalamus verbunden ist (Saper und Lowell, 2014). Hypothalamus und Hypophyse wirken gemeinsam in fünf Regulationssystemen, den Hypothalamus-Hypophysen-Achsen (Charmandari *et al.*, 2005; Fliers *et al.*, 2014; Grattan, 2015; Kaprara und Huhtaniemi, 2018). Hierbei handelt es sich um die thyreotrope Achse, die die Schilddrüse miteinbezieht, die somatotrope Achse, über die Vorgänge in der Leber beeinflusst werden, die corticotrope Achse, die auf die Nebennierenrinde wirkt, die gonadotrope Achse, die die Gonaden als Zielstruktur hat, und die lactotrope Achse, die die Milchproduktion reguliert. Bei allen Achsen dienen hormonelle Rückkopplungen zur Einstellung eines hormonellen Gleichgewichts und des homöostatischen Zustands.

Der Hypothalamus besteht aus mehreren Kerngebieten, den sogenannten Nuclei, die jeweils aus Ansammlungen neurosekretorischer Zellen (NSC) aufgebaut sind. NSC unterscheiden sich anhand ihrer großen, Peptid-speichernden Vesikel, die über den gesamten Zellkörper, die Axone und die Synapsen verteilt vorliegen, von anderen Nervenzellen, deren Neurotransmitter-speichernden Vesikel sich in den Synapsen konzentrieren (Thorndyke und Georges, 1988). Die Neuropeptidhormone der hypothalamischen NSC erreichen über deren Axone die Hypophyse, um die dortige Hormonfreisetzung in die Peripherie zu steuern und so die Funktionen des Hypothalamus auszuüben. Hierbei wird zwischen magnozellularen und parvozellulären Neuronen unterschieden (Swanson und Sawchenko, 1983). Die magnozellularen Neurone sind in der dorsalen Region des *Nucleus paraventricularis* und des *Nucleus supraopticus* im anterioren Hypothalamus lokalisiert und projizieren ihre Axone zur Neurohypophyse, wo sie die Peptidhormone antidiuretisches Hormon (ADH) und Oxytocin freisetzen (Swanson und Sawchenko, 1983). ADH wirkt anschließend über die corticotrope Achse auf die Nebenniere, Oxytocin hat unterschiedliche Zielstrukturen. Die parvozellulären Neurone der *Nuclei praeopticus, paraventricularis, periventricularis, arcuatus* und *ventromedialis* projizieren ihre Axone zur *Eminentia mediana*, einer stark vaskularisierten Region im Grenzbereich von Hypothalamus und Hypophyse. Dort setzen sie die spezifischen Peptidhormone frei, die dann über die Hypophysenpfortadern zur Adenohypophyse gelangen und deren Hormonsekretion regulieren. Das Gonadotropin *Releasing* Hormon (GnRH) des *Nucleus praeopticus* steuert innerhalb der gonadotropen Achse die Ausschüttung des luteinisierenden Hormons (LH) und des follikelstimulierenden Hormons (FSH) durch die Hypophyse, die wiederum die Produktion und Sekretion der Sexualhormone in den Gonaden regulieren (Gore, 2002). Die aus dem *Nucleus paraventricularis* stammenden Hormone Corticotropin *Releasing* Hormon (CRH) und Thyrotropin *Releasing* Hormon (TRH) treten in Tageszeit-abhängigen Schwankungen auf und kontrollieren über das adrenocorticotrope Hypophysen-Hormon (ACTH) und das Thyroidea-stimulierende Hypophysen-Hormon (TSH) die Reaktion auf Stress und Nährstoffbedarf über die corticotrope und die thyreotrope Achse (Bonfiglio *et al.*, 2011; Taylor *et al.*, 1990). In den *Nuclei arcuatus* und *ventromedialis* wird das Wachstumshormon *Releasing* Hormon (GHRH) synthetisiert, das die Freisetzung des Wachstumshormons (GH) in der Adenohypophyse veranlasst und über die somatotrope Achse wirkt (Plotsky und Vale, 1985). Die parvozellulären Neurone des *Nucleus periventricularis* produzieren Somatostatin, das die Freisetzung von GH wiederum inhibiert (Plotsky und Vale, 1985).

Der Hypothalamus des Säugetiers wird in einen Alarbereich, einen Basalbereich und eine Bodenplatte sowie eine terminale und eine pedunculare Region eingeteilt (Abb. 5.2) (Morales-Delgado *et al.*, 2011; Diaz und Puellas, 2020). Der Alarbereich ist durch die alar-basal-Grenze vom Basalbereich, die terminale Region durch die intrahypothalamische Grenze (Abb. 5.2, rot) von der peduncularen abgetrennt. Der alare Teil wird weiter in den paraventriculären und den



subparaventricularen Bereich aufgeteilt, der basale Teil in den tuberalen und den mamillaren Bereich.



**Abbildung 5.2: Grafische Darstellung der Otp-Expression im Hypothalamus der Maus, angelehnt an Diaz und Puelles (2020), stark vereinfacht.** Otp-exprimierende Bereiche sind blau unterlegt. Der Hypothalamus wird durch die intrahypothalamische Grenze (rot) in einen peduncularen und einen terminalen Bereich unterteilt sowie durch die alar-basal-Grenze (gelb) in einen alaren und einen basalen Bereich. Der alare Teil entlang der Otp-Expressionsgrenze in einen paraventricularen (Otp-positiv) und einen subparaventricularen (Otp-negativ) Bereich eingeteilt. Die Grenze des Otp-positiven paraventricularen Bereichs legt außerdem die transverse Grenze zwischen Hypothalamus und Diencephalon sowie die longitudinale, dorsoventrale Grenze zwischen Hypothalamus und Telencephalon fest. Auch der basale Hypothalamus wird mithilfe einer Otp-Expressionsgrenze unterteilt, in einen tuberalen und einen mamillaren Bereich. In beiden Bereichen tritt spezifisch Otp-Expression auf. Die alar-basal-Grenze liegt entlang einer Otp-Expressionsgrenze im tuberalen Bereich, der Otp-positive Bereich in einem Teil des mamillaren Hypothalamus wird als mamillares Band bezeichnet. Außerdem gezeigt sind die Grenze zur Bodenplatte (gelb) und die Bodenplatte des Hypothalamus, die transverse, terminale Grenze des Hypothalamus, die Neuro- und Adenohypophyse sowie die *Eminencia mediana* (grau).

Diese Aufteilung des Hypothalamus in verschiedene Bereiche erfolgt anhand der Expressionsbereiche verschiedener Entwicklungsgene, zu denen auch Otp gehört (Abb. 5.2, blau) (Puelles und Rubenstein, 2003; Puelles *et al.*, 2004; Shimogori *et al.*, 2010). Otp gilt, gemeinsam mit dem bHLH-Transkriptionsfaktor Single-minded 1 (Sim1), als Marker für den paraventricularen Bereich des alaren Hypothalamus (Medina, 2008; Puelles *et al.*, 2012; Morales-Delgado *et al.*, 2014). Die Expressionsgrenzen von Otp und Sim1 legen hier sowohl die longitudinale Abgrenzung des Hypothalamus zum benachbarten Telencephalon bzw. die transverse Grenze zwischen Hypothalamus und Diencephalon fest (Fan *et al.*, 1996; Puelles *et al.*, 2012) als auch die Abgrenzung zum subparaventricularen Alarbereich. Otp wird außerdem in einem dem alaren Hypothalamus direkt benachbarten tuberalen Basalbereich exprimiert, wo seine Expressionsgrenze gemeinsam mit den

Expressionsgrenzen des Homeobox-enthaltenden Transkriptionsfaktors Nkx2.1 (NK2 Homeobox 1) und Shh (Sonic Hedgehog) die alar-basal-Grenze (Abb. 5.2, gelb) festlegen. Otp und Nkx2.1 definieren außerdem innerhalb des mamillaren Bandes die Grenze zwischen tuberalem und mamillarem Bereich. Über die caudalen Expressionsgrenzen von Otp innerhalb dieser beiden basalen Bereiche wird die transverse Grenze zwischen Hypothalamus und Diencephalon fortgeführt (Shimogori *et al.*, 2010; Morales-Delgado *et al.*, 2011; Puelles *et al.*, 2012).

Die Differenzierung der hypothalamischen, neuroendokrinen Zellen erfolgt aufgrund einer komplexen Hierarchie genetischer Interaktionen zwischen Transkriptionsfaktoren, die die verschiedenen Zell-Phänotypen definieren, die dann wiederum die neurosekretorischen Nuclei des Hypothalamus bilden. Innerhalb der paraventriculären Region entstehen während der Entwicklung des Hypothalamus die hypothalamischen *Nuclei paraventricularis* und *supraopticus* sowie der anteriore *Nucleus periventricularis* (Wang und Lufkin, 2000; Morales-Delgado *et al.*, 2011; Diaz und Puelles, 2020). Hierbei werden Otp und Sim1 kritische Rollen in der Proliferation, terminalen Differenzierung und Reifung der dortigen neuroendokrinen Zellen nachgesagt (Wang und Lufkin, 2000; Acampora *et al.*, 1999). Diese Zellen sekretieren die Neuropeptide Somatostatin, ADH, Oxytocin, CRH und TRH (Acampora *et al.*, 1999, 2000; Goshu *et al.*, 2004; Wang und Lufkin, 2000). Otp und Sim1 wirken auf gleicher Ebene als vorgeschaltete Regulatoren der beiden Transkriptionsfaktoren Sim2 (Single-minded Homolog 2) und Brn2 (POU Domäne Klasse 3 Transkriptionsfaktor 2) (Wang und Lufkin, 2000; Bedont *et al.*, 2015). Die Expression von Sim2 führt zur Entwicklung der TRH- und Somatostatin-sekretierenden Neurone des *Nucleus paraventricularis* und des anterioren *Nucleus periventricularis*, während Brn2 die Differenzierung der CRH-, ADH- und Oxytocin-produzierenden Neurone der *Nuclei paraventricularis* und *supraopticus* veranlasst (Bedont *et al.*, 2015; Michaud *et al.*, 1998). Des Weiteren wird Otp in einem tuberalen Bereich exprimiert, aus dem Somatostatin-sekretierende Zellen hervorgehen (Morales-Delgado *et al.*, 2011; Wang und Lufkin, 2000), die einen Teil des *Nucleus arcuatus* bilden (Puelles *et al.*, 2012). Otp ist also an verschiedenen Entwicklungswegen beteiligt, die zur terminalen Differenzierung vor allem der Neurone der *Nuclei paraventricularis* und *supraopticus* sowie des anterioren *Nucleus periventricularis* führen, aber auch einen Teil der Neurone des *Nucleus arcuatus* betreffen (Wang und Lufkin, 2000; Acampora *et al.*, 1999).

Der Aufbau des Hypothalamus und seine Zelltypen sind in Vertebraten hoch konserviert (Tessmar-Raible *et al.*, 2007). So konnte die Otp-positive supraoptoparaventriculäre Region (SPV) als analoge Region zur paraventriculären Region im Säuger-Hypothalamus bereits in zahlreichen Organismen von Zebrafischen (Del Giacco *et al.*, 2006; Blechman *et al.*, 2007; Machluf *et al.*, 2011; Herget *et al.*, 2014) über Lungenfische (Moreno und Gonzalez, 2011), Krallenfrösche (Bardet *et al.*, 2008; Domínguez *et*

*al.*, 2013, 2015), Schildkröten (Moreno *et al.*, 2012; Domínguez *et al.*, 2015) bis hin zu Hühnern (Bardet *et al.*, 2008) nachgewiesen werden. Damit werden Fische, Amphibien, Schildkröten, Vögel und Säuger innerhalb des phylogenetischen Stammbaumes abgedeckt. Doch auch im sich entwickelnden Vorderhirn des Anneliden *Platynereis dumerilii* konnten bereits neurosekretorische Zellen beobachtet werden, die eine konservierte Zelltyp-spezifische Kombination von Transkriptionsfaktoren exprimieren, zu der auch Otp zählt (Tessmar-Raible *et al.*, 2007).

Dieselbe Transkriptionsfaktoren-Kombination wurde auch während der Entwicklung des Vorderhirns von Zebrafischen beobachtet (Tessmar-Raible *et al.*, 2007). Im Zebrafisch induzieren die Transkriptionsfaktoren Fezf2 (FEZ Familie Zinkfinger 2) und Olig2 (Oligodendrozyten Transkriptionsfaktor 2), die auch in einer Entwicklungsstufe der Maus exprimiert werden, die Marker Otp und Sim1 (Bedont *et al.*, 2015). Die Otp- und Sim1-positive Region, ORR (*optic recess region*) genannt, liegt zwischen Telencephalon und Hypothalamus und umfasst den präoptischen Bereich. Sie entspricht dem alaren Hypothalamus der Tetrapoden (Puelles und Rubenstein, 2003; Domínguez *et al.*, 2013, Herget *et al.*, 2014). Sim1 und Otp sind dort gemeinsam mit dem proneuralen Gen *neurog1* (*neurogenin 1*) lokalisiert, was darauf hindeutet, dass sie vorwiegend in differenzierenden Zellen exprimiert werden (Affaticati *et al.*, 2015). Vermutlich ist Otp auch an der Spezifizierung neurosekretorischer hypothalamischer Zellpopulationen beteiligt, die Somatostatin sowie Vasotocin-Neurophysin und Isotocin-Neurophysin, die Zebrafisch-Homologen zu Vasopressin und Oxytocin, produzieren (Blechman *et al.*, 2007; Eaton und Glasgow, 2007; Tessmar-Raible *et al.*, 2007; Eaton *et al.*, 2008; Herget *et al.*, 2014). Otp wird im Zebrafisch von FGF8 (Fibroblasten Wachstumsfaktor 8) reprimiert (Del Giacco *et al.*, 2006), was für die AP-Musterung des Otp/Sim1-exprimierenden mamillaren Bands des Säuger-Hypothalamus relevant sein könnte (Diaz und Puelles, 2020). Ein kleiner Bereich innerhalb der Mamillarregion ist die einzige Otp-positive Struktur im basalen Teil des Zebrafisch-Hypothalamus, wo es gemeinsam mit Nkx2.1 exprimiert wird (Domínguez *et al.*, 2015; Wolf und Ryu, 2013).

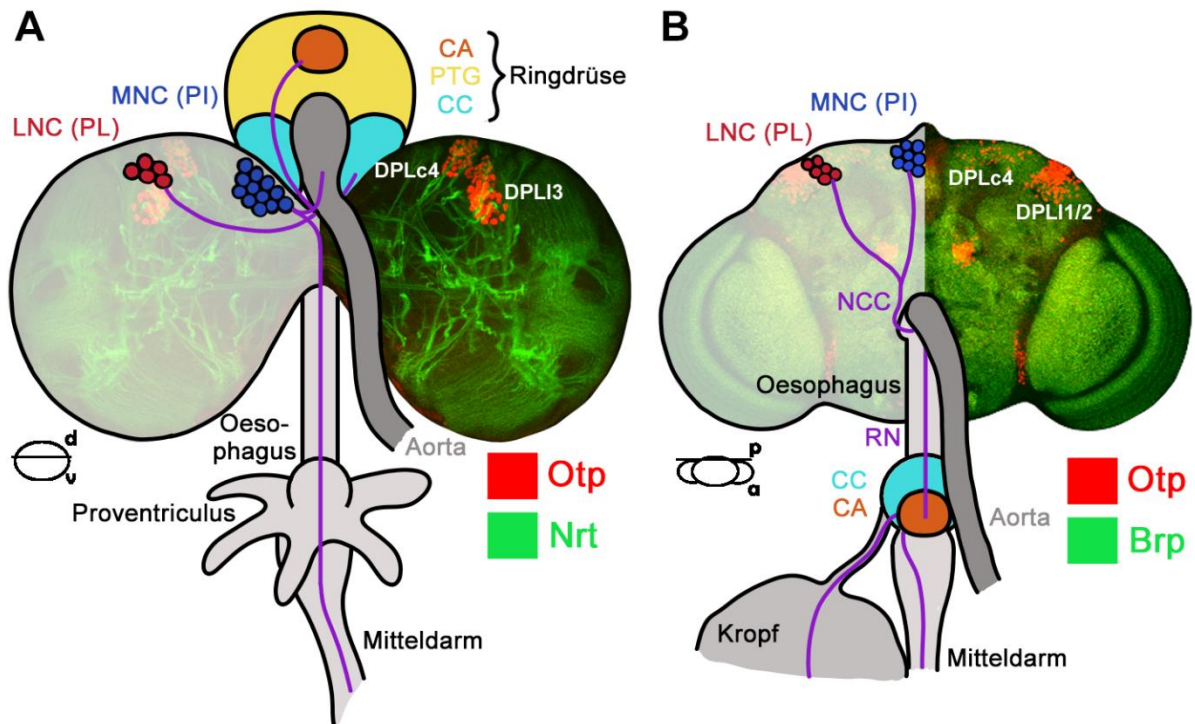
Auch im Lungenfisch wird Otp in der SPV-Region exprimiert sowie gemeinsam mit Nkx2.1 in einem Großteil der Mamillarregion (Moreno und Gonzalez; 2011). Zusätzlich tritt Otp auch im tuberalen Bereich gleichzeitig mit Nkx2.1 und dem Transkriptionsfaktor Isl1 (ISL LIM Homeobox 1) auf (Moreno und Gonzalez; 2011). In der Amphibie *Xenopus laevis* und dem Reptil *Pseudemys scripta* kann die SPV-Region bereits in zwei verschiedene Bereiche eingeteilt werden. Innerhalb der gesamten SPV-Region des *Xenopus*-Hypothalamus wird Otp exprimiert (Bardet *et al.*, 2008; Domínguez *et al.*, 2013, 2015), im rostralen Bereich zusätzlich der Transkriptionsfaktor Nkx2.2 (NK2 Homeobox 2) (Domínguez *et al.*, 2014). Zusätzlich zu Otp tritt in der vollständigen SPV-Region des *Pseudemys*-Hypothalamus auch das *Paired Box* Protein Pax6 auf und im rostralen Bereich außerdem Nkx2.2

(Moreno *et al.*, 2012; Domínguez *et al.*, 2015). In beiden Organismen enthält die SPV-Region verschiedene Zellgruppen, die die Neuropeptide Vasotocin, Mesotocin, CRH und TRH sekretieren (Smeets *et al.*, 1990; Propper *et al.*, 1992; D'Aniello *et al.*, 1999; Domínguez *et al.*, 2008; López *et al.*, 2008). Auffällig ist, dass sich die TRH-positive Zellpopulation spezifisch innerhalb des *Otp*-exprimierenden SPV-Teils befindet (Domínguez *et al.*, 2008; López *et al.*, 2008). Außerdem besteht eine Korrelation zwischen Somatostatin- und Mesotocin-positiven Neuronen und dem Auftreten von *Otp* in der SPV-Region des *Xenopus*-Hypothalamus (Domínguez *et al.*, 2013, 2015), was die Rolle von *Otp* bei der Spezifizierung verschiedener neurosekretorischer Zellpopulationen unterstreicht. In einem Teil der Mamillarregion werden in beiden Organismen *Otp* und *Nkx2.1* exprimiert, während im rostralen tuberalen Bereich *Otp*, *Nkx2.1* und *Isl1* nachweisbar sind, in *Xenopus* außerdem auch *Shh* (Moreno *et al.*, 2012, 2008; Brox *et al.*, 2003; Domínguez *et al.*, 2014). Auch im Huhn wird *Otp* gemeinsam mit weiteren Faktoren in der gesamten SPV-Region, in einem Teil der Mamillarregion und im rostralen tuberalen Bereich exprimiert (Bardet *et al.*, 2008). In der SPV-Region werden außerdem *Pax6* und das Homeodomänen-Protein *Lhx5* (LIM Homeobox 5) exprimiert, in der Mamillarregion und dem rostralen tuberalen Bereich *Nkx2.1* und im rostralen tuberalen Bereich außerdem *Shh* (García-Calero *et al.*, 2008).

Zusammenfassend sind also nicht nur der Aufbau des Hypothalamus und seine Zelltypen stark konserviert, sondern offenbar auch die spezifische *Otp*-Expression in den verschiedenen hypothalamischen Bereichen.

Das neuroendokrine System von *Drosophila* sorgt, analog zur Funktion von Hypothalamus und Hypophyse, für die Aufrechterhaltung der Homöostase, Verhaltens- und Entwicklungsprozesse und die Reaktion auf sich verändernde Einflüsse auf den Organismus (Jékely *et al.*, 2018; Kim *et al.*, 2017; Martelli *et al.*, 2017; Nässel *et al.*, 2019, Nässel und Zandawala, 2019; Schoofs *et al.*, 2017). Es besteht aus NSC, die zum Großteil in den beiden dorsomedialen, neuroendokrinen Gehirnzentren *Pars intercerebralis* (PI, Abb. 5.3, dunkelblau) und *Pars lateralis* (PL, Abb. 5.3, dunkelrot) lokalisiert, aber auch im Tritocerebrum, dem Ventralnervensystem und den Ganglien des stomatogastrischen Nervensystems vertreten sind (Pipa, 1978; Veelaert *et al.*, 1998; Siegmund und Korge, 2001). PI und PL gelten als die *Drosophila*-Analoge des Hypothalamus und entwickeln sich aus benachbarten, bilateralen Plakoden, die aus dem dorsomedialen Neuroektoderm des embryonalen Kopfbereiches hervorgehen (Younossi-Hartenstein *et al.*, 1996). Im späten Embryo werden beide Plakoden Teil des dorsomedialen Gehirncortexes. Einige Neuronen, die aus diesen Plakoden entstehen, bilden die NSC, während andere Neuronen sich beispielsweise zu Interneuronen entwickeln (Martelli *et al.*, 2017; Terhzaz *et al.*, 2007). Die Entstehung von Neuronen aus Plakoden beschreibt eine evolutionsgeschichtlich ältere Weise der Neurogenese im Vergleich zu neuronalen Strukturen, die

aus Neuroblasten entstehen (Hartenstein, 2006). Zwei weitere benachbarte Plakoden exprimieren das Homeoboxgen *DRx* (Davis *et al.*, 2003) und entwickeln sich zu einem Teil des Protocerebrums, das PI und PL umgibt. Die Ansammlung der NSC von PI und PL werden aufgrund ihrer Lage im Gehirn als mediale neurosekretorische Zellen (MNC, Abb. 5.3, dunkelblau) bzw. laterale neurosekretorische Zellen (LNC, Abb. 5.3, dunkelrot) bezeichnet.



**Abbildung 5.3: Grafische Darstellung des neuroendokrinen Systems von *Drosophila* im dritten Larvalstadium (A) sowie im adulten Tier (B).** Zur Verdeutlichung der örtlichen Nähe der Otp-positiven Lineages DPLc4 und DPL1–3 zu den neurosekretorischen Zellen zeigen die rechte larvale Hemisphäre (A) sowie die rechte Hälfte des adulten Gehirns (B) eine Otp-Immunfluoreszenzfärbung (rot) des jeweils relevanten Querschnitts durch das Gehirn in der dorsal (d) - ventral (v) - Achse (A) bzw. der anterior (a) - posterior (p) - Achse (B). Zur Veranschaulichung der Gehirnstrukturen sind außerdem die Markerproteine Neurotactin (Nrt, A) bzw. Bruchpilot (Brp, B) in grün gezeigt. (A) Das neuroendokrine System der L3-Larve besteht aus den neuroendokrinen Zellclustern *Pars intercerebralis* (PI, dunkelblau), deren Zellen als mediale neurosekretorische Zellen (MNC) bezeichnet werden, und *Pars lateralis* (PL, dunkelrot), deren Zellen laterale neurosekretorische Zellen (LNC) genannt werden. Die Axone dieser Zellen (lila) projizieren zur Aorta (dunkelgrau), dem Hauptzirkulationsgefäß, sowie einem Set an peripheren, endokrinen Drüsen, der *Corpora cardiaca* (CC, hellblau), der *Corpora allata* (CA, orange) und der Prothoraxdrüse (PTG, gelb), die gemeinsam als Ringdrüse bezeichnet werden und die Aorta umschließen. Des Weiteren projizieren Axone über Oesophagus und Proventriculus zum Mitteldarm (hellgrau). (B) Die Axone (lila) von MNC (dunkelblau) und LNC (dunkelrot) fusionieren noch im Gehirn zu den *Nervii Corpora cardiaca* (NCC) und außerhalb des Gehirns zum Rekurrenznerve (RN). Dieser versorgt CC (hellblau), CA (orange) und das Zirkulationssystem (Aorta, dunkelgrau), wonach die Axone weiter zum Kropf (grau) und zum Mitteldarm (hellgrau) geleitet werden.

In der Larve projizieren die Axone der NSC von PI und PL zum Zirkulationssystem und zu einem Set von endokrinen Drüsen in der Peripherie, die zu einem Komplex fusioniert das Ende des dorsalen Zirkulationsgefäßes, der Aorta, umringen (Siga, 2003). Dieser Komplex, Ringdrüse genannt, besteht aus den endokrinen Drüsen *Corpora cardiaca* (CC, Abb. 5.3 A, hellblau), *Corpora allata* (CA, Abb. 5.3 A, orange) und Prothoraxdrüse (PTG, Abb. 5.3 A, gelb). CC und CA funktionieren als neurohemale

Organe, stehen also mit dem Hämolympfen-Zirkulationssystem in Verbindung, in das sie Neurohormone freisetzen (Veelaert *et al.*, 1998; Siegmund und Korge, 2001) und gelten als *Drosophila*-Analoga zur Hypophyse. Diese Freisetzung wird wiederum durch die Neuropeptid-Hormone aus den MNC und LNC der PI und PL gesteuert (Nässel und Zandawala, 2019).

Die hormonproduzierenden sekretorischen Zellen der CC stellen hauptsächlich das adipokinetische Hormon (AKH) her, das in die Hämolymphe abgegeben wird, um Lipide und Kohlenhydrate zu mobilisieren (O'Shea und Rayne 1992; Noyes *et al.*, 1995; Veelaert *et al.*, 1998; Nässel 1999; Oudejans *et al.*, 1999). In der CA wird vor allem das juvenile Hormon (JV) produziert, das ein Fettsäurederivat mit Effekten auf die Eientwicklung, das larvale Wachstum, die Metamorphose und das Reproduktionsverhalten darstellt (Veelaert *et al.*, 1998; Vullings *et al.*, 1999; Gilbert *et al.*, 2000). Die LNC der PL üben eine positive oder negative Kontrolle auf die JH-Produktion aus, indem sie zum Beispiel Allatostatin freisetzen, das wiederum die JH-Freisetzung inhibiert (Stay *et al.*, 1996; Stay 2000; Siga, 2003). Die PTG besteht aus bilateralen Ansammlungen großer Drüsenzellen, die ein polyhydroxyliertes Steroid-Prohormon synthetisieren und sekretieren, das zum Haupt-Metamorphosehormon Ecdyson umgesetzt werden kann (Bollenbacher *et al.*, 1975; Gilbert *et al.*, 1997). Ecdyson leitet die Umwandlung von Larve zu Puppe ein und ist während der Metamorphose für die komplexe Umgestaltung der Larvalen zu den adulten Organen und Strukturen verantwortlich. Anschließend degeneriert die PTG, während CC und CA auch im adulten Tier weiterbestehen (Dai und Gilbert, 1991).

Im adulten Gehirn bilden die MNC der PI (Abb. 5.3 B, dunkelblau) eine ungepaarte Ansammlung von NSC und sind dorsal des Zentralkomplexes zwischen den beiden *Mushroom Bodies* (MBs) lokalisiert (Siga, 2003; Ludwig *et al.*, 2002). Die LNC der PL (Abb. 5.3, dunkelrot) liegen lateral zur PI-Region (Siegmund und Korge, 2001). Je nach Neuropeptidproduktion und -sekretion lassen sich die MNC und LNC in weitere Zellgruppen unterteilen (Davie *et al.*, 2018; Trapnell, 2015). So sekretieren beispielsweise die Insulin-produzierenden Zellen (IPC) der PI das *Drosophila* Insulin-like Peptid (DILP) mit Funktionen im Metabolismus, in der Nahrungsaufnahme, bei Stress und in der Reproduktion (Brogiolo *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2016; Nässel und Vanden Broeck, 2016), während die Glukose-erfassenden dorsal-lateral-protocerebralen Zellen (DLP) der PL Corazonin (CRZ) sekretieren, das die DILP-Freisetzung durch Regulation der IPC kontrolliert (Kapan *et al.*, 2012; Oh *et al.*, 2019), aber auch auf die CC, den Metabolismus und bei Stressantworten wirkt (Diesner *et al.*, 2018; Kapan *et al.*, 2012). Die DH44-produzierenden Neurone (DH44n) der PI bilden das diuretische Hormon 44 (DH44), das vor allem bei der osmotischen Homöostase eine Rolle spielt (Cabrero *et al.*, 2002; Dus *et al.*, 2015). Auch das Ionentransport-Peptid (ITP) der ITPn (ITP-produzierende Neurone) der PL wirkt bei der osmotischen Homöostase, aber auch im Metabolismus und während der Stressantworten mit

(Zandawala *et al.*, 2018). Die Axone der NSC von PI und PL (Abb. 5.3 B, lila) schließen sich zunächst zu einem paarigen Nerv, den *Nervii Corpora Cardiaca* (NCC), zusammen und fusionieren dann außerhalb des Gehirns zum Rekurrenznerve (RN). Hierüber werden sie dann zu CC (Abb. 5.3 B, hellblau) und CA (Abb. 5.3 B, orange) geleitet. Nach der Versorgung des Zirkulationssystems (Aorta, Abb. 5.3 B, dunkelgrau) sowie von CC und CA verlaufen die NSC-Axone weiter in den Kropf-Nerv, der terminal über dem Kropf verzweigt (Abb. 5.3 B, grau), und über den intestinalen Nerv, der zum anterioren Mitteldarm (Abb. 5.3 B, hellgrau) leitet (Nässel und Zandawala, 2019; Rulifson *et al.*, 2002).

Otp ist im Säuger offensichtlich essentiell für die Differenzierung neurosekretorischer Zellen in einigen Bereichen des Hypothalamus. Die neurosekretorischen Zellen im Gehirn von *Drosophila*, die die beiden Gehirnbereiche PI und PL bilden, entwickeln sich aus Plakoden, was evolutiv betrachtet einen älteren Vorgang darstellt, verglichen mit der Zelllineage-Entwicklung (Hartenstein, 2006). Da die Otp-Expression im *Drosophila*-Gehirn eindeutig einigen Lineages zugeordnet werden konnte, ist eine Expression von Otp in den Plakoden, die während der Entwicklung die neurosekretorischen Zellen von PI und PL hervorbringen, ausgeschlossen. Dennoch ist die Lage der Otp-positiven Lineages DPL1–3 und DPLc4 sowohl im larvalen als auch im adulten Gehirn sehr interessant, da die Otp-Expression in diesen Lineages in enger räumlicher Nähe besonders zu den PL-Bereichen lokalisiert auftritt (siehe Abb. 5.3).

Zur Regulation der Nährstoffversorgung und des Metabolismus steht das neuroendokrine System auch eng mit den sensorischen Systemen, wie beispielsweise dem olfaktorischen System, in Verbindung. Dabei sind die neurosekretorischen Zellen der PL über polysynaptische, die der PI über monosynaptische Wege mit den sensorischen Organen verbunden (Miroshnikow *et al.*, 2018; Schlegel *et al.*, 2016). Wie bereits beschrieben bilden die Otp-positiven Lineages BAMv3, BALc und BALp4 drei der fünf Lineages, die die Interneurone des olfaktorischen Systems von *Drosophila* hervorbringen. Die Axone dieser Lineages projizieren auch in höhergelegene Gehirnzentren und so ist ein Einfluss auf PI und PL aus dieser Richtung nicht auszuschließen.

Im Säuger spielt Otp eine wichtige Rolle während der Entwicklung der Somatostatin-produzierenden Zellen des Hypothalamus (Bedont *et al.*, 2015; Michaud *et al.*, 1998). Somatostatin, das in den entsprechenden Zellen des Hypothalamus produziert wird, hemmt das Wachstumshormon (GH), es wird aber auch von pankreatischen  $\delta$ -Zellen ausgeschüttet und inhibiert während der Verdauung die Freisetzung von Insulin und Glukagon durch die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Zellen des Pankreas (Moede *et al.*, 2020). Auch das Somatostatin-homologe Hormon in *Drosophila*, Allatostatin, ist an der Regulation der Nahrungsaufnahme und der metabolischen Homöostase beteiligt und wird sowohl im Gehirn als auch im Mitteldarm produziert (Chen *et al.*, 2016; Kubrak *et al.*, 2022). Allatostatin wird bei Nährstoffmangel freigesetzt und signalisiert den AKH-sekretierenden Zellen der CC, die den

pankreatischen  $\alpha$ -Zellen analog gesetzt werden, gespeicherte Lipide und Kohlenhydrate durch die Ausschüttung von AKH zu mobilisieren (Kubrak *et al.*, 2022). Die Allatostatin-produzierenden enteroendokrinen Zellen zeichnen sich allerdings durch die Expression des Transkriptionsfaktors Prospero aus (Hung *et al.*, 2020; Reiher *et al.*, 2011) und liegen auch sonst nicht in räumlicher Nähe zu den Otp-exprimierenden Zellen im Enddarm von *Drosophila*, weshalb eine Beteiligung von Otp hier eher unwahrscheinlich ist.

Auch im Menschen wird OTP im Hypothalamus exprimiert und wirkt vermutlich bei der neuroendokrinen Hirnfunktion mit (Lin *et al.*, 1999). Im humanmedizinischen Kontext zeigt OTP einen hohen diagnostischen Wert bei neuroendokrinen Tumoren der Lunge, die in den letzten Jahrzehnten immer häufiger zu beobachten sind (Caplin *et al.*, 2015). OTP ist normalerweise im Zellkern lokalisiert (nukleäres OTP, nOTP), kann aber auch im Cytoplasma (cOTP) detektiert werden oder so stark herunterreguliert sein, dass keine Detektion möglich ist. Bei Patienten mit nOTP sind günstige Krankheitsverläufe zu beobachten, Patienten mit cOTP zeigen mittelmäßige Krankheitsverläufe, und bei Betroffenen mit schlechten Überlebenschancen fällt eine starke Herunterregulation von OTP auf (Swarts *et al.*, 2013a; 2013b).

Otp konnte also bereits in zahlreichen Organismen von *Drosophila* bis hin zum Menschen nachgewiesen werden (Di Bernardo *et al.*, 1999; Lin *et al.*, 1999; Simeone *et al.*, 1994; Umesono *et al.*, 1997; Wang und Lufkin, 1997). In Vertebraten spielt es eine wichtige Rolle während der Entwicklung des Hypothalamus und somit für das neuroendokrine System. In *Drosophila* konnte Otp noch nicht mit dem endokrinen System in Verbindung gebracht werden, doch das beobachtete Otp-Expressionsmuster benachbart zu den neuroendokrinen Bereichen PI und PL könnte sowohl im larvalen als auch im adulten Gehirn auf einen Zusammenhang hindeuten.

## 5.4 Verifizierung des *otp*-Punktmutationsstammes *otp*<sup>1024</sup> durch Sequenzierung

Um die Funktion von *otp* zu analysieren, wurde mittels *Genetargeting* die *otp*-Mutante *otp*<sup>GT</sup> hergestellt (Hildebrandt *et al.*, 2020). Gleichzeitig wurden durch Defizienzkreuzungen und Phänotypen-Beobachtung die zwei mutanten *otp*-Stämme *otp*<sup>1024</sup> und *otp*<sup>13064</sup> innerhalb EMS-induzierter Mutantenstämme identifiziert. Während *otp*<sup>GT</sup> molekular eindeutig definiert wurde, sollten *otp*<sup>1024</sup> und *otp*<sup>13064</sup> ebenfalls auch molekular als *otp*-Mutanten nachgewiesen werden. Im *Genetargeting*-Stamm *otp*<sup>GT</sup> fehlt der 3'-Bereich von Exon 4 und das gesamte Exon 5 von *otp*, woraus eine N-terminale Deletion des Proteins Otp-PC resultiert, dessen Homeodomäne größtenteils fehlt



(s. Abb. 4.3 A). Nach erfolgreicher Sequenzierung des Stammes *otp*<sup>1024</sup> konnte festgestellt werden, dass durch die Punktmutation ein Stopp-Codon im C-terminalen Bereich der Homeodomäne entsteht, sodass in dem Protein zwar fast die gesamte Homeodomäne vorhanden ist, allerdings der C-terminale Teil des Proteins fehlt (s. Abb. 4.3 B). In Immunfluoreszenzfärbungen ist in beiden molekular definierten Stämmen keine Otp-Expression nachweisbar. Da der verwendete Antikörper im C-terminalen Bereich von Otp bindet, ist aufgrund des Fehlens des C-Terminus des Proteins Otp<sup>1024</sup> in diesem Stamm keine Otp-Immunfluoreszenzfärbung möglich. In Embryonen des *Genetargeting*-Stammes dagegen ist Otp nicht nachweisbar, da das Protein aufgrund der Deletion des Translationsstarts vermutlich nicht gebildet wird. Auch in Embryonen des Stammes *otp*<sup>13064</sup> ist keine Otp-Färbung zu sehen. Für diesen Stamm konnte allerdings keine Mutation in den Exons von *otp* detektiert werden. Auch die *Splicesites* liegen intakt vor, allerdings könnte durch die EMS-generierte Punktmutation eine kryptische *Splicesite* eingeführt worden sein (Abramowicz und Gos, 2018). Durch die Generierung kryptischer *Splicesites* können Mutationen Pseudo-Exons hervorrufen, wie es häufig innerhalb humaner genetischer Störungen wie Neurofibromatose Typ I (NFI) (Messiaen und Wimmer, 2008) oder zystischer Fibrose (CF) (Sanz *et al.*, 2017) zu beobachten ist. Des Weiteren könnte auch eine Mutation innerhalb einer regulatorischen Region von *otp* vorliegen.

Alle drei Stämme zeigen embryonale Letalität mit einem starken Enddarm-Phänotyp, der vergleichbar mit dem *brachyenteron* (*byn*)-Phänotyp ist. *Byn* reguliert *otp* während der Enddarmentwicklung direkt, wobei der Verlust von *otp* schwerwiegender scheint, verglichen mit den drei transkriptionellen Regulatoren *drumstick*, *bowl* und *lines*, die für die Zellmusterung und -neuanordnung während der Verlängerung des Enddarms essentiell sind (Iwaki *et al.*, 2001).

Eine Darm-spezifische Funktion wie in *Drosophila* ist für *otp*-Gene höherer Organismen nicht bekannt. Hier nimmt *otp* besonders die bereits beschriebenen Funktionen während der Entwicklung des Nervensystems, insbesondere des Hypothalamus, ein (s. Kapitel 5.3).

## 5.5 Die Expression der Transkriptvarianten *otp*-RC und *otp*-RE in Embryo, Larve und Fliege

Es konnte bereits gezeigt werden, dass die beiden *otp*-Transkriptvarianten *otp*-RC und *otp*-RE im Embryo gewebespezifisch im Enddarm und den Analplatten bzw. im Nervensystem exprimiert werden (Hildebrandt *et al.*, 2020). Die innerhalb dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zur Überprüfung der gewebespezifischen Expression von *otp*-RC und *otp*-RE bestätigen eine

gewebespezifische Expression im Embryo und liefern neue Erkenntnisse der transkriptspezifischen Expressionen im Larval- und Adultstadium.

Zunächst wurde der Otp-PE-spezifische Antikörper Otp-PE hergestellt und innerhalb von Immunfluoreszenzfärbungen an Embryonen verwendet (s. Abb. 4.4 und Abb. 4.5), um die gewebespezifische, embryonale otp-RE-Expression, die bisher auf RNA-Ebene in *in situ* Hybridisierungsexperimenten beobachtet wurde (Hildebrandt et al., 2020), auch auf Proteinebene zu untersuchen. Dieser Antikörper bestätigt die nervensystemspezifische Expression von otp-RE im Embryo, die bisher mittels *in situ* Hybridisierung auf mRNA-Ebene gezeigt wurde (Hildebrandt et al., 2020), auch auf Proteinebene. Leider gestaltete sich die Anwendung des Antikörpers Otp-PE als schwierig, was darauf zurückzuführen sein könnte, dass der Otp-PE-spezifische Teil des Proteins nur 108 AS umfasst (s. Abb. 4.4 A) und damit eine relativ kleine Bindestelle für den Antikörper darstellt, die zusätzlich auch nicht gut zugänglich sein könnte. Möglicherweise könnten eine Aufreinigung des Antikörpers oder eine Signalverstärkung durch Tyramid-Signal-Amplifikation dabei helfen, unspezifische Hintergrundfärbung zu minimieren und so das relativ schwache Signal etwas zu verdeutlichen. Andere Fixierungs- und Färbeprotokolle könnten außerdem dabei behilflich sein, auch in larvalen und adulten Geweben ein Signal zu erhalten, was in dieser Arbeit nicht gelungen ist.

Um eine gewebespezifische Expression der beiden Transkriptvarianten im Larval- und Adultstadium zu untersuchen, wurden qPCR-Experimente mit transkriptspezifischen Primern auf cDNA, die aus der RNA von larvalen sowie adulten Gehirnen oder Enddärmen resultierte, durchgeführt (s. Abb. 4.6). Die Auswertung der erhaltenen qPCR-Daten zeigt, dass otp-RC auch in Larve und Fliege gewebespezifisch nur im Darm exprimiert wird und im Gehirn nicht nachweisbar ist. Dagegen tritt otp-RE neben der Expression im Gehirn auch im larvalen und adulten Enddarm auf. Im larvalen Enddarm zeigt sich eine sogar um das 29-fache stärkere Expression im Vergleich zum larvalen Gehirn, die damit auch über der Expression von otp-RC liegt, das im larvalen Enddarm 24-fach konzentrierter als otp-RE im larvalen Gehirn nachweisbar ist. Im adulten Tier wird Otp am stärksten im Enddarm durch das Transkript otp-RC exprimiert, das etwa 3-fach konzentriert im Vergleich zu otp-RE im adulten Gehirn und doppelt konzentriert im Vergleich zu otp-RE im adulten Enddarm auftritt.

Zur weiteren Untersuchung der *otp*-Transkriptvarianten und zur Visualisierung der qPCR-Experimente wurde ein *otp*-RE *Genetargeting*-Stamm mit Deletion im Bereich des Translationsstarts von otp-RE verwendet (Hildebrandt, 2015). Unter der Annahme, dass bei Verlust des Translationsstarts von otp-RE kein Otp-PE mehr gebildet wird, war zu erwarten, dass eine Otp-Immunfluoreszenzfärbung zumindest im Embryo kein Signal hervorbringt. Überraschenderweise zeigte sich die Otp-Expression im *Genetargeting*-Stamm otp<sup>REGT</sup> im embryonalen und adulten Gehirn wildtypisch und auch zum Großteil im larvalen Gehirn (s. Abb. 4.8). Eine Ausnahme bildet hier die

Lineage DM5, die in der larvalen Hemisphäre des Stammes  $otp^{REGT}$  nur vereinzelte Otp-positive Zellen aufweist. Diese Reduktion der Otp-Färbung innerhalb der DM5-Lineage ist auch in larvalen Gehirnen zu sehen, die CRISPR/Cas9-induzierte Indels (Insertionen und Deletionen) in Exon 4 von *otp* im Genom tragen (Hildebrandt *et al.*, 2022a). Die Cas9-Schnittstelle wurde dabei so gewählt, dass sie im 5'-Bereich des Exons noch vor dem Translationsstart der kürzeren Transkriptvarianten liegt, was zur Folge hat, dass nur die längeren Transkriptvarianten durch die Indels betroffen sind. Eine mögliche Erklärung für die größtenteils wildtypische Otp-Verteilung in  $otp^{REGT}$  könnte darin liegen, dass das Transkript *otp-RE* trotz der Deletion des Translationsstarts in Exon 2 vermutlich noch gebildet wird. Da der Translationsstart zur Herstellung von Otp-PE durch die Deletion allerdings fehlt, wird möglicherweise auf den nächstliegenden Translationsstart ausgewichen, der in Exon 4 liegt und eigentlich den Translationsstart von *otp-RC* darstellt. Otp-PE und Otp-PC unterscheiden sich im N-Terminus (s. Abb. 4.5). Die Funktion der unterschiedlichen N-Termini ist unbekannt, aber es ist möglich, dass in diesem Fall Otp-PC Otp-PE im Nervensystem funktionell ersetzt. An dieser Stelle wäre es interessant gewesen, den Antikörper Otp-PE auf larvale und adulte Gehirne von  $otp^{REGT}$  anzuwenden, um zu überprüfen, ob auch mit diesem für die längere Proteinvariante spezifischen Antikörper eine Färbung zu sehen ist, oder ob es sich wie vermutet um die kürzere Proteinvariante handelt, die in diesem Fall aus dem längeren Transkript mit Deletion im eigentlichen Translationsstart resultiert. Des Weiteren könnte ein RT-qPCR-Experiment, analog zur Untersuchung der Transkriptvarianten-Verteilung im Wildtyp (s. Abb. 4.6), auch auf larvale und adulte Gehirne des Stammes  $otp^{REGT}$  angewendet werden. So könnte auf molekularer Ebene überprüft werden, ob die hier beobachtete Otp-Färbung aus dem Transkript *otp-RE* resultiert und somit das Genetargeting-Ergebnis unerwartet ausfiel, oder aus *otp-RC*, auf das in einer Art Rettungsmechanismus beim Fehlen von *otp-RE* übergegriffen wird.

Des Weiteren könnte die verbleibende Otp-Expression auch auf eine noch nicht identifizierte Spleißvariante zurückzuführen sein. Spleißvarianten entstehen aus dem alternativen Spleißen eines Gens, was die Codierungskapazität des Genoms erweitert. Alternatives Spleißen führt zu gewebe- und entwicklungsstadienspezifischen Protein-Isoformen, die unterschiedliche Funktionen innerhalb der Gewebe und der Entwicklung einnehmen. Die mRNAs von etwa 95 % der humanen Gene werden alternativ gespleißt (Wang *et al.*, 2008). Welche regulatorischen Sequenzen innerhalb der pre-mRNAs für alternatives Spleißen benötigt werden und welche Spleißregulatoren daran binden, wurde anfangs vor allem in Studien mit *Drosophila* untersucht. Aus alternativem Spleißen resultierende Protein-Isoformen weisen oft auch unterschiedliche Funktionen auf, wie beispielsweise bei Domino (Dom) zu beobachten, das innerhalb der circadianen Rhythmik eine Rolle spielt (Liu *et al.*, 2019). Hierbei führt das Fehlen der Isoform Dom-A zu einem arrhythmischen Verhalten, während ein Dom-B Knockdown die circadiane Periode verlängert, aber den Rhythmus nicht beeinflusst (Liu *et al.*, 2019).

Alternatives Spleißen ist vor allem in Keimzellen, Muskeln und im Nervensystem zu beobachten. Die Geschlechts-Festlegung in *Drosophila* wird durch eine Kaskade von Spleißfaktoren kontrolliert, die selbst ebenfalls alternativ gespleißt werden (Hartmann *et al.*, 2011). Die Kaskade führt zur geschlechtsspezifischen Expression zweier Varianten des Transkriptionsfaktors Doublesex (Dsx), die jeweils im weiblichen oder männlichen Körper exprimiert unterschiedliche Gene kontrollieren (Hartmann *et al.*, 2011). Im Muskel werden alle Myosin-Schwerketten Isoformen durch ein einziges Gen, *Myosin heavy chain (Mhc)*, codiert. Potentiell können aus diesem Gen durch alternatives Spleißen 480 Protein-Isoformen entstehen, die spezifisch in unterschiedlichen Muskeltypen exprimiert werden und so die spezifischen Kontraktionseigenschaften der jeweiligen Muskeln ermöglichen (Hastings und Emerson, 1991; George *et al.*, 1989; Zhang *et al.*, 2001). Im Zentralnervensystem von *Drosophila* ist ein sehr eindrückliches alternatives Spleißen zu beobachten, das die Zelloberflächenzusammensetzung des Downsyndrom-Zelladhäsionsmolekül (Dscam) kontrolliert. Dscam codiert potentiell über 38.000 verschiedene Protein-Isoformen. Die Oberflächenzusammensetzung der alternativ gespleißten Dscam-Isoformen sorgt für die ordnungsgemäße Organisation der Axone und somit der neuralen Schaltkreise während der Entwicklung des Nervensystems (Schmucker *et al.*, 2000; Hattori *et al.*, 2007). Alternatives Spleißen ist in *Drosophila* sehr ausgeprägt zu beobachten, weshalb die Möglichkeit besteht, dass auch von *otp* noch unbekannte Spleißvarianten existieren.

Der *Genetargeting*-Stamm *otp*<sup>REGT</sup> eignet sich gut, um *otp* weitergehend zu untersuchen. Durch verschiedene Kreuzungen wurde zwar der Großteil des verwendeten Targetingvektors pTV[cherry] (s. Abb. 2.3) wieder aus dem Genom entfernt, dennoch bleibt eine *attP-Site* an der durch die gewünschte Deletion definierten Stelle bestehen (Baena-Lopez *et al.*, 2013). Diese *attP-Site* bietet die Möglichkeit, mithilfe der PhiC31-vermittelten Transformation Reporter- oder cDNA-tragende Integrationsvektoren mit *attB-Site* für weitere Versuche ortsspezifisch im Genom einzubringen und durch das endogene regulatorische System von *otp* exprimieren zu lassen. Inzwischen wurde der Targetingvektor pTV[cherry] weiterentwickelt, um in Kombination mit der CRISPR/Cas9 Methodik zur Untersuchung und Manipulation von Genfunktionen beizutragen (Poernbacher *et al.*, 2019; Hoppe und Ashe, 2021).

Innerhalb dieser Arbeit wurde ein *otp*-Gal4-Stamm verwendet, der aus einer Integration von Gal4 in die *attP-Site* von *otp*<sup>REGT</sup> resultierte (s. Abb. 4.7). Dieser stellte sich als spezifischer *otp*-RE-Gal4-Stamm heraus, da die über UAS-Stellen aktivierten Reporterproteine mRFP1 bzw. GFP im Embryo analog zu *in situ* Hybridisierungen nicht im Darm, sondern nur im Nervensystem nachweisbar waren (s. Abb. 4.9). Zudem bietet die beobachtete Färbung sowohl von mRFP1 als auch von GFP ein weiteres Indiz dafür, dass im embryonalen Ventralnervensystem posttranskriptionelle Regulation

stattfindet, da die Reporterproteine in allen Segmenten des Ventralnervensystems zu beobachten waren. Somit wird die Reporterproteinexpression nicht von der posttranskriptionellen Regulation von *otp* beeinflusst. Das deckt sich mit den *in situ* Hybridisierungen und steht im Gegensatz zur Otp-Proteinexpression, die nur in den anterioren Segmenten auftritt.

Die Expression von  $otp^{REGal4}$  und den jeweiligen Reporterproteinen in der Larve liefert einen weiteren Hinweis darauf, dass *otp*-RE nicht mehr gewebespezifisch nur im Nervensystem, sondern bereits ab dem Larvalstadium L1 (nicht gezeigt) auch im Enddarm und den Analplatten exprimiert wird (s. Abb. 4.10). Die *otp*-Expression wird im embryonalen Enddarm über ein regulatorisches Element aktiviert, das 950 bp entfernt vor dem Transkriptionsstart der kürzeren *otp*-Transkriptvarianten liegt und 1,8 kb umfasst (Kusch *et al.*, 2002). Innerhalb dieses regulatorischen Elements sind 15 Bindestellen für das T-Box-Gen *brachyenteron* (*byn*) nachgewiesen, das essentiell für die Entwicklung des embryonalen Enddarms ist und *otp* als direktes Zielgen aktiviert (Kusch *et al.*, 2002). Es ist unwahrscheinlich, dass die *otp*-RE-Expression im larvalen Enddarm von demselben regulatorischen Element angeschaltet wird, sodass mindestens ein weiteres regulatorisches *otp*-Enddarm-Element während des Übergangs vom Embryonal- zum Larvalstadium existent sein und aktiv werden muss. Obwohl noch ein weiteres, mögliches regulatorisches Element identifiziert wurde, wurde von Kusch *et al.* nur das beschriebene Enddarm-Element genauer untersucht (Uwe Walldorf, persönliche Mitteilung). Somit wäre es sehr interessant, die Regulation der *otp*-RE-Expression während des embryonal-larvalen Übergangs zu untersuchen.

Im larvalen Rektum tritt ein Unterschied zwischen der Otp-Expression und der  $otp^{REGal4}$ -regulierten Reporterproteinexpression auf (s. Abb. 4.10). Auch hier scheint die *otp*-Expression, ähnlich wie im embryonalen Ventralnervensystem, posttranskriptionell reguliert zu werden, denn das Reporterprotein ist nachweisbar, während das Otp-Protein nicht zu sehen ist. Auch im larvalen Gehirn ist solch ein Unterschied zu beobachten. Die Otp-Expression ist nur in den thorakalen Segmenten zu sehen, während die  $otp^{REGal4}$ -regulierte Reporterproteinexpression auch in den abdominalen Segmenten nachweisbar ist. Das deutet darauf hin, dass die Otp-Färbung hier nicht aufgrund eines Verlustes der entsprechenden Zellen fehlt, sondern dass tatsächlich eine posttranskriptionelle Regulation von *otp* stattfindet. In den larvalen Hemisphären stellten sich die Otp- und die Reporterexpression deckungsgleich dar.

Im Gegensatz zum Larvalstadium erwiesen sich sowohl im adulten Gehirn als auch im adulten Enddarm und Rektum die Otp- und die  $otp^{REGal4}$ -regulierte Reporterproteinexpression als deckungsgleich (s. Abb. 4.11). Das GFP-Reporterprotein zeigt die Axone der Otp-positiven Lineages. Besonders hervorzuheben ist der innere antennocerebrale Trakt (iACT), der zum Großteil aus den Projektionsneuronen der Otp-positiven Lineages BAMv3, BALc und BALp4 gebildet wird und über

welchen olfaktorische Informationen aus den AL in die Calyx (CA) der MB und die LH weitergeleitet werden.

Nachdem mittels *in situ* Hybridisierungen festgestellt wurde, dass *otp*-RE und *otp*-RC im Embryo gewebespezifisch im Nervensystem (*otp*-RE) bzw. im Enddarm und den Analplatten (*otp*-RC) exprimiert werden (Hildebrandt *et al.*, 2020), konnte mithilfe des *otp*-RE-spezifischen Gal4-Stammes sowohl eine Bestätigung der gewebespezifischen *otp*-RE-Expression im Embryo erhalten werden, als auch ein weiterer Hinweis darauf, dass *otp*-RE in Larve und Fliege nicht mehr nur im Nervensystem, sondern auch im Enddarm und Rektum exprimiert wird. Somit rundet die Analyse mithilfe des *otp*<sup>REGal4</sup>-Stammes die Untersuchung der *otp*-Transkriptexpression ab.

Der hergestellte *otp*<sup>REGal4</sup>-Stamm kann in Zukunft auch für die Missexpression von Genen in einem *otp*-abhängigen Muster mithilfe des UAS/Gal4-Systems (Brand und Perrimon, 1993) verwendet werden, oder in Kombination mit RNAi-Stämmen der VDRC (Dietzl *et al.*, 2007) und der Harvard Universität (Perkins *et al.*, 2015), um Gene mithilfe des RNAi-Mechanismus herunterzuregulieren.

Diese Ergebnisse zeigen einstimmig, dass *otp*-RE in Larve und Fliege nicht mehr gewebespezifisch nur im Nervensystem exprimiert wird, sondern zusätzlich auch im Enddarm und Rektum, während *otp*-RC weiter gewebespezifisch nur im Enddarm und Rektum nachweisbar ist. Der Verlust der *Otp*-RE-Expression scheint nicht in einer dramatischen Veränderung des Enddarmes oder von Gehirnstrukturen zu resultieren, hat aber möglicherweise Einfluss auf das olfaktorische System oder auf weitere Prozesse im Gehirn, wie beispielsweise Lernen und Gedächtnis.

## 5.6 Interaktion der microRNA miR-252 mit *otp*

Im embryonalen Ventralnervensystem, im larvalen Hirnstamm und möglicherweise auch im larvalen Rektum liegt eine posttranskriptionelle Regulation von *otp* vor (s. Abb. 4.5, 4.9 und 4.10). Ursächlich hierfür könnte die Interaktion einer oder mehrerer microRNAs (miRNAs) mit *otp* sein. Die 21 bis 24 nt langen miRNAs interagieren mithilfe ihrer individuellen, 2 bis 8 nt langen, sogenannten *seed*-Sequenz größtenteils mit der 3'UTR (O'Brien *et al.*, 2018), seltener mit der 5'UTR (Ørom *et al.*, 2008) ihrer Ziel-mRNA. Infolgedessen wird diese je nach Sequenzübereinstimmung abgebaut oder destabilisiert (Bagga *et al.*, 2005; Lim *et al.*, 2005; Wu und Belasco, 2008).

Generell stehen verschiedenste Methoden zur Verfügung, um miRNAs zu identifizieren und ihre Expression nachzuweisen. Eine miRNA-Identifikation kann beispielsweise über einen Northern Blot oder die Klonierung und Sequenzierung kleiner RNAs erfolgen, die zum Beispiel aus sogenannten

*small RNA libraries*, also bibliothekarischen Sammlungen kleiner RNAs, stammen können (Berezikov *et al.*, 2011; Ruby *et al.*, 2007). Durch *in situ* Hybridisierung auf primäre miRNA Transkripte (Aboobaker *et al.*, 2005) oder reife miRNAs (Sokol und Ambros, 2005) kann die räumliche und zeitliche Expression von miRNAs, allerdings nicht ihre Aktivität untersucht werden. Innerhalb von Enhancer-Trap-Experimenten können mithilfe von P-Elementen regulatorische Regionen von miRNAs identifiziert werden, die teilweise viele kb von der miRNA-*hairpin*-Sequenz entfernt liegen können. So liegt ein Promotor von *bantam*, der ersten in *Drosophila* nachgewiesenen miRNA (Brennecke *et al.*, 2003), 14 kb (Peng *et al.*, 2009), ein Promotor der miRNA 278 sogar 45 kb (Nairz *et al.*, 2006) von der jeweiligen *hairpin*-Sequenz entfernt. Ebenfalls ermöglicht die Herstellung von Enhancer-Reporter-Transgenen, beispielsweise durch die Integration von Gal4 in einen miRNA-Lokus, eine Untersuchung der Expression von miRNAs. Erstmals wurde diese Methode in *Drosophila* benutzt, um die Expression der miRNA 278 zu untersuchen, die eine wichtige Rolle bei der Energiehomöostase spielt (Teleman *et al.*, 2006).

Um miRNA-Aktivität *in vivo* zu beobachten, können genetisch codierte Sensoren verwendet werden. Diese Sensoren funktionieren nach dem gleichen Prinzip, können aber unterschiedlich aufgebaut sein. Für den Nachweis der Kontrolle und Regulation des proapoptotischen Gens *head involution defective (hid)* durch die miRNA *bantam* wurde beispielsweise ein GFP-Sensorkonstrukt verwendet, das in allen Zellen exprimiert wurde (Brennecke *et al.*, 2003). Dieses bestand aus einem Tubulin-Promotor und GFP, das an eine 3'UTR mit zwei perfekten *bantam*-Interaktionssequenzen fusioniert vorlag. Die Interaktion von *bantam* mit der 3'UTR des Sensors führte zu einer Herunterregulation der ubiquitären GFP-Expression in allen Zellen und Geweben, in denen *bantam*-Aktivität auftrat. Sensoren mit dem gleichen Aufbau wurden beispielsweise auch verwendet, um Zellen und Gewebe zu identifizieren, die miRNA 14- (Varghese *et al.*, 2010) sowie miRNA 12-, 283- und 304- (Friggi-Grelin *et al.*, 2008) positiv sind. So konnten Hinweise darauf gefunden werden, dass eine miRNA 14-Aktivität in den insulinproduzierenden neurosekretorischen Zellen des adulten *Drosophila*-Gehirns vorliegt und durch die Interaktion mit der direkten Ziel-mRNA des Zinkfingerproteins Sugarbabe die Insulin-Produktion und der Metabolismus reguliert wird (Varghese *et al.*, 2010). Den drei miRNAs 12, 283 und 304 konnte eine Funktion innerhalb des Hedgehog-Signalwegs nachgewiesen werden, wobei die Sensor-Experimente anhand der Stärke der GFP-Intensität auch Hinweise auf die Stärke der jeweiligen miRNA-Aktivität gaben (Friggi-Grelin *et al.*, 2008).

Eine weitere Möglichkeit besteht darin, die spezifische 3'UTR eines zu untersuchenden Gens innerhalb des Sensor-Konstrukts mit der GFP-Sequenz zu fusionieren und so die Interaktion einer spezifischen miRNA mit ihrer direkten *in vivo* Ziel-mRNA nachzuweisen (Bejarano *et al.*, 2010). Hierzu kann außerdem mithilfe des UAS/Gal4-Systems (Brand und Perrimon, 1993) ein UAS-Konstrukt mit

spezifischer miRNA innerhalb eines bestimmten Gewebes fehlexprimiert werden. Auf Grundlage eines solchen Experiments konnte die miRNA 252 als einzige aus einer Gruppe potentiell interagierender miRNAs als mit der 3'UTR von *otp* interagierend identifiziert werden (Hildebrandt, 2015). Hierbei wurde ein UAS-miR-252-Konstrukt im Hintergrund eines ubiquitären GFP-Sensors mit *otp* 3'UTR mithilfe des Treiberstammes *en*-Gal4 im posterioren Teil der Flügel-Imaginalscheibe fehlexprimiert, woraufhin eine deutliche Reduktion der GFP-Intensität in diesem Bereich zu beobachten war (Hildebrandt, 2015) (s. Abb. 2.10).

Eine Weiterentwicklung der beschriebenen, ubiquitär exprimierten Sensoren stellen Sensoren dar, die selbst mithilfe des UAS/Gal4-Systems zeit- und ortsspezifisch exprimiert werden (Schertel *et al.*, 2012). Hierzu beinhalten diese Sensoren anstatt des ubiquitären Promotors UAS-Stellen in Verbindung mit einem hsp70-Minimalpromotor, was in einem starken, durch Gal4 induzierbaren Promotor resultiert und zudem eine eGFP-Sequenz fusioniert mit einer spezifischen 3'UTR (Schertel *et al.*, 2012). Auf Grundlage eines solchen Sensors basieren die Experimente zur Verifizierung der Interaktionsstelle von miR-252 mit der 3'UTR von *otp* sowie zur Bestätigung der Interaktion zwischen beiden innerhalb dieser Arbeit. Gleichzeitig kann ein UAS-miRNA-Konstrukt im selben Muster fehlexprimiert werden, sodass eine Interaktion nachgewiesen werden kann (Schertel *et al.*, 2012).

Zur Bestätigung der Interaktion von miR-252 mit der 3'UTR von *otp* und zur Verifizierung der Bindestelle wurden Fliegenstämme hinzugezogen, die Sensorkonstrukte im Genom tragen, innerhalb derer die *otp* 3'UTR entweder wildtypisch, mit Mutation innerhalb der Bindestelle der *seed*-Sequenz oder Deletion der gesamten Bindestelle vorliegt (s. Abb. 4.12). Unter Zuhilfenahme der Treiberstämme *en*-Gal4 und *dpn*-Gal4 konnten die Sensorkonstrukte in Kombination mit einem UAS-miR-252-Konstrukt erfolgreich fehlexprimiert werden. Liegen alle drei Komponenten Sensorkonstrukt, UAS-miR-252-Konstrukt und Gal4-Konstrukt vor, so werden eGFP und die wildtypische oder modifizierte *otp* 3'UTR gemeinsam mit miR-252 im Gal4-vorgegebenen örtlichen und zeitlichen Muster exprimiert. Bei Interaktion von miR-252 und der *otp* 3'UTR kommt es hierbei zur messbaren Herunterregulation der eGFP-Expression. Zur Untersuchung wurden die resultierenden Larven zur Präparation der Flügel-Imaginalscheiben (im Falle der Kreuzung mit *en*-Gal4) und der Gehirne (bei Benutzung von *dpn*-Gal4) bzw. zur Extraktion der RNA für das folgende qPCR-Experiment hinzugezogen.

Bereits die konfokalmikroskopischen Aufnahmen der präparierten und fixierten Flügel-Imaginalscheiben bzw. Gehirne zeigen eindeutig, dass miR-252 mit der *otp* 3'UTR interagiert (s. Abb. 4.13 A–C und F–H). In beiden Fällen weisen die Gewebe, die das Sensorkonstrukt mit wildtypischer *otp* 3'UTR enthalten, eine vergleichsweise schwache GFP-Intensität im durch den jeweiligen Gal4-Stamm vorgegebenen Expressionsmuster auf. Die im selben Expressionsmuster co-



exprimierte miR-252 interagiert also mit der der eGFP-Sequenz nachgeschalteten 3'UTR von *otp*, sodass die eGFP-Expression behindert wird. Im Gegensatz dazu ist in Geweben mit Deletion-enthaltendem Sensorkonstrukt eine starke GFP-Intensität zu beobachten. Die GFP-Intensität in Geweben mit Sensorkonstrukt mit Mutation von drei *otp* 3'UTR-Basen innerhalb der Bindestelle der *seed*-Sequenz liegt im Mittelfeld der GFP-Intensitäten. Dieser visuelle Eindruck wird durch die Bestimmung der relativen Fluoreszenzintensität mithilfe der gemittelten GFP-Intensitäten von je 20 Aufnahmen pro Genotyp und Gewebe mittels ImageJ bestätigt (s. Abb. 4.13 D und I). Hierbei weisen die GFP-Intensitäten der Gehirne einen deutlichen Anstieg von der wildtypischen Sequenz über die Mutation-enthaltende Sequenz bis hin zur Deletion auf, während die der Flügel-Imaginalscheiben eine schwächere Steigung, allerdings in der gleichen Tendenz, zeigen.

Um die GFP-Expression auch auf molekularer Ebene zu untersuchen, wurde ein qPCR-Experiment mit einem eGFP-bindenden Primerpaar durchgeführt (s. Abb. 4.13 E und J). Auch diese Untersuchung bestätigt eine Interaktion der miR-252 mit der 3'UTR von *otp*, da beide Sensorkonstrukte mit veränderter *otp* 3'UTR zu einer erhöhten GFP-Expression führten. Im Unterschied zu der GFP-Intensitätsmessung anhand der Konfokalaufnahmen lassen die qPCR-Ergebnisse auf die höchste GFP-Expression in Larven mit Mutation-enthaltendem Sensorkonstrukt schließen. Die Interaktion von miR-252 mit der 3'UTR von *otp* wird hier zwar bestätigt, allerdings ist die Untersuchung auf visueller Ebene in diesem Fall vermutlich aussagekräftiger, da nicht ausgeschlossen werden kann, dass die Bindung von miR-252 an die mRNA des jeweiligen Sensorkonstrukts die cDNA-Synthese für die qPCR beeinflusst.

Trotz der zufriedenstellenden Ergebnisse der mikroskopischen Beobachtungen und des qPCR-Experiments weisen auch Untersuchungen auf Grundlage von GFP-Sensoren Nachteile auf. Zunächst muss für die Konstruktion des Sensors die reife miRNA-Sequenz bekannt sein, um eine computergestützte Vorhersage treffen zu können, welche 3'UTRs mögliche Zielsequenzen aufweisen könnten. Computergestützte miRNA-Ziel-mRNA-Vorhersagetools, wie TargetScan (Agarwal *et al.*, 2015), MIRZA (Khorshid *et al.*, 2013) oder miRanda-mirSVR (Betel *et al.*, 2010), berücksichtigen unter anderem Sequenz, Struktur und Hybridisierungsenergie der RNA-RNA-Bindung, eignen sich aber weniger zur Identifikation unbekannter miRNAs. Des Weiteren konnte zwar bereits gezeigt werden, dass die Überexpression von miRNAs physiologisch relevante Ziel-mRNAs identifizieren kann (Schertel *et al.*, 2012), ein Nachteil solcher Überexpressionsstudien im Zusammenhang mit miRNAs könnte allerdings dennoch darin bestehen, dass miRNAs, die unnatürlich stark exprimiert werden, auch nichtphysiologische Ziele binden könnten. Außerdem bietet der Ansatz zwar eine gute Visualisierung der miRNA-Aktivität *in vivo*, hat aber aufgrund des relativ langsamen Umsatzes des GFP-Reporters eine begrenzte Kapazität für die zeitliche Untersuchung der miRNA-Dynamik.

Sowohl der ubiquitäre GFP-Sensor (Brennecke *et al.*, 2003) als auch der UAS-GFP-Sensor (Schertel *et al.*, 2012) scheinen durch die jeweiligen miRNAs deutlich stärker herunterreguliert zu werden als der *otp* 3'UTR-Sensor in dieser Arbeit. Die Unterschiede der Regulation der UAS-GFP-Sensoren ist in den Ergebnissen von Schertel *et al.* bereits an den unpräparierten Larven deutlich zu erkennen (Schertel *et al.*, 2012), während in dieser Arbeit die Gewebe präpariert werden mussten, um einen Unterschied in der GFP-Intensität zu erkennen (s. Abb. 4.13). Möglicherweise könnte dafür der sogenannte *down-regulation Score* mirSVR verantwortlich sein, der aufgrund von Sequenz und Struktur der *otp*-mRNA für miR-252 auf -0,69 und somit auf Platz 374 innerhalb der Rangliste der Ziel-mRNAs von miR-252 liegt (www.microrna.org, Stand 09.2017). Insgesamt werden miR-252 1965 potentielle Ziel-mRNAs mit mirSVRs von -2,98 bis -0,0009 zugewiesen, wobei die mRNA des Gens *CG13928*, das bei der Regulation der Translation und der mRNA-Modifikation mitwirkt (Khan *et al.*, 2015), mit einem mirSVR von -2,98 auf Platz 1 der Rangliste steht (www.microrna.org, Stand 09.2017).

Neben GFP-Sensoren erfreuen sich auch Luciferase-Sensoren großer Beliebtheit. Diese enthalten anstatt GFP eine Luciferase-Sequenz vor einer 3'UTR. Luciferase setzt als Enzym mit katalytischer Aktivität ein Substrat um, bei dessen Zerfall Biolumineszenz entsteht, sodass Luciferase durch Zugabe des Substrats zum geeigneten Reporterprotein wird. Der Nachteil von Luciferase-Sensoren gegenüber GFP-Sensoren besteht darin, dass Luciferase-Aktivität erst nach Proteinextraktion aus der Zellkultur oder einer Gewebepräparation nachgewiesen werden kann. Mithilfe von Luciferase-Sensoren wurde beispielsweise eine direkte Interaktion der miRNAs 279 und 996 mit Insensible, einem Inhibitor des Notch-Signalwegs, beobachtet (Kavaler *et al.*, 2018). Weitere Luciferase-Experimente ähneln von ihrem Grundgedanken her sehr der in dieser Arbeit durchgeführten GFP-Sensor-Untersuchung. So wurden zum Nachweis der Interaktion und Bestätigung der miRNA 263 Bindestelle Luciferase-Sensoren hergestellt, die entweder die wildtypische 3'UTR des Gens *hid* oder die 3'UTR mit einer Mutation von zwei Nukleotiden beinhalten (Hilgers *et al.*, 2010). Die Luciferaseaktivität wurde dann anhand der Biolumineszenz nachgewiesen, aber zusätzlich wurde das mRNA-Level auch mithilfe einer qPCR untersucht (Hilgers *et al.*, 2010). Ebenfalls konnte eine Interaktion der miRNA 3 mit der 3'UTR des Transmembranproteins Van Gogh mithilfe von Luciferase-Sensoren mit wildtypischer oder mutierter 3'UTR nachgewiesen werden (Zhou *et al.*, 2018).

Eine weitere Möglichkeit zur Untersuchung von miRNA-mRNA-Interaktionen mithilfe von Sensoren besteht in der Verwendung von Pandan-Sensoren (Aw *et al.*, 2016) oder FASTmir-Sensoren (Huang *et al.*, 2017), die beide auf dem RNA-Aptamer *Spinach* basieren. Das RNA-Gerüst von *Spinach* formt eine Bindestelle für den Fluorophor 3,5-Difluoro-4-Hydroxybenzyliden Imidazolinon (DFHBI), das erst nach der Bindung an das RNA-Gerüst zu fluoreszieren beginnt. Im Pandan-Sensor liegt *Spinach* so

modifiziert vor, dass die DFHBI-Bindestelle erst durch die Interaktion einer spezifischen miRNA mit einer ihr komplementären, der DFHBI-Bindestelle benachbarten Sequenz so stabilisiert wird, dass DFHBI binden kann (Aw *et al.*, 2016). Der Nachteil der Pandan-Sensoren besteht darin, dass die miRNA-mRNA-Interaktion nur nach RNA-Extraktion *in vitro* nachgewiesen werden kann (Aw *et al.*, 2016). Die Weiterentwicklung des Pandan-Sensors stellen FASTmir-Sensoren dar, mithilfe derer die Konzentration von miRNAs oder anderer kleiner RNAs *in vitro* beobachtet werden und eine Quantifizierung von miRNAs innerhalb aus Gewebe extrahierter RNA erfolgen kann (Huang *et al.*, 2017). FASTmir-Sensoren liegen je nach Anwesenheit der spezifischen miRNA in einem *On*- oder *Off*-Zustand vor und können für *live-cell real-time Imaging* kleiner RNAs und somit *in vivo* verwendet werden (Huang *et al.*, 2017).

Um zu überprüfen, wie sich die Otp-Expression im Gehirn bei einem Verlust von miR-252 darstellt, wurden Otp-Immunfluoreszenzfärbungen an Embryonen sowie larvalen und adulten Gehirnen eines miR-252 KO-Stammes (Chen *et al.*, 2014) durchgeführt. Hierbei bestand die Vermutung darin, dass ein Fehlen von miR-252 zu einer erhöhten Otp-Expression in den Otp-exprimierenden Geweben führt. Ein besonderer Fokus lag dabei auf dem embryonalen Ventralnervensystem, in dem in zuvor durchgeführten Experimenten eine posttranskriptionelle Regulation von *otp* gezeigt werden konnte (s. Abb. 2.8 und Hildebrandt *et al.*, 2020). Überraschenderweise wiesen sowohl Gehirne und Ventralnervensysteme der Embryonen als auch die larvalen Gehirne des miR-252 KO-Stammes eine wildtypische Otp-Expression auf. Auch die Gehirnstrukturen, die in den verschiedenen Stadien mithilfe von HRP-, Nrt- und Brp-Immunfluoreszenzfärbungen sichtbar gemacht wurden, zeigten keine Auffälligkeiten. Möglicherweise übernehmen aufgrund der hohen Redundanz in miRNA-Familien bei einem Verlust von miR-252 andere miRNA-Familienmitglieder ihre Funktion (Alvarez-Saavedra und Horvitz, 2010), oder andere, noch unbekannte miRNAs sind für die posttranskriptionelle Regulation von *otp* zuständig. Ein weiteres Familienmitglied der miR-252-Familie stellt beispielsweise miR-1002 dar, die eine wichtige Rolle bei der Thermotoleranz und bei Stressantworten spielt (Park *et al.*, 2019).

Lediglich in einer definierten Region des adulten Gehirns im Expressionsbereich der Lineage DPLI3 ist im miR-252 KO-Stamm ein Unterschied, allerdings ein Verlust der Otp-Expression, zu erkennen (s. Abb. 4.14 F'). Es ist wahrscheinlich, den stärksten Effekt des miR-252 *Knockouts* im adulten Kopf zu beobachten, da die miR-252 Konzentration, die bereits im Embryo nachweisbar ist, während der Entwicklung stetig ansteigt (Marrone *et al.*, 2012; Lim *et al.*, 2018). MiR-252 ist die am stärksten exprimierte miRNA in der adulten Fliege, wobei die miR-252 Konzentration im adulten Kopf in dreifacher Menge verglichen zum restlichen Körper vorliegt (Marrone *et al.*, 2012). Die Tatsache, dass der miR-252 KO-Stamm puppal letal ist (nicht gezeigt) und nur wenige, vergleichsweise große *Escaper*-Tiere noch für kurze Zeit das Schlüpfen überleben, zeigt zusätzlich die Wichtigkeit von

miR-252 für die adulte Fliege. Wie bei dem Stamm miR-252 KO beobachtet, führt der Verlust dieser miRNA zu größeren, schwereren Fliegen, wogegen eine Überexpression von miR-252 kleinere Fliegen hervorruft (Lim *et al.*, 2019). Aufgrund dessen wird eine Rolle von miR-252 innerhalb der Wachstumskontrolle während der Metamorphose vermutet (Lim *et al.*, 2019). MiR-252 werden aufgrund ihrer reichlichen und vielfältigen möglichen Zielgene eine breite Auswirkung auf den Organismus und das Beeinflussen von unterschiedlichen Funktionen zugeschrieben (Marrone *et al.*, 2012). In der embryonalen Nervensystementwicklung beispielsweise wird miR-252 in Neuroblasten, Gliazellen und Neuronen hochreguliert (Menzel *et al.*, 2019), weswegen *otp* als miR-252-Zielgen durchaus wahrscheinlich ist. Innerhalb der Larve spielt miR-252 eine Rolle bei der Morphogenese der Imaginalscheiben (Towler *et al.*, 2015), wo auch die stärkste miR-252-Expression in diesem Entwicklungsstadium nachweisbar ist (Marrone *et al.*, 2012). Weitere Funktionen werden miR-252 zum Beispiel während der Zellteilung, Zellproliferation, Zellkommunikation und dem Zelltod sowie beim Muskelbildungsprozess zugeschrieben (Marrone *et al.*, 2012; Lim *et al.*, 2018). In epithelialen Tumorgeweben tritt miR-252 hochreguliert auf (Shu *et al.*, 2017), genauso 60 Stunden nach einer Infektion der Fliege mit *Candida albicans* (Atilano *et al.*, 2017) und spielt somit auch eine Rolle bei Krankheiten und Immunsystemantworten.

MiR-252 ist hochkonserviert in verschiedenen Spezies (Ibáñez-Ventoso *et al.*, 2008; Ruby *et al.*, 2007). In hemimetabolen Spezies wie *Blattella germanica* nimmt miR-252 eine wichtige Rolle in Wachstums- und Entwicklungsprozessen vor der Metamorphose ein (Rubio *et al.*, 2012; Ylla *et al.*, 2017). Auch der humanen miR-252-homologen miRNA-Familie wird eine Rolle im Tumorgeschehen zugesprochen. Die *Drosophila*-spezifische miR-252, *dme-miR-252*, weist eine Sequenzidentität von etwa 80 % zu *cel-miR-252*, der miR-252 aus *C. elegans*, auf. So steht sie als potentieller Tumorsuppressor in Verbindung mit verschiedenen Tumortypen, wie beispielsweise Lymphomen, hepatozellulären Karzinomen, Brustkrebs und nasopharyngealen Karzinomen (Ji *et al.*, 2009; Kota *et al.*, 2009; Lu *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2011).

Aufgrund ihrer außerordentlichen Relevanz für die adulte Fliege bleibt es weiterhin interessant, die Funktionen von und Regulationen durch miR-252, auch im Zusammenhang einer Regulation von *otp*, zu untersuchen. Hierfür ist auch denkbar, die *otp*-Expression, insbesondere im embryonalen Ventralnervensystem, bei einem Verlust der gesamten miR-252 Familie zu beobachten.

## 5.7 Die Expression und Regulation von *DRx*, *hbn* und *erm*

Die neuronalen Transkriptionsfaktoren *Drosophila* Retinal Homeobox (*DRx*), Homeobrain (*Hbn*) und Earmuff (*Erm*) sind ebenfalls wie *Otp* für die Zellproliferation während der Gehirnentwicklung von *Drosophila* von großer Bedeutung (Curt *et al.*, 2019). Aus diesem Grund stellt es sich als sehr interessant dar, die Expression und die Regulation dieser Gene zu untersuchen. Um solche Analysen durchzuführen, wurden Gen-spezifische Gal4-Treiberstämme generiert sowie *Genetargeting*-Stämme hergestellt, die Deletionen einiger wichtiger Enhancerbereiche der drei Gene enthalten.

Die durch PhiC31-vermittelte Keimbahntransformation von vorher generierten *DRx*-, *hbn*- und *erm*-*Genetargeting*-Stämmen mit einem Gal4-Konstrukt hergestellten Treiberstämme  $DRx^{Gal4}$  (s. Abb. 4.15 A),  $hbn^{KOGal4}$  (s. Abb. 4.16 A) und  $erm^{KOGal4}$  (s. Abb. 4.17 A) repräsentierten das komplette Expressionsmuster des jeweiligen Gens (s. Abb. 4.15 B–G, Abb. 4.16 B–D und Abb. 4.17 B–E). Einzelne Bereiche, in denen entweder nur das jeweils untersuchte Protein oder das Reporterprotein gezeigt werden konnte, lassen sich vermutlich darauf zurückführen, dass eine zeitliche Verzögerung der Reporterexpression verglichen zur Protein-Expression vorliegt, wobei beispielsweise das zu untersuchende Protein wieder abgebaut wird, während RFP oder GFP fortbestehen. Dieser Effekt ist häufig bei Reporterexperimenten zu beobachten.

In einer vorhergehenden Enhancer-Analyse wurden die acht *erm*-assoziierten Fragmente R9D03, R9D04, R9D05, R9D06, R9D08, R9D09, R9D10 und R9D11 im Detail mithilfe des UAS/Gal4-Systems und eines GFP-Reporters analysiert (Pfeiffer *et al.*, 2008). Lediglich das Fragment R9D05 im Intron von *erm* führte zu keiner Gal4-Expression (Pfeiffer *et al.*, 2008), weshalb nicht zu erwarten ist, dass dem zunächst hergestellten *Genetargeting*-Stamm  $erm^{KO}$ , in dem unter anderem der R9D05-Bereich deletiert wurde, ein funktioneller *erm*-Enhancer fehlt. Alle weiteren Enhancer führten zu einer Expression in definierten Regionen, vor allem im embryonalen, aber teilweise auch im larvalen und adulten Gehirn von *Drosophila* (Pfeiffer *et al.*, 2008). Somit scheint der aus  $erm^{KO}$  hergestellte Treiberstamm  $erm^{KOGal4}$  das vollständige, normale Expressionsmuster von *erm* während der Entwicklung zu repräsentieren. Es existiert ein weiterer *erm*-Treiberstamm, 18B02 dFzef-GAL4, für dessen Herstellung die codierende *erm*-Region des BAC-Klons BAC CH321-18B02 (BACPAC Resources Center) mittels Rekombination (Sharan *et al.*, 2009) durch Gal4 ersetzt und das Konstrukt auf dem dritten Chromosom von *Drosophila* integriert wurde (Santiago *et al.*, 2021). Dieser Stamm zeigt die *Erm*-Expression in den *Erm*-exprimierenden Lamina L3 Neuronen (Kvon *et al.*, 2014). Vermutlich repräsentieren beide Stämme die *Erm*-Expression gleichermaßen, allerdings ist es mit  $erm^{KOGal4}$  möglich, die Reporterexpression zumindest bis ins Larvalstadium auch im *erm*-mutanten Hintergrund zu analysieren.

Aufgrund der beobachteten Expressionsmuster können die drei neu hergestellten Treiberstämme  $DRx^{Gal4}$ ,  $hbn^{KOGal4}$  und  $erm^{KOGal4}$  in Zukunft für Überexpressions-, Herunterregulations- oder Rettungsexperimente verwendet werden.

Zur Untersuchung der Regulation von *DRx* wurden drei Enhancer-*Genetargeting*-Stämme generiert, in denen jeweils die *DRx*-spezifischen Enhancerbereiche 77F11, 77F06 oder 77F09 deletiert wurden (s. Abb. 4.18) (Bachelorarbeit Bley, 2017; Bachelorarbeit Fürst, 2019; Klöppel *et al.*, 2021). Außerdem wurden fünf Enhancer-*Genetargeting*-Stämme mit Deletionen der *hbn*-spezifischen Enhancerbereiche 35D05, 34G10, 35A03, *hbn3'*-Bereich sowie einer kombinierten Deletion der beiden Enhancerbereiche 34G10 und 35A03 zur Analyse der *hbn*-Regulation hergestellt (s. Abb. 4.19) (Bachelorarbeit Federspiel, 2016; Bachelorarbeit Wittling, 2017; Bachelorarbeit Findji, 2018; Hildebrandt *et al.*, 2022b). Zur Untersuchung der *erm*-Regulation wurden durch *Genetargeting* hervorgerufene Deletionsstämme der *erm*-spezifischen Enhancerbereiche R9D08, R9D10, R9D11 sowie einer verkürzten Region von R9D11, genannt R9D11S, generiert (s. Abb. 4.20) (Bachelorarbeit Kübel, 2019; Hildebrandt *et al.*, 2021). Spezifische Enhancer-Deletionen durch *Genetargeting* haben gegenüber RNAi-Herunterregulationen mit spezifischen Treiberstämmen den Vorteil, dass die Deletionen neue gewebespezifische Allele repräsentieren, die einen definierten und reproduzierbaren Phänotyp aufweisen. Eine Herunterregulation durch RNAi dagegen ist nicht so effektiv und kann auch eine zeitliche Verzögerung durch die RNAi-Aktivierung mithilfe des UAS/Gal4-Systems aufweisen.

Die *DRx*-Expression ist im embryonalen Gehirn in acht bis zehn Neuroblasten pro Hemisphäre sowie in einigen anderen Zellen, wie beispielsweise den MB Neuroblasten und ihren Nachkommen, zu beobachten (Kraft *et al.*, 2016). Im larvalen Gehirn wird *DRx* in den Typ II DM und DL Lineages sowie dem dIPC und der Lobula exprimiert (Klöppel *et al.*, 2021) und im adulten Gehirn im CCX und weiteren Regionen, vor allem in der dorsalen Hälfte des Gehirns (Klöppel *et al.*, 2021). Der Stamm 77F11<sup>KO</sup> mit Deletion des *DRx*-spezifischen Enhancers 77F11 lässt keine offensichtlichen Veränderungen der *DRx*-Expression erkennen (s. Abb. 4.18 C und C', G und G'). Weniger deutliche Veränderungen des Musters könnten in einer detaillierteren Analyse mit spezifischeren Markern entdeckt und nachgewiesen werden. Dennoch ist während Enhancer-Analysen im Hinterkopf zu behalten, dass eine gewisse Enhancer-Redundanz durch sogenannte *shadow* Enhancer bestehen kann. Hierbei handelt es sich um zwei Enhancer, die für das gleiche Expressionsmuster sorgen und somit überlappende Funktionen aufweisen (Hong *et al.*, 2008; Perry *et al.*, 2010 und 2012). Die Deletion eines Enhancers sorgt in diesem Fall nicht für einen offensichtlich abweichenden Phänotyp (Montavon *et al.*, 2011; Cretekos *et al.*, 2008), da einer der beiden Enhancer den Effekt, der durch den Verlust des anderen Enhancers entsteht, abpuffern kann (Cannavò *et al.*, 2016). Viele Gene von

*Drosophila* haben zusätzliche zweite regulatorische Elemente mit sehr ähnlichem Potential, von den entsprechenden Transkriptionsfaktoren gebunden zu werden (Hong *et al.*, 2008).

Im Gegensatz zu 77F11<sup>KO</sup> weist der Stamm 77F06<sup>KO</sup> deutliche Effekte im embryonalen und larvalen Gehirn auf, wo eine Desorganisation der DM Lineages sowie ein Verlust von DRx in der Lobula zu beobachten sind (s. Abb. 4.18 D und D', H und H'). Der *Genetargeting*-Stamm 77F09<sup>KO</sup> stellte sich unerwarteter Weise als embryonal letal dar, da ein Enhancer-Defekt normalerweise nicht zur Letalität führt. In diesem Stamm kam es offenbar aufgrund der ungünstigen Integrationsstelle des Targetingkonstrukts zu diesem Effekt, da nach der Flippase-induzierten Rekombination des Konstrukts einige P-Element-Sequenzen innerhalb der Integrationsstelle zurückbleiben, was an kritischen Stellen zu Letalität führen kann. Somit konnten für diese Enhancer-Deletion nur Embryonen betrachtet werden, die einen ähnlichen Effekt wie die Gehirne der 77F06<sup>KO</sup>-Embryonen mit noch etwas weniger DRx-Expression aufwiesen (s. Abb. 4.18 E und E').

Hbn wird im embryonalen Gehirn in spezifischen Regionen des Protocerebrums in Neuroblasten, GMCs, Neuronen und den MB Vorläuferzellen exprimiert (Kolb *et al.*, 2021) und im larvalen Gehirn in allen DM und DL Lineages sowie in der optischen Lobe und der Lobula (Hildebrandt *et al.*, 2022b). In der optischen Lobe ist Hbn Teil einer zeitlichen Aktivierungs-Abfolge von Transkriptionsfaktoren, in der Hbn den Transkriptionsfaktor Sloppy paired 1 aktiviert (Konstantinides *et al.*, 2022). Hbn reguliert aber auch Faktoren, die für die Generation neuronaler Zellen benötigt werden (Konstantinides *et al.*, 2022).

Die zunächst untersuchten Enhancer-Fragmente von *hbn* sind in *upstream*-, intronischen und *downstream*-Regionen des Gens lokalisiert (Hildebrandt *et al.*, 2022b). Eine Studie im Embryo zeigte, dass 30 % der Enhancer von *Drosophila* *upstream*, 22 % *downstream* und 36 % in Introns positioniert sind, während 12 % aller Enhancer weiter entfernt im Genom liegen (Kvon *et al.*, 2014). Somit könnten auch für *hbn* noch weitere Enhancer existieren. Dennoch haben die untersuchten Enhancer das Hbn-Expressionsmuster größtenteils abgedeckt, sodass die *Genetargeting*-Stämme mit den Deletionen der ausgewählten *hbn*-Enhancer generiert wurden (Hildebrandt *et al.*, 2022b). Die Effekte der Enhancer-Deletionen sind vor allem im embryonalen Gehirn gut zu beobachten, wobei alle *Genetargeting*-Stämme eine Reduktion der supraoesophagealen Gehirnkommisur (SEK), Veränderungen der protocerebralen Konnektive (PCN) und eine leichte Reduktion der Größe des Protocerebrums zeigten, was typische Phänotypen für *hbn*-Mutanten darstellen (s. Abb. 4.19 B–G). Zur Generierung der SEK streben Vorsprünge der Hemisphären entlang der Mittellinie aufeinander zu und formen eine interhemisphärische Zellbrücke (Therianos *et al.*, 1995). Die Axone der sogenannten Fasertrakt-Gründungscluster formen Pioniertrakte, wofür zunächst die Cluster P2l und P2m gebildet werden (Nassif *et al.*, 1998), was in Abhängigkeit des Enhancers 35A03 geschieht. Wenn die 35A03-

Enhancer-Region fehlt, bilden sich trotzdem andere Trakte (s. Abb. 4.19 E), was dafür spricht, dass diese davon unabhängig sind und die Generierung eines Trakts nicht nötig ist, um den folgenden Trakt herzustellen.

Bei einer Deletion der 35A03-Region in Kombination mit dem Enhancer 34G10 ist ein additiver Effekt auf die Kommissur-Bildung, die PCN und die Gehirngröße zu beobachten (s. Abb. 4.19 F). Eine große Enhancer-Deletionsstudie in der Maus, wobei 23 Enhancer, die für die Extremitäten-Entwicklung vonnöten sind, deletiert wurden, zeigte, dass Deletionen von einzelnen Enhancern nicht zu erkennbaren Phänotypen führten, während Deletionen von Enhancer-Paaren deutliche Phänotypen hervorriefen (Osterwalder *et al.*, 2018). Diese Beobachtungen bezüglich der Deletion von zwei Enhancern in Kombination sprechen für die funktionelle Redundanz von Enhancern.

Im larvalen Gehirn des Stammes 35A03<sup>KO</sup> ist keine Hbn-Expression in der Lobula zu beobachten (s. Abb. 4.19 I). Da die Hbn-Expression in der optischen Lobe zu verschiedenen Zeiten und in verschiedenen Zelltypen stattfindet, ist es hier schwieriger, Effekte der Enhancer-Deletionen zu überprüfen, was möglicherweise in Immunfluoreszenzfärbungen mit spezielleren Markern vereinfacht werden kann. Interessanterweise führte keine der Enhancer-Deletionen zu Letalität, was aufgrund der enormen Wichtigkeit von Hbn für die Generierung der SEK zu vermuten gewesen wäre. Diese Beobachtung spricht für die bereits genannten *shadow* Enhancer, wodurch die für *hbn*-Mutanten typische dünne Kommissur, die durch die Enhancer-Deletionen hervorgerufen wird, so kompensiert werden könnte, dass das Adultstadium erreicht werden kann.

Die am besten analysierte Funktion von Erm ist die Funktion während der INP (intermediäre neurale Vorläuferzelle)-Reifung (Weng *et al.*, 2010; Bowman *et al.*, 2008). Typ II Neuroblasten durchlaufen im larvalen Gehirn wiederholte asymmetrische Teilungen, um unreife INPs zu generieren, die innerhalb ihres 8- bis 10-stündigen Reifeprozesses nur eingeschränktes Entwicklungspotential erhalten (Bello *et al.*, 2008; Boone und Doe, 2008; Bowman *et al.*, 2008; Janssens und Lee, 2014; Weng und Lee, 2011), das von der schnellen Aktivierung von Erm abhängt (Janssens *et al.*, 2017). In den Neuroblasten hält die Histondeacetylase Hdac1 (Histondeacetylase 1), auch Rpd3 (Reduced potassium dependency 3) genannt, den *erm*-Enhancer R9D11 noch in einem inaktiven Zustand (Janssens *et al.*, 2017). Auch die Transkriptionsrepressoren und Neuroblasten-Selbsterneuerungsfaktoren Klumpfuß (Klu), Deadpan (Dpn) und Enhancer of split my (E(spl)my) binden R9D11 in Typ II Neuroblasten und fördern so gemeinsam mit Hdac1 dessen Selbsterneuerung, indem sie eine vorzeitige Aktivierung von *erm* verhindern (Janssens *et al.*, 2017; Li *et al.*, 2017; Zacharioudaki *et al.*, 2012). Gleichzeitig bindet auch der Transkriptionsaktivator Pointed P1 (Pnt P1) an R9D11 und fördert seine Aktivierung (Janssens *et al.*, 2017), was im Neuroblasten allerdings noch durch Notch unterdrückt wird (Li *et al.*, 2016). Während der Teilung des Neuroblasten segregieren der Tumorsuppressor Brain tumor (Brat) und der



Notch-Inhibitor Numb asymmetrisch in die unreife INP und regulieren dort die Funktion der Neuroblasten-Selbsterneuerungsfaktoren Klu, Dpn und E(spl)my herunter (Berger *et al.*, 2012; Haenfler *et al.*, 2012; Janssens *et al.*, 2014; Komori *et al.*, 2014; Xiao *et al.*, 2012). Diese Abschwächung der bisherigen Repressoraktivität findet innerhalb von zwei Stunden nach der asymmetrischen Teilung des Neuroblasten und der Entstehung der unreifen INP statt, wodurch die Acetylierung mehrerer Histonproteine durch die Histon-Acetyltransferasen (HATs) Tip60 und HBO1 und die schnelle Aktivierung der Erm-Expression durch Pnt P1 ermöglicht wird (Janssens *et al.*, 2017). Anschließend unterdrückt Erm die Expression von Pnt P1 und der O-Isoform von *grainy head (grhO)*, die Transkriptionsaktivatoren von Neuroblasten darstellen (Janssens *et al.*, 2017). So wird eine schnelle Einschränkung des Entwicklungspotentials der unreifen INP nach der asymmetrischen Teilung des Neuroblasten ermöglicht und verhindert, dass die unreife INP wieder Neuroblasten-Schicksal einschlägt (Janssens *et al.*, 2017). Gleichzeitig zur Erm-Expression ist in der unreifen INP auch der Brahma-Komplex aktiv, der einen ATP-abhängigen Chromatin-Remodellierungsfaktor der SWI/SNF (*switching defective and sucrose nonfermenting*) Familie in *Drosophila* darstellt. Mitglieder der SWI/SNF Familie spielen eine zentrale Rolle in der transkriptionellen Regulation bei Eukaryoten (Mohrmann *et al.*, 2004), da sie die Zugänglichkeit von DNA-Bindestellen für transkriptionelle Regulatoren kontrollieren. Der Brahma-Komplex bildet entweder mit der assoziierten Untereinheit Osa den sogenannten BAP-Komplex oder mit den Untereinheiten Bap170 und Bap180 den PBAP-Komplex (Carrera *et al.*, 2008). Der BAP-Komplex schränkt gleichzeitig mit Erm das Entwicklungspotential unreifer INPs ein, indem er ihre Reaktion auf die Neuroblasten-Selbsterneuerungsfaktoren abschwächt (Janssens *et al.*, 2014). Die BAP-Komplex-Komponente Osa induziert ein Transkriptionsprogramm, das während der Entwicklung der Lineages die zeitliche Musterung einleitet, die Selbsterneuerung begrenzt und die Dedifferenzierung verhindert (Eroglu *et al.*, 2014). So wird eine Generierung differenzierter Zellen sichergestellt und der Formierung von Tumor-initiiierenden Stammzellen aus Vorläuferzellen vorgebeugt (Janssens *et al.*, 2014). In Mutanten ohne Erm-Funktion entwickeln sich die unreifen INPs spontan in sogenannte *supernumerary* (engl. überzählig) Typ II Neuroblasten zurück, während eine Fehlexpression von Erm eine vorzeitige Neuroblasten-Differenzierung auslöst (Janssens *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2016; Weng *et al.*, 2010). Reife INPs treten anschließend wieder in den Zellzyklus ein und durchlaufen fünf bis sechs Runden asymmetrischer Teilungen, um differenzierende INP- und GMC-Tochterzellen zu generieren (Bayraktar und Doe, 2013; Viktorin *et al.*, 2011).

Erm übt außerdem eine Funktion im visuellen System von *Drosophila* aus. In der Medulla verbinden sich Neurone mit den zehn Schichten M1–M10, wobei M1–M6 die inneren und M8–M10 die äußeren Schichten bilden, während M7 die Zwischenschicht darstellt (Fischbach und Dittrich, 1989). Die Medullaschichten bekommen direkten Input der Photorezeptoren R7 und R8, die UV- und blau/grün-

sensitiv sind, und außerdem von den Lamina-Neuronen L1–L5 sowie indirekten Input von den restlichen Photorezeptoren R1–R6 (Fischbach und Dittrich, 1989). Die Photorezeptoren R7 und R8 sowie die Lamina-Neurone innervieren über ihre Axone jeweils bestimmte Medullaschichten und bilden Synapsen mit Medullaneuronen, die die Informationen prozessieren und zu höhergelegenen Gehirnzentren weiterleiten. Die Medullaschicht M3 wird spezifisch von Axonen der Lamina-Neurone L3 sowie der Photorezeptoren R8 innerviert, was durch Erm gesteuert wird (Peng *et al.*, 2018). Erm wird in den L3 Neuronen exprimiert und vermittelt über Dpr (*Defective proboscis extension response*)-Zelloberflächenproteine die M3-Schichtspezifität der L3-Neurone, ist dort aber auch für die Netrin-Proteinexpression erforderlich (Peng *et al.*, 2018; Nakamura *et al.*, 2002; Tan *et al.*, 2015). Dpr-Zelloberflächenmoleküle werden von den Lamina-Neuronen exprimiert und binden an Dpr-interagierende Zelloberflächenmoleküle (DIPs), die von den synaptischen Zielen in der Medulla exprimiert werden und so zur synaptischen Spezifität beitragen (Tan *et al.*, 2015; Carrillo *et al.*, 2015; Özkan *et al.*, 2013). Das L3-exprimierte Sekretionsmolekül Netrin ist wiederum für die M3-spezifische Innervierung der R8 Photorezeptor-Axone nötig (Pecot *et al.*, 2014; Timofeev *et al.*, 2012). Innerhalb der M3-Schicht bilden die L3- und R8-Axone Synapsen mit den Dendriten der transmedullaren Neurone 9 (Tm9) (Gao *et al.*, 2008; Takemura *et al.*, 2013 und 2015), die als Projektionsneurone die Informationen aus der Medulla zum Lobula-Neuropil übermitteln. Auch für diese Konnektivität von den L3- bzw. R8-Axonon zu den Tm9-Neuronen ist Erm zumindest teilweise erforderlich (Peng *et al.*, 2018).

Die Analyse der *erm*-Enhancer-*Genetargeting*-Stämme zeigte Phänotypen, die typisch für den Verlust der *erm*-Funktion sind (s. Abb. 4.20). Ein Verlust der Erm-Funktion in der Larve führt durch eine zehnfache Zunahme von Neuroblasten zu stark vergrößerten Gehirnhemisphären (Weng *et al.*, 2010), was sich je nach deletierter Region mehr oder weniger deutlich ausprägt (s. Abb. 4.20 C–F). R9D08<sup>KO</sup>-Hemisphären zeigen zwar keinen großen Unterschied zum wildtypischen Vergleich, aber eine fehlende DRx-Expression in der Region der MBs, was auf einen Verlust dieser hindeuten könnte (s. Abb. 4.20 C, weißer Pfeil). In larvalen Gehirnhemisphären des Stammes R9D10<sup>KO</sup> ist die Präsenz von zahlreichen zusätzlichen Neuroblasten und Lineages, vor allem in der optischen Lobe, zu beobachten (s. Abb. 4.20 D). Der Stamm R9D10<sup>KO</sup> wird sich in Zukunft besonders auch für die Untersuchung der Erm-Funktion im adulten Gehirn eignen, da trotz eigentlich larvaler Letalität einige Tiere das Adultstadium als *Escaper* erreichen und für Experimente zur Verfügung stehen. In einer ersten Untersuchung durch Immunfluoreszenzfärbung mit Brp, das die adulten Gehirnkompimente verdeutlicht, stellte sich das adulte R9D10<sup>KO</sup>-Gehirn mit starker Vergrößerung im Bereich des SLPs dar (s. Abb. 4.20 H), was sicherlich durch Färbungen von weiteren Markern spezifiziert werden kann. Larvale R9D11<sup>KO</sup>- und R9D11S<sup>KO</sup>-Hemisphären zeigten eine starke Überproliferation sowie eine deutliche Desorganisation der Typ II Lineages (s. Abb. 4.20 E und F). Die

deutlichste Vergrößerung der larvalen Hemisphäre war dabei im Stamm R9D11S<sup>KO</sup> zu beobachten (s. Abb. 4.20 F).

Generell könnte in Zukunft eine detailliertere Analyse der betrachteten Enhancer mit spezifischen Markern stattfinden, um eine bessere Einsicht in die Funktion des jeweiligen Enhancers zu erlangen und außerdem zu beobachten, wie verschiedene Enhancer miteinander kooperieren, um die *DRx*-, *hbn*- oder *erm*-Expression räumlich und zeitlich zu aktivieren. Hierzu könnte es auch interessant sein, die Effekte der Enhancer-Deletionen ebenfalls in früheren Entwicklungsstadien zu untersuchen, um zu überprüfen, zu welchem Zeitpunkt die Phänotypen sichtbar werden und ab wann in der Entwicklung sie vollständig etabliert sind. Durch die *attP-Site*, die mit dem *Genetargeting*-Vektor innerhalb der Deletion eingebracht wurde, sind außerdem auch Rettungsexperimente möglich, es können kürzere Enhancer-Fragmente integriert werden oder auch modifizierte Enhancer-Fragmente mit Teil-Deletionen oder Bindestellen-Mutationen. Auch homologe Fragmente anderer *Drosophila*-Spezies könnten integriert und untersucht werden.

## 6 Verzeichnisse

### 6.1 Literaturverzeichnis

**Aboobaker** AA, Tomancak P, Patel N, Rubin GM, Lai EC. *Drosophila* microRNAs exhibit diverse spatial expression patterns during embryonic development. Proc Natl Acad Sci U S A. 2005 Dec 13;102(50):18017-22.

**Abrahante** JE, Daul AL, Li M, Volk ML, Tennessen JM, Miller EA, Rougvie AE. The *Caenorhabditis elegans* hunchback-like gene *lin-57/hbl-1* controls developmental time and is regulated by microRNAs. Dev Cell. 2003 May;4(5):625-37.

**Abramowicz** A, Gos M. Splicing mutations in human genetic disorders: examples, detection, and confirmation. J Appl Genet. 2018 Aug;59(3):253-268.

**Acampora** D, Postiglione MP, Avantaggiato V, Di Bonito M, Vaccarino FM, Michaud J, Simeone A. Progressive impairment of developing neuroendocrine cell lineages in the hypothalamus of mice lacking the *Orthopedia* gene. Genes Dev. 1999 Nov 1;13(21):2787-800.

**Acampora** D, Postiglione MP, Avantaggiato V, Di Bonito M, Simeone A. The role of *Otx* and *Otp* genes in brain development. Int J Dev Biol. 2000;44(6):669-77.

**Ache** BW, **Young** JM. Olfaction: diverse species, conserved principles. Neuron. 2005 Nov 3;48(3):417-30.

**Adams** MD *et al.* The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. Science. 2000 Mar 24;287(5461):2185-95.

**Affaticati** P, Yamamoto K, Rizzi B, Bureau C, Peyri ras N, Pasqualini C, Demarque M, Vernier P. Identification of the optic recess region as a morphogenetic entity in the zebrafish forebrain. Sci Rep. 2015 Mar 4;5:8738.

**Agarwal** V, Bell GW, Nam JW, Bartel DP. Predicting effective microRNA target sites in mammalian mRNAs. Elife. 2015 Aug 12;4:e05005.

**Alvarez-Saavedra** E, Horvitz HR. Many families of *C. elegans* microRNAs are not essential for development or viability. Curr Biol. 2010 Feb 23;20(4):367-73.

**Ambros** V. The functions of animal microRNAs. Nature. 2004 Sep 16;431(7006):350-5.

**Aparicio** R, Simoes Da Silva CJ, Busturia A. MicroRNA miR-7 contributes to the control of *Drosophila* wing growth. Dev Dyn. 2015 Jan;244(1):21-30.

**Apitz** H, **Salecker** I. Erratum: A region-specific neurogenesis mode requires migratory progenitors in the *Drosophila* visual system. Nat Neurosci. 2015 Jun;18(6):926.

**Atilano** ML, Glittenberg M, Monteiro A, Copley RR, Ligoxygakis P. MicroRNAs that contribute to coordinating the immune response in *Drosophila melanogaster*. Genetics. 2017 Sep;207(1):163-178.

**Aukerman** MJ, **Sakai** H. Regulation of flowering time and floral organ identity by a MicroRNA and its APETALA2-like target genes. Plant Cell. 2003 Nov;15(11):2730-41.

**Aw** SS, Tang MX, Teo YN, Cohen SM. A conformation-induced fluorescence method for microRNA detection. Nucleic Acids Res. 2016 Jun 2;44(10):e92.

- Bach** NM. Funktionelle Analyse des Homeoboxgens *orthopedia* in der Enddarm- und Nervensystementwicklung von *Drosophila melanogaster*. Dissertation, Universität des Saarlandes. 2011.
- Baena-Lopez** LA, Alexandre C, Mitchell A, Pasakarnis L, Vincent JP. Accelerated homologous recombination and subsequent genome modification in *Drosophila*. *Development*. 2013 Dec;140(23):4818-25.
- Bagga** S, Bracht J, Hunter S, Massirer K, Holtz J, Eachus R, Pasquinelli AE. Regulation by let-7 and lin-4 miRNAs results in target mRNA degradation. *Cell*. 2005 Aug 26;122(4):553-63.
- Bailey** TJ, El-Hodiri H, Zhang L, Shah R, Mathers PH, Jamrich M. Regulation of vertebrate eye development by Rx genes. *Int J Dev Biol*. 2004;48(8-9):761-70.
- Bardet** SM, Martinez-de-la-Torre M, Northcutt RG, Rubenstein JL, Puellas L. Conserved pattern of OTP-positive cells in the paraventricular nucleus and other hypothalamic sites of tetrapods. *Brain Res Bull*. 2008 Mar 18;75(2-4):231-5.
- Bate** CM. Embryogenesis of an insect nervous system. I. A map of the thoracic and abdominal neuroblasts in *Locusta migratoria*. *J Embryol Exp Morphol*. 1976 Feb;35(1):107-23.
- Bates** AS, Schlegel P, Roberts RJV, Drummond N, Tamimi IFM, Turnbull R, Zhao X, Marin EC, Popovici PD, Dhawan S, Jamasb A, Javier A, Serratos Capdevila L, Li F, Rubin GM, Waddell S, Bock DD, Costa M, Jefferis GSXE. Complete connectomic reconstruction of olfactory projection neurons in the fly brain. *Curr Biol*. 2020 Aug 17;30(16):3183-3199.e6.
- Bayraktar** OA, Doe CQ. Combinatorial temporal patterning in progenitors expands neural diversity. *Nature*. 2013 Jun 27;498(7455):449-55.
- Bedont** JL, Newman EA, Blackshaw S. Patterning, specification, and differentiation in the developing hypothalamus. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol*. 2015 Sep-Oct;4(5):445-68.
- Bejarano** F, Smibert P, Lai EC. MiR-9a prevents apoptosis during wing development by repressing *Drosophila* LIM-only. *Dev Biol*. 2010 Feb 1;338(1):63-73.
- Bejarano** F, Bortolamiol-Becet D, Dai Q, Sun K, Saj A, Chou YT, Raleigh DR, Kim K, Ni JQ, Duan H, Yang JS, Fulga TA, Van Vactor D, Perrimon N, Lai EC. A genome-wide transgenic resource for conditional expression of *Drosophila* microRNAs. *Development*. 2012 Aug;139(15):2821-31.
- Bello** BC, Hirth F, Gould AP. A pulse of the *Drosophila* Hox protein Abdominal-A schedules the end of neural proliferation via neuroblast apoptosis. *Neuron*. 2003 Jan 23;37(2):209-19.
- Bello** BC, Izergina N, Caussinus E, Reichert H. Amplification of neural stem cell proliferation by intermediate progenitor cells in *Drosophila* brain development. *Neural Dev*. 2008 Feb 19;3:5.
- Berezikov** E, Robine N, Samsonova A, Westholm JO, Naqvi A, Hung JH, Okamura K, Dai Q, Bortolamiol-Becet D, Martin R, Zhao Y, Zamore PD, Hannon GJ, Marra MA, Weng Z, Perrimon N, Lai EC. Deep annotation of *Drosophila melanogaster* microRNAs yields insights into their processing, modification, and emergence. *Genome Res*. 2011 Feb;21(2):203-15.
- Berger** C, Harzer H, Burkard TR, Steinmann J, van der Horst S, Laurenson AS, Novatchkova M, Reichert H, Knoblich JA. FACS purification and transcriptome analysis of *Drosophila* neural stem cells reveals a role for Klumpfuss in self-renewal. *Cell Rep*. 2012 Aug 30;2(2):407-18.
- Betel** D, Koppal A, Agius P, Sander C, Leslie C. Comprehensive modeling of microRNA targets predicts functional non-conserved and non-canonical sites. *Genome Biol*. 2010;11(8):R90.

- Bier E.** *Drosophila*, the golden bug, emerges as a tool for human genetics. *Nat Rev Genet.* 2005 Jan;6(1):9-23.
- Bischof J,** Maeda RK, Hediger M, Karch F, Basler K. An optimized transgenesis system for *Drosophila* using germ-line-specific phiC31 integrases. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007 Feb 27;104(9):3312-7.
- Blechman J,** Borodovsky N, Eisenberg M, Nabel-Rosen H, Grimm J, Levkowitz G. Specification of hypothalamic neurons by dual regulation of the homeodomain protein Orthopedia. *Development.* 2007 Dec;134(24):4417-26.
- Bley I.** Analyse putativer genregulatorischer Elemente des Retinalen Homeoboxgens mittels Gene-Targeting in *Drosophila melanogaster*. Bachelorarbeit, Universität des Saarlandes. 2017.
- Bollenbacher WE,** Vedeckis WV, Gilbert LI. Ecdysone titers and prothoracic gland activity during the larval-pupal development of *Manduca sexta*. *Dev Biol.* 1975 May;44(1):46-53.
- Bonfiglio JJ,** Inda C, Refojo D, Holsboer F, Arzt E, Silberstein S. The corticotropin-releasing hormone network and the hypothalamic-pituitary-adrenal axis: molecular and cellular mechanisms involved. *Neuroendocrinology.* 2011;94(1):12-20.
- Boone JQ,** Doe CQ. Identification of *Drosophila* type II neuroblast lineages containing transit amplifying ganglion mother cells. *Dev Neurobiol.* 2008 Aug;68(9):1185-95.
- Bopp D,** Burri M, Baumgartner S, Frigerio G, Noll M. Conservation of a large protein domain in the segmentation gene paired and in functionally related genes of *Drosophila*. *Cell.* 1986 Dec 26;47(6):1033-40.
- Borchert GM,** Lanier W, Davidson BL. RNA polymerase III transcribes human microRNAs. *Nat Struct Mol Biol.* 2006 Dec;13(12):1097-101.
- Bossing T,** Udolph G, Doe CQ, Technau GM. The embryonic central nervous system lineages of *Drosophila melanogaster*. I. Neuroblast lineages derived from the ventral half of the neuroectoderm. *Dev Biol.* 1996 Oct 10;179(1):41-64.
- Bowman SK,** Rolland V, Betschinger J, Kinsey KA, Emery G, Knoblich JA. The tumor suppressors Brat and Numb regulate transit-amplifying neuroblast lineages in *Drosophila*. *Dev Cell.* 2008 Apr;14(4):535-46.
- Brand AH,** Perrimon N. Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development.* 1993 Jun;118(2):401-15.
- Brennecke J,** Hipfner DR, Stark A, Russell RB, Cohen SM. bantam encodes a developmentally regulated microRNA that controls cell proliferation and regulates the proapoptotic gene *hid* in *Drosophila*. *Cell.* 2003 Apr 4;113(1):25-36.
- Brennecke J,** Stark A, Russell RB, Cohen SM. Principles of microRNA-target recognition. *PLoS Biol.* 2005 Mar;3(3):e85.
- Bridi JC,** Ludlow ZN, Hirth F. Lineage-specific determination of ring neuron circuitry in the central complex of *Drosophila*. *Biol Open.* 2019 Jul 22;8(7):bio045062.
- Broggiolo W,** Stocker H, Ikeya T, Rintelen F, Fernandez R, Hafen E. An evolutionarily conserved function of the *Drosophila* insulin receptor and insulin-like peptides in growth control. *Curr Biol.* 2001 Feb 20;11(4):213-21.

**Brox A**, Puelles L, Ferreiro B, Medina L. Expression of the genes GAD67 and Distal-less-4 in the forebrain of *Xenopus laevis* confirms a common pattern in tetrapods. *J Comp Neurol*. 2003 Jun 30;461(3):370-93.

**Buhl E**, Kottler B, Hodge JLL, Hirth F. Thermoresponsive motor behavior is mediated by ring neuron circuits in the central complex of *Drosophila*. *Sci Rep*. 2021 Jan 8;11(1):155.

**Bürglin TR**, **Affolter M**. Homeodomain proteins: an update. *Chromosoma*. 2016 Jun;125(3):497-521.

**Cabrero P**, Radford JC, Broderick KE, Costes L, Veenstra JA, Spana EP, Davies SA, Dow JA. The Dh gene of *Drosophila melanogaster* encodes a diuretic peptide that acts through cyclic AMP. *J Exp Biol*. 2002 Dec;205(Pt 24):3799-807.

**Campos-Ortega JA**, **Hartenstein V** (1997). *The Embryonic Development of Drosophila melanogaster*. 2nd Edition, Springer-Verlag, Berlin.

**Cannavò E**, Khoueiry P, Garfield DA, Geeleher P, Zichner T, Gustafson EH, Ciglar L, Korb J, Furlong EE. Shadow enhancers are pervasive features of developmental regulatory networks. *Curr Biol*. 2016 Jan 11;26(1):38-51.

**Caplin ME**, Baudin E, Ferolla P, Filosso P, Garcia-Yuste M, Lim E, Oberg K, Pelosi G, Perren A, Rossi RE, Travis WD; ENETS consensus conference participants. Pulmonary neuroendocrine (carcinoid) tumors: European Neuroendocrine Tumor Society expert consensus and recommendations for best practice for typical and atypical pulmonary carcinoids. *Ann Oncol*. 2015 Aug;26(8):1604-20.

**Caqueret A**, Coumailleau P, Michaud JL. Regionalization of the anterior hypothalamus in the chick embryo. *Dev Dyn*. 2005 Jun;233(2):652-8.

**Carlsson MA**, Diesner M, Schachtner J, Nässel DR. Multiple neuropeptides in the *Drosophila* antennal lobe suggest complex modulatory circuits. *J Comp Neurol*. 2010 Aug 15;518(16):3359-80.

**Carrera I**, Zavadil J, Treisman JE. Two subunits specific to the PBAP chromatin remodeling complex have distinct and redundant functions during *Drosophila* development. *Mol Cell Biol*. 2008 Sep;28(17):5238-50.

**Carrillo RA**, Özkan E, Menon KP, Nagarkar-Jaiswal S, Lee PT, Jeon M, Birnbaum ME, Bellen HJ, Garcia KC, Zinn K. Control of synaptic connectivity by a network of *Drosophila* IgSF cell surface proteins. *Cell*. 2015 Dec 17;163(7):1770-1782.

**Carroll SB**. Homeotic genes and the evolution of arthropods and chordates. *Nature*. 1995 Aug 10;376(6540):479-85.

**Casarosa S**, Andreatzoli M, Simeone A, Barsacchi G. Xrx1, a novel *Xenopus* homeobox gene expressed during eye and pineal gland development. *Mech Dev*. 1997 Jan;61(1-2):187-98.

**Cavaliere V**, Spinelli G, Di Bernardo M. Impairing Otp homeodomain function in oral ectoderm cells affects skeletogenesis in sea urchin embryos. *Dev Biol*. 2003 Oct 1;262(1):107-18.

**Cenci C**, **Gould AP**. *Drosophila* Grainyhead specifies late programmes of neural proliferation by regulating the mitotic activity and Hox-dependent apoptosis of neuroblasts. *Development*. 2005 Sep;132(17):3835-45.

**Charmandari E**, Tsigos C, Chrousos G. Endocrinology of the stress response. *Annu Rev Physiol*. 2005;67:259-84.

- Chen J**, Reiher W, Hermann-Luibl C, Sellami A, Cognigni P, Kondo S, Helfrich-Förster C, Veenstra JA, Wegener C. Allatostatin A signalling in *Drosophila* regulates feeding and sleep and is modulated by PDF. *PLoS Genet*. 2016 Sep 30;12(9):e1006346.
- Chen X**. A microRNA as a translational repressor of APETALA2 in *Arabidopsis* flower development. *Science*. 2004 Mar 26;303(5666):2022-5.
- Chen YW**, Song S, Weng R, Verma P, Kugler JM, Buescher M, Rouam S, Cohen SM. Systematic study of *Drosophila* microRNA functions using a collection of targeted knockout mutations. *Dev Cell*. 2014 Dec 22;31(6):784-800.
- Chou YH**, Spletter ML, Yaksi E, Leong JC, Wilson RI, Luo L. Diversity and wiring variability of olfactory local interneurons in the *Drosophila* antennal lobe. *Nat Neurosci*. 2010 Apr;13(4):439-49.
- Cretekos CJ**, Wang Y, Green ED, Martin JF, Rasweiler JJ 4th, Behringer RR. Regulatory divergence modifies limb length between mammals. *Genes Dev*. 2008 Jan 15;22(2):141-51.
- Crittenden JR**, Skoulakis EM, Han KA, Kalderon D, Davis RL. Tripartite mushroom body architecture revealed by antigenic markers. *Learn Mem*. 1998 May-Jun;5(1-2):38-51.
- Cubas P**, de Celis JF, Campuzano S, Modolell J. Proneural clusters of achaete-scute expression and the generation of sensory organs in the *Drosophila* imaginal wing disc. *Genes Dev*. 1991 Jun;5(6):996-1008.
- Curt JR**, Yaghmaeian Salmani B, Thor S. Anterior CNS expansion driven by brain transcription factors. *Elife*. 2019 Jul 4;8:e45274.
- Dai JD**, **Gilbert LI**. Metamorphosis of the *corpus allatum* and degeneration of the prothoracic glands during the larval-pupal-adult transformation of *Drosophila melanogaster*: a cytophysiological analysis of the ring gland. *Dev Biol*. 1991 Apr;144(2):309-26.
- D'Aniello B**, Pinelli C, Jadhao AG, Rastogi RK, Meyer DL. Comparative analysis of FMRFamide-like immunoreactivity in caiman (*Caiman crocodylus*) and turtle (*Trachemys scripta elegans*) brains. *Cell Tissue Res*. 1999 Dec;298(3):549-59.
- Das A**, Sen S, Lichtneckert R, Okada R, Ito K, Rodrigues V, Reichert H. *Drosophila* olfactory local interneurons and projection neurons derive from a common neuroblast lineage specified by the *empty spiracles* gene. *Neural Dev*. 2008 Dec 3;3:33.
- Das A**, Chiang A, Davla S, Priya R, Reichert H, VijayRaghavan K, Rodrigues V. Identification and analysis of a glutamatergic local interneuron lineage in the adult *Drosophila* olfactory system. *Neural Syst Circuits*. 2011 Jan 26;1(1):4.
- Das A**, Gupta T, Davla S, Prieto-Godino LL, Diegelmann S, Reddy OV, Raghavan KV, Reichert H, Lovick J, Hartenstein V. Neuroblast lineage-specific origin of the neurons of the *Drosophila* larval olfactory system. *Dev Biol*. 2013 Jan 15;373(2):322-37.
- Datta S**. Control of proliferation activation in quiescent neuroblasts of the *Drosophila* central nervous system. *Development*. 1995 Apr;121(4):1173-82.
- Davie K**, Janssens J, Koldere D, De Waegeneer M, Pech U, Kreft Ł, Aibar S, Makhzami S, Christiaens V, Bravo González-Blas C, Poovathingal S, Hulselmans G, Spanier KI, Moerman T, Vanspauwen B, Geurs S, Voet T, Lammertyn J, Thienpont B, Liu S, Konstantinides N, Fiers M, Verstreken P, Aerts S. A single-cell transcriptome atlas of the aging *Drosophila* brain. *Cell*. 2018 Aug 9;174(4):982-998.e20.



- Davis** RJ, Tavsanlı BC, Dittrich C, Walldorf U, Mardon G. *Drosophila retinal homeobox (drx)* is not required for establishment of the visual system, but is required for brain and clypeus development. *Dev Biol.* 2003 Jul 15;259(2):272-87.
- Davis** RL. Olfactory memory formation in *Drosophila*: from molecular to systems neuroscience. *Annu Rev Neurosci.* 2005;28:275-302.
- De Belle** JS, Heisenberg M. Associative odor learning in *Drosophila* abolished by chemical ablation of mushroom bodies. *Science.* 1994 Feb 4;263(5147):692-5.
- Del Giacco** L, Sordino P, Pistocchi A, Andreakis N, Tarallo R, Di Benedetto B, Cotelli F. Differential regulation of the zebrafish orthopedia 1 gene during fate determination of diencephalic neurons. *BMC Dev Biol.* 2006 Oct 30;6:50.
- Diaz** C, **Puelles** L. Developmental genes and malformations in the hypothalamus. *Front Neuroanat.* 2020 Nov 26;14:607111.
- Di Bernardo** M, Castagnetti S, Bellomonte D, Oliveri P, Melfi R, Palla F, Spinelli G. 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.* 1999 May;126(10):2171-9.
- Di Bernardo** M, Bellomonte D, Castagnetti S, Melfi R, Oliveri P, Spinelli G. Homeobox genes and sea urchin development. *Int J Dev Biol.* 2000;44(6):637-43.
- Diesner** M, Predel R, Neupert S. Neuropeptide mapping of dimmed cells of adult *Drosophila* brain. *J Am Soc Mass Spectrom.* 2018 May;29(5):890-902.
- Dietzl** G, Chen D, Schnorrer F, Su KC, Barinova Y, Fellner M, Gasser B, Kinsey K, Oettel S, Scheiblauer S, Couto A, Marra V, Keleman K, Dickson BJ. A genome-wide transgenic RNAi library for conditional gene inactivation in *Drosophila*. *Nature.* 2007 Jul 12;448(7150):151-6.
- Doe** CQ, **Goodman** CS. Early events in insect neurogenesis. I. Development and segmental differences in the pattern of neuronal precursor cells. *Dev Biol.* 1985a Sep;111(1):193-205.
- Doe** CQ, **Goodman** CS. Early events in insect neurogenesis. II. The role of cell interactions and cell lineage in the determination of neuronal precursor cells. *Dev Biol.* 1985b Sep;111(1):206-19.
- Domínguez** L, López JM, González A. Distribution of thyrotropin-releasing hormone (TRH) immunoreactivity in the brain of urodele amphibians. *Brain Behav Evol.* 2008;71(3):231-46.
- Domínguez** L, Morona R, González A, Moreno N. Characterization of the hypothalamus of *Xenopus laevis* during development. I. The alar regions. *J Comp Neurol.* 2013 Mar 1;521(4):725-59.
- Domínguez** L, González A, Moreno N. Characterization of the hypothalamus of *Xenopus laevis* during development. II. The basal regions. *J Comp Neurol.* 2014 Apr 1;522(5):1102-31.
- Domínguez** L, González A, Moreno N. Patterns of hypothalamic regionalization in amphibians and reptiles: common traits revealed by a genoarchitectonic approach. *Front Neuroanat.* 2015 Feb 3;9:3.
- Duffy** JB. GAL4 system in *Drosophila*: a fly geneticist's Swiss army knife. *Genesis.* 2002 Sep-Oct;34(1-2):1-15.
- Dumstrei** K, Wang F, Nassif C, Hartenstein V. Early development of the *Drosophila* brain: V. Pattern of postembryonic neuronal lineages expressing DE-cadherin. *J Comp Neurol.* 2003 Jan 20;455(4):451-62.

- Dus M**, Lai JS, Gunapala KM, Min S, Tayler TD, Hergarden AC, Geraud E, Joseph CM, Suh GS. Nutrient sensor in the brain directs the action of the brain-gut axis in *Drosophila*. *Neuron*. 2015 Jul 1;87(1):139-51.
- Eaton JL**, **Glasgow E**. Zebrafish *orthopedia (otp)* is required for isotocin cell development. *Dev Genes Evol*. 2007 Feb;217(2):149-58.
- Eaton JL**, Holmqvist B, Glasgow E. Ontogeny of vasotocin-expressing cells in zebrafish: selective requirement for the transcriptional regulators *orthopedia* and *single-minded 1* in the preoptic area. *Dev Dyn*. 2008 Apr;237(4):995-1005.
- Egger B**, Gold KS, Brand AH. Notch regulates the switch from symmetric to asymmetric neural stem cell division in the *Drosophila* optic lobe. *Development*. 2010 Sep;137(18):2981-7.
- Eggert T**, Hauck B, Hildebrandt N, Gehring WJ, Walldorf U. Isolation of a *Drosophila* homolog of the vertebrate homeobox gene Rx and its possible role in brain and eye development. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Mar 3;95(5):2343-8.
- Emery JF**, Floyd SK, Alvarez J, Eshed Y, Hawker NP, Izhaki A, Baum SF, Bowman JL. Radial patterning of *Arabidopsis* shoots by class III HD-ZIP and KANADI genes. *Curr Biol*. 2003 Oct 14;13(20):1768-74.
- Erlik T**, Li X, Courgeon M, Bertet C, Chen Z, Baumert R, Ng J, Koo C, Arain U, Behnia R, del Valle Rodriguez A, Senderowicz L, Negre N, White KP, Desplan C. Integration of temporal and spatial patterning generates neural diversity. *Nature*. 2017 Jan 19;541(7637):365-370.
- Eroglu E**, Burkard TR, Jiang Y, Saini N, Homem CCF, Reichert H, Knoblich JA. SWI/SNF complex prevents lineage reversion and induces temporal patterning in neural stem cells. *Cell*. 2014 Mar 13;156(6):1259-1273.
- Fan CM**, Kuwana E, Bulfone A, Fletcher CF, Copeland NG, Jenkins NA, Crews S, Martinez S, Puellas L, Rubenstein JL, Tessier-Lavigne M. Expression patterns of two murine homologs of *Drosophila single-minded* suggest possible roles in embryonic patterning and in the pathogenesis of Down syndrome. *Mol Cell Neurosci*. 1996 Jan;7(1):1-16.
- Federspiel J**. Analyse regulatorischer Elemente des *Drosophila* Gens *homeobrain* mit Hilfe des CRISPR/Cas9-Systems und Gene-Targeting. Bachelorarbeit, Universität des Saarlandes. 2016.
- Findji I**. Regulation of the *Drosophila melanogaster* gene *homeobrain* during development. Bachelorarbeit, Universität des Saarlandes. 2018.
- Fischbach K-F**, **Dittrich APM**. The optic lobe of *Drosophila melanogaster*. I. A Golgi analysis of wild-type structure *Cell and Tissue Research*. 1989, 258:441-475.
- Fishilevich E**, Domingos AI, Asahina K, Naef F, Vosshall LB, Louis M. Chemotaxis behavior mediated by single larval olfactory neurons in *Drosophila*. *Curr Biol*. 2005 Dec 6;15(23):2086-96.
- Fliers E**, Kalsbeek A, Boelen A. Beyond the fixed setpoint of the hypothalamus-pituitary-thyroid axis. *Eur J Endocrinol*. 2014 Nov;171(5):R197-208.
- Frampton AE**, Castellano L, Colombo T, Giovannetti E, Krell J, Jacob J, Pellegrino L, Roca-Alonso L, Funel N, Gall TM, Ahmad R, Habib NA, Knösel T, Stebbing J, Jiao LR. Integrated molecular analysis to investigate the role of microRNAs in pancreatic tumour growth and progression. *Lancet*. 2015 Feb 26;385 Suppl 1:S37.
- Frigerio G**, Burri M, Bopp D, Baumgartner S, Noll M. Structure of the segmentation gene *paired* and the *Drosophila* PRD gene set as part of a gene network. *Cell*. 1986 Dec 5;47(5):735-46.

- Friggi-Grelin F**, Lavenant-Staccini L, Therond P. Control of antagonistic components of the hedgehog signaling pathway by microRNAs in *Drosophila*. *Genetics*. 2008 May;179(1):429-39.
- Fürst N**. Untersuchung von regulatorischen Elementen des Gens *DRx* mittels Gene-Targeting in *Drosophila melanogaster*. Bachelorarbeit, Universität des Saarlandes. 2019.
- Furukawa T**, Kozak CA, Cepko CL. *rax*, a novel paired-type homeobox gene, shows expression in the anterior neural fold and developing retina. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997 Apr 1;94(7):3088-93.
- Gal JS**, Morozov YM, Ayoub AE, Chatterjee M, Rakic P, Haydar TF. Molecular and morphological heterogeneity of neural precursors in the mouse neocortical proliferative zones. *J Neurosci*. 2006 Jan 18;26(3):1045-56.
- Galliot B**, de Vargas C, Miller D. Evolution of homeobox genes: Q50 Paired-like genes founded the Paired class. *Dev Genes Evol*. 1999 Mar;209(3):186-97.
- Gao S**, Takemura SY, Ting CY, Huang S, Lu Z, Luan H, Rister J, Thum AS, Yang M, Hong ST, Wang JW, Odenwald WF, White BH, Meinertzhagen IA, Lee CH. The neural substrate of spectral preference in *Drosophila*. *Neuron*. 2008 Oct 23;60(2):328-42.
- García-Calero E**, Fernández-Garre P, Martínez S, Puelles L. Early mammillary pouch specification in the course of prechordal ventralization of the forebrain tegmentum. *Dev Biol*. 2008 Aug 15;320(2):366-77.
- George EL**, Ober MB, Emerson CP Jr. Functional domains of the *Drosophila melanogaster* muscle myosin heavy-chain gene are encoded by alternatively spliced exons. *Mol Cell Biol*. 1989 Jul;9(7):2957-74.
- Gilbert LI**, Song Q, Rybczynski R. Control of ecdysteroidogenesis: activation and inhibition of prothoracic gland activity. *Invert Neurosci*. 1997 Sep-Dec;3(2-3):205-16.
- Gilbert LI**, Granger NA, Roe RM. The juvenile hormones: historical facts and speculations on future research directions. *Insect Biochem Mol Biol*. 2000 Aug-Sep;30(8-9):617-44.
- Gore AC**. GnRH: The master molecule of reproduction. Norwell, MA: Kluwer Academic Publishers, 2002.
- Goodman CS**, Doe CQ. Embryonic development of the *Drosophila* CNS. *The Development of Drosophila Melanogaster*, Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1993;1131-1206.
- Goshu E**, Jin H, Lovejoy J, Marion JF, Michaud JL, Fan CM. Sim2 contributes to neuroendocrine hormone gene expression in the anterior hypothalamus. *Mol Endocrinol*. 2004 May;18(5):1251-62.
- Grattan DR**. 60 YEARS OF NEUROENDOCRINOLOGY: The hypothalamo-prolactin axis. *J Endocrinol*. 2015 Aug;226(2):T101-22.
- Graveley BR**, Brooks AN, Carlson JW, Duff MO, Landolin JM, Yang L, Artieri CG, van Baren MJ, Boley N, Booth BW, Brown JB, Cherbas L, Davis CA, Dobin A, Li R, Lin W, Malone JH, Mattiuzzo NR, Miller D, Sturgill D, Tuch BB, Zaleski C, Zhang D, Blanchette M, Dudoit S, Eads B, Green RE, Hammonds A, Jiang L, Kapranov P, Langton L, Perrimon N, Sandler JE, Wan KH, Willingham A, Zhang Y, Zou Y, Andrews J, Bickel PJ, Brenner SE, Brent MR, Cherbas P, Gingeras TR, Hoskins RA, Kaufman TC, Oliver B, Celniker SE. The developmental transcriptome of *Drosophila melanogaster*. *Nature*. 2011 Mar 24;471(7339):473-9.

**Grossniklaus** U, Pearson RK, Gehring WJ. The *Drosophila* sloppy paired locus encodes two proteins involved in segmentation that show homology to mammalian transcription factors. *Genes Dev.* 1992 Jun;6(6):1030-51.

**Groth** AC, Fish M, Nusse R, Calos MP. Construction of transgenic *Drosophila* by using the site-specific integrase from phage phiC31. *Genetics.* 2004 Apr;166(4):1775-82.

**Guo** C, Du Y, Yuan D, Li M, Gong H, Gong Z, Liu L. A conditioned visual orientation requires the ellipsoid body in *Drosophila*. *Learn Mem.* 2014 Dec 15;22(1):56-63.

**Guo** X, Yin C, Yang F, Zhang Y, Huang H, Wang J, Deng B, Cai T, Rao Y, Xi R. The cellular diversity and transcription factor code of *Drosophila* enteroendocrine cells. *Cell Rep.* 2019 Dec 17;29(12):4172-4185.e5.

**Haenfler** JM, Kuang C, Lee CY. Cortical aPKC kinase activity distinguishes neural stem cells from progenitor cells by ensuring asymmetric segregation of Numb. *Dev Biol.* 2012 May 1;365(1):219-28.

**Hammond** SM, Bernstein E, Beach D, Hannon GJ. An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature.* 2000 Mar 16;404(6775):293-6.

**Hanesch** U, Fischbach KF, Heisenberg M. Neuronal architecture of the central complex in *Drosophila melanogaster*. *Cell Tissue Res.* 1989;257:343-366.

**Hartenstein** V, **Campos-Ortega** JA. Early neurogenesis in wild-type *Drosophila melanogaster*. *Wilehm Roux Arch Dev Biol.* 1984 Sep;193(5):308-325.

**Hartenstein** V. The neuroendocrine system of invertebrates: a developmental and evolutionary perspective. *J Endocrinol.* 2006 Sep;190(3):555-70.

**Hartmann** B, Castelo R, Miñana B, Peden E, Blanchette M, Rio DC, Singh R, Valcárcel J. Distinct regulatory programs establish widespread sex-specific alternative splicing in *Drosophila melanogaster*. *RNA.* 2011 Mar;17(3):453-68.

**Hartwig** O. Generation of a donor line for *hbn* gene targeting and screen for candidate genes concerning preoral brain commissure formation in *Drosophila melanogaster*. Bachelorarbeit, Universität des Saarlandes. 2014.

**Hashimoto** H, Yabe T, Hirata T, Shimizu T, Bae Y, Yamanaka Y, Hirano T, Hibi M. Expression of the zinc finger gene *fez-like* in zebrafish forebrain. *Mech Dev.* 2000 Oct;97(1-2):191-5.

**Hastings** GA, Emerson CP Jr. Myosin functional domains encoded by alternative exons are expressed in specific thoracic muscles of *Drosophila*. *J Cell Biol.* 1991 Jul;114(2):263-76.

**Hattori** D, Demir E, Kim HW, Viragh E, Zipursky SL, Dickson BJ. Dscam diversity is essential for neuronal wiring and self-recognition. *Nature.* 2007 Sep 13;449(7159):223-7.

**He** H, He L, Gu M. Role of microRNAs in aluminum stress in plants. *Plant Cell Rep.* 2014 Jun;33(6):831-6.

**Heimbeck** G, Bugnon V, Gendre N, Häberlin C, Stocker RF. Smell and taste perception in *Drosophila melanogaster* larva: toxin expression studies in chemosensory neurons. *J Neurosci.* 1999 Aug 1;19(15):6599-609.

**Heimbeck** G, Bugnon V, Gendre N, Keller A, Stocker RF. A central neural circuit for experience-independent olfactory and courtship behavior in *Drosophila melanogaster*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2001 Dec 18;98(26):15336-41.

**Heisenberg** M. Mushroom body memoir: from maps to models. Nat Rev Neurosci. 2003 Apr;4(4):266-75.

**Herget** U, Wolf A, Wullimann MF, Ryu S. Molecular neuroanatomy and chemoarchitecture of the neurosecretory preoptic-hypothalamic area in zebrafish larvae. J Comp Neurol. 2014 May 1;522(7):1542-64.

**Hildebrand** JG, **Shepherd** GM. Mechanisms of olfactory discrimination: converging evidence for common principles across phyla. Annu Rev Neurosci. 1997;20:595-631.

**Hildebrandt** K. Analyse der nervensystemspezifischen Funktion von *orthopedia* durch *Genetargeting* und mithilfe des CRISPR/Cas9-Systems in *Drosophila melanogaster*. Bachelorarbeit, Universität des Saarlandes. 2015.

**Hildebrandt** K. Analyse der nervensystemspezifischen Funktion des Gens *orthopedia* und ihre Regulation durch die microRNA miR-252 in *Drosophila melanogaster*. Masterarbeit, Universität des Saarlandes. 2017

**Hildebrandt** K, Bach N, Kolb D, Walldorf U. The homeodomain transcription factor Orthopedia is involved in development of the *Drosophila* hindgut. Hereditas. 2020 Nov 19;157(1):46.

**Hildebrandt** K, Klöppel C, Gogel J, Hartenstein V, Walldorf U. Orthopedia expression during *Drosophila melanogaster* nervous system development and its regulation by microRNA-252. Dev Biol. 2022a Sep 27;S0012-1606(22)00177-4.

**Hildebrandt** K, Kolb D, Klöppel C, Kaspar P, Wittling F, Hartwig O, Federspiel J, Findji I, Walldorf U. Regulatory modules mediating the complex neural expression patterns of the *homeobrain* gene during *Drosophila* brain development. Hereditas. 2022b Jan 5;159(1):2.

**Hildebrandt** K, Kübel S, Minet M, Fürst N, Klöppel C, Steinmetz E, Walldorf U. Enhancer analysis of the *Drosophila* zinc finger transcription factor Earmuff by gene targeting. Hereditas. 2021 Nov 4;158(1):41.

**Hilgers** V, Bushati N, Cohen SM. *Drosophila* microRNAs 263a/b confer robustness during development by protecting nascent sense organs from apoptosis. PLoS Biol. 2010 Jun 15;8(6):e1000396.

**Hiromi** Y, Kuroiwa A, Gehring WJ. Control elements of the *Drosophila* segmentation gene *fushi tarazu*. Cell. 1985 Dec;43(3 Pt 2):603-13.

**Homem** CCF, Steinmann V, Burkard TR, Jais A, Esterbauer H, Knoblich JA. Ecdysone and mediator change energy metabolism to terminate proliferation in *Drosophila* neural stem cells. Cell. 2014 Aug 14;158(4):874-888.

**Hong** JW, Hendrix DA, Levine MS. Shadow enhancers as a source of evolutionary novelty. Science. 2008 Sep 5;321(5894):1314.

- Hoppe C**, Ashe HL. CRISPR-Cas9 strategies to insert MS2 stem-loops into endogenous loci in *Drosophila* embryos. STAR Protoc. 2021 Mar 18;2(1):100380.
- Hoskins RA**, Nelson CR, Berman BP, Laverty TR, George RA, Ciesiolka L, Naeemuddin M, Arenson AD, Durbin J, David RG, Tabor PE, Bailey MR, DeShazo DR, Catanese J, Mammoser A, Osoegawa K, de Jong PJ, Celniker SE, Gibbs RA, Rubin GM, Scherer SE. A BAC-based physical map of the major autosomes of *Drosophila melanogaster*. Science. 2000 Mar 24;287(5461):2271-4.
- Hsu CT**, Bhandawat V. Organization of descending neurons in *Drosophila melanogaster*. Sci Rep. 2016 Feb 3;6:20259.
- Huang H**, Li J, Hu L, Ge L, Ji H, Zhao Y, Zhang L. *Bantam* is essential for *Drosophila* intestinal stem cell proliferation in response to Hippo signaling. Dev Biol. 2014 Jan 15;385(2):211-9.
- Huang J**, Zhang W, Qiao W, Hu A, Wang Z. Functional connectivity and selective odor responses of excitatory local interneurons in *Drosophila* antennal lobe. Neuron. 2010 Sep 23;67(6):1021-33.
- Huang K**, Doyle F, Wurz ZE, Tenenbaum SA, Hammond RK, Caplan JL, Meyers BC. FASTmiR: an RNA-based sensor for *in vitro* quantification and live-cell localization of small RNAs. Nucleic Acids Res. 2017 Aug 21;45(14):e130.
- Hung RJ**, Hu Y, Kirchner R, Liu Y, Xu C, Comjean A, Tattikota SG, Li F, Song W, Ho Sui S, Perrimon N. A cell atlas of the adult *Drosophila* midgut. Proc Natl Acad Sci U S A. 2020 Jan 21;117(3):1514-1523.
- Ibáñez-Ventoso C**, Vora M, Driscoll M. Sequence relationships among *C. elegans*, *D. melanogaster* and human microRNAs highlight the extensive conservation of microRNAs in biology. PLoS One. 2008 Jul 30;3(7):e2818.
- Ilius M**, Wolf R, Heisenberg M. The central complex of *Drosophila melanogaster* is involved in flight control: studies on mutants and mosaics of the gene *ellipsoid body open*. J Neurogenet. 2007 Oct-Dec;21(4):321-38.
- Iovino N**, Pane A, Gaul U. miR-184 has multiple roles in *Drosophila* female germline development. Dev Cell. 2009 Jul;17(1):123-33.
- Ito K**, **Hotta Y**. Proliferation pattern of postembryonic neuroblast in the brain of *Drosophila melanogaster*. Dev Biol. 1992 Jan;149(1):134-148.
- Ito K**, Awano W, Suzuki K, Hiromi Y, Yamamoto D. The *Drosophila* mushroom body is a quadruple structure of clonal units each of which contains a virtually identical set of neurones and glial cells. Development. 1997 Feb;124(4):761-71.
- Ito K**, **Awasaki T**. Clonal unit architecture of the adult fly brain. Adv Exp Med Biol. 2008;628:137-58.
- Ito K**, Shinomiya K, Ito M, Armstrong JD, Boyan G, Hartenstein V, Harzsch S, Heisenberg M, Homberg U, Jenett A, Keshishian H, Restifo LL, Rössler W, Simpson JH, Strausfeld NJ, Strauss R, Vosshall LB; Insect Brain Name Working Group. A systematic nomenclature for the insect brain. Neuron. 2014 Feb 19;81(4):755-65.
- Ito M**, Masuda N, Shinomiya K, Endo K, Ito K. Systematic analysis of neural projections reveals clonal composition of the *Drosophila* brain. Curr Biol. 2013 Apr 22;23(8):644-55.

**Iwaki** DD, Johansen KA, Singer JB, Lengyel JA. *Drumstick, bowl, and lines* are required for patterning and cell rearrangement in the *Drosophila* embryonic hindgut. *Dev Biol.* 2001 Dec 15;240(2):611-26.

**Izergina** N, Balmer J, Bello B, Reichert H. Postembryonic development of transit amplifying neuroblast lineages in the *Drosophila* brain. *Neural Dev.* 2009 Dec 11;4:44.

**Janssens** DH, Hamm DC, Anhezini L, Xiao Q, Siller KH, Siegrist SE, Harrison MM, Lee CY. An Hdac1/Rpd3-poised circuit balances continual self-renewal and rapid restriction of developmental potential during asymmetric stem cell division. *Dev Cell.* 2017 Feb 27;40(4):367-380.e7.

**Janssens** DH, Komori H, Grbac D, Chen K, Koe CT, Wang H, Lee CY. Earmuff restricts progenitor cell potential by attenuating the competence to respond to self-renewal factors. *Development.* 2014 Mar;141(5):1036-46.

**Janssens** DH, **Lee** CY. It takes two to tango, a dance between the cells of origin and cancer stem cells in the *Drosophila* larval brain. *Semin Cell Dev Biol.* 2014 Apr;28:63-9.

**Jarman** AP, Brand M, Jan LY, Jan YN. The regulation and function of the helix-loop-helix gene, *asense*, in *Drosophila* neural precursors. *Development.* 1993 Sep;119(1):19-29.

**Jefferis** GS, Marin EC, Stocker RF, Luo L. Target neuron prespecification in the olfactory map of *Drosophila*. *Nature.* 2001 Nov 8;414(6860):204-8.

**Jékely** G, Melzer S, Beets I, Kadow ICG, Koene J, Haddad S, Holden-Dye L. The long and the short of it - a perspective on peptidergic regulation of circuits and behaviour. *J Exp Biol.* 2018 Feb 8;221(Pt 3):jeb166710.

**Jenett** A, Rubin GM, Ngo TT, Shepherd D, Murphy C, Dionne H, Pfeiffer BD, Cavallaro A, Hall D, Jeter J, Iyer N, Fetter D, Hausenfluck JH, Peng H, Trautman ET, Svirskas RR, Myers EW, Iwinski ZR, Aso Y, DePasquale GM, Enos A, Hulamm P, Lam SC, Li HH, Lavery TR, Long F, Qu L, Murphy SD, Rokicki K, Safford T, Shaw K, Simpson JH, Sowell A, Tae S, Yu Y, Zugates CT. A GAL4-driver line resource for *Drosophila* neurobiology. *Cell Rep.* 2012 Oct 25;2(4):991-1001.

**Ji** J, Shi J, Budhu A, Yu Z, Forgues M, Roessler S, Ambs S, Chen Y, Meltzer PS, Croce CM, Qin LX, Man K, Lo CM, Lee J, Ng IO, Fan J, Tang ZY, Sun HC, Wang XW. MicroRNA expression, survival, and response to interferon in liver cancer. *N Engl J Med.* 2009 Oct 8;361(15):1437-47.

**Joiner** WJ, Crocker A, White BH, Sehgal A. Sleep in *Drosophila* is regulated by adult mushroom bodies. *Nature.* 2006 Jun 8;441(7094):757-60.

**Jory** A, Estella C, Giorgianni MW, Slattery M, Lavery TR, Rubin GM, Mann RS. A survey of 6,300 genomic fragments for cis-regulatory activity in the imaginal discs of *Drosophila melanogaster*. *Cell Rep.* 2012 Oct 25;2(4):1014-24.

**Jumper** J, Evans R, Pritzel A, Green T, Figurnov M, Ronneberger O, Tunyasuvunakool K, Bates R, Žídek A, Potapenko A, Bridgland A, Meyer C, Kohl SAA, Ballard AJ, Cowie A, Romera-Paredes B, Nikolov S, Jain R, Adler J, Back T, Petersen S, Reiman D, Clancy E, Zielinski M, Steinegger M, Pacholska M, Berghammer T, Bodenstein S, Silver D, Vinyals O, Senior AW, Kavukcuoglu K, Kohli P, Hassabis D. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature.* 2021 Aug;596(7873):583-589.

**Kamikouchi** A, Inagaki HK, Effertz T, Hendrich O, Fiala A, Göpfert MC, Ito K. The neural basis of *Drosophila* gravity-sensing and hearing. *Nature.* 2009 Mar 12;458(7235):165-71.

**Kapan N**, Lushchak OV, Luo J, Nässel DR. Identified peptidergic neurons in the *Drosophila* brain regulate insulin-producing cells, stress responses and metabolism by coexpressed short neuropeptide F and corazonin. *Cell Mol Life Sci*. 2012 Dec;69(23):4051-66.

**Kaprara A**, **Huhtaniemi IT**. The hypothalamus-pituitary-gonad axis: Tales of mice and men. *Metabolism*. 2018 Sep;86:3-17.

**Karess RE**, Rubin GM. Analysis of P transposable element functions in *Drosophila*. *Cell*. 1984 Aug;38(1):135-46.

**Kasschau KD**, Xie Z, Allen E, Llave C, Chapman EJ, Krizan KA, Carrington JC. P1/HC-Pro, a viral suppressor of RNA silencing, interferes with *Arabidopsis* development and miRNA unctio. *Dev Cell*. 2003 Feb;4(2):205-17.

**Kaufman TC**, Lewis R, Wakimoto B. Cytogenetic analysis of chromosome 3 in *Drosophila melanogaster*: The homoeotic gene complex in polytene chromosome interval 84a-B. *Genetics*. 1980 Jan;94(1):115-33.

**Kavaler J**, Duan H, Aradhya R, de Navas LF, Joseph B, Shklyar B, Lai EC. MiRNA suppression of a Notch repressor directs non-neuronal fate in *Drosophila* mechanosensory organs. *J Cell Biol*. 2018 Feb 5;217(2):571-583.

**Khan MR**, Li L, Pérez-Sánchez C, Saraf A, Florens L, Slaughter BD, Unruh JR, Si K. Amyloidogenic oligomerization transforms *Drosophila* Orb2 from a translation repressor to an activator. *Cell*. 2015 Dec 3;163(6):1468-83.

**Khorshid M**, Hausser J, Zavolan M, van Nimwegen E. A biophysical miRNA-mRNA interaction model infers canonical and noncanonical targets. *Nat Methods*. 2013 Mar;10(3):253-5.

**Kim SM**, Su CY, Wang JW. Neuromodulation of innate behaviors in *Drosophila*. *Annu Rev Neurosci*. 2017 Jul 25;40:327-348.

**Klöppel C**, Hildebrandt K, Kolb D, Fürst N, Bley I, Karlowatz RJ, Walldorf U. Functional analysis of enhancer elements regulating the expression of the *Drosophila* homeodomain transcription factor DRx by gene targeting. *Hereditas*. 2021 Nov 5;158(1):42.

**Kolb D**, Kaspar P, Klöppel C, Walldorf U. The *Drosophila* homeodomain transcription factor Homeobrain is involved in the formation of the embryonic protocerebrum and the supraesophageal brain commissure. *Cells Dev*. 2021 Mar;165:203657.

**Komori H**, Xiao Q, McCartney BM, Lee CY. Brain tumor specifies intermediate progenitor cell identity by attenuating  $\beta$ -catenin/Armadillo activity. *Development*. 2014 Jan;141(1):51-62.

**Kong EC**, Woo K, Li H, Lebestky T, Mayer N, Sniffen MR, Heberlein U, Bainton RJ, Hirsh J, Wolf FW. A pair of dopamine neurons target the D1-like dopamine receptor DopR in the central complex to promote ethanol-stimulated locomotion in *Drosophila*. *PLoS One*. 2010 Apr 1;5(4):e9954.

**Konstantinides N**, Holguera I, Rossi AM, Escobar A, Dudragne L, Chen YC, Tran TN, Martínez Jaimes AM, Özel MN, Simon F, Shao Z, Tsankova NM, Fullard JF, Walldorf U, Roussos P, Desplan C. A complete temporal transcription factor series in the fly visual system. *Nature*. 2022 Apr;604(7905):316-322.



**Kota** J, Chivukula RR, O'Donnell KA, Wentzel EA, Montgomery CL, Hwang HW, Chang TC, Vivekanandan P, Torbenson M, Clark KR, Mendell JR, Mendell JT. Therapeutic microRNA delivery suppresses tumorigenesis in a murine liver cancer model. *Cell*. 2009 Jun 12;137(6):1005-17.

**Kottler** B, Faville R, Bridi JC, Hirth F. Inverse control of turning behavior by Dopamine D1 receptor signaling in columnar and ring neurons of the Central Complex in *Drosophila*. *Curr Biol*. 2019 Feb 18;29(4):567-577.e6.

**Kraft** KF, Massey EM, Kolb D, Walldorf U, Urbach R. Retinal homeobox promotes cell growth, proliferation and survival of mushroom body neuroblasts in the *Drosophila* brain. *Mech Dev*. 2016 Nov;142:50-61.

**Krol** J, Loedige I, Filipowicz W. The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. *Nat Rev Genet*. 2010 Sep;11(9):597-610.

**Kübel** S. Charakterisierung von regulatorischen Elementen des *Drosophila* Gens *earmuff* mittels Gene-Targeting. Bachelorarbeit, Universität des Saarlandes. 2019.

**Kubrak** O, Koyama T, Ahrentlöv N, Jensen L, Malita A, Naseem MT, Lassen M, Nagy S, Texada MJ, Halberg KV, Rewitz K. The gut hormone Allatostatin C/Somatostatin regulates food intake and metabolic homeostasis under nutrient stress. *Nat Commun*. 2022 Feb 4;13(1):692.

**Kuert** PA, Hartenstein V, Bello BC, Lovick JK, Reichert H. Neuroblast lineage identification and lineage-specific Hox gene action during postembryonic development of the subesophageal ganglion in the *Drosophila* central brain. *Dev Biol*. 2014 Jun 15;390(2):102-15.

**Kunz** T, Kraft KF, Technau GM, Urbach R. Origin of *Drosophila* mushroom body neuroblasts and generation of divergent embryonic lineages. *Development*. 2012 Jul;139(14):2510-22.

**Kusch** T, Storck T, Walldorf U, Reuter R. Brachyury proteins regulate target genes through modular binding sites in a cooperative fashion. *Genes Dev*. 2002 Feb 15;16(4):518-29.

**Kvon** EZ, Kazmar T, Stampfel G, Yáñez-Cuna JO, Pagani M, Schernhuber K, Dickson BJ, Stark A. Genome-scale functional characterization of *Drosophila* developmental enhancers *in vivo*. *Nature*. 2014 Aug 7;512(7512):91-5.

**Kvon** EZ. Using transgenic reporter assays to functionally characterize enhancers in animals. *Genomics*. 2015 Sep;106(3):185-192.

**Lai** SL, Awasaki T, Ito K, Lee T. Clonal analysis of *Drosophila* antennal lobe neurons: diverse neuronal architectures in the lateral neuroblast lineage. *Development*. 2008 Sep;135(17):2883-93.

**Lam** V, Tokusumi T, Tokusumi Y, Schulz RA. *Bantam* miRNA is important for *Drosophila* blood cell homeostasis and a regulator of proliferation in the hematopoietic progenitor niche. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014 Oct 24;453(3):467-72.

**Larsen** C, Shy D, Spindler SR, Fung S, Peraanu W, Younossi-Hartenstein A, Hartenstein V. Patterns of growth, axonal extension and axonal arborization of neuronal lineages in the developing *Drosophila* brain. *Dev Biol*. 2009 Nov 15;335(2):289-304.

**Laski** FA, Rio DC, Rubin GM. Tissue specificity of *Drosophila* P element transposition is regulated at the level of mRNA splicing. *Cell*. 1986 Jan 17;44(1):7-19.

- Lebestky T**, Chang JS, Dankert H, Zelnik L, Kim YC, Han KA, Wolf FW, Perona P, Anderson DJ. Two different forms of arousal in *Drosophila* are oppositely regulated by the dopamine D1 receptor ortholog DopR via distinct neural circuits. *Neuron*. 2009 Nov 25;64(4):522-36.
- Lee RC**, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*. 1993 Dec 3;75(5):843-54.
- Lee T**, Lee A, Luo L. Development of the *Drosophila* mushroom bodies: sequential generation of three distinct types of neurons from a neuroblast. *Development*. 1999 Sep;126(18):4065-76.
- Lee Y**, Kim M, Han J, Yeom KH, Lee S, Baek SH, Kim VN. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J*. 2004 Oct 13;23(20):4051-60.
- Lewis EB**. A gene complex controlling segmentation in *Drosophila*. *Nature*. 1978 Dec 7;276(5688):565-70.
- Li R**, Yao X, Zhou H, Jin P, Ma F. The *Drosophila* miR-959-962 cluster members repress toll signaling to regulate antibacterial defense during bacterial infection. *Int J Mol Sci*. 2021 Jan 17;22(2):886.
- Li X**, Chen R, Zhu S. bHLH-O proteins balance the self-renewal and differentiation of *Drosophila* neural stem cells by regulating Earmuff expression. *Dev Biol*. 2017 Nov 15;431(2):239-251.
- Li X**, Erlik T, Bertet C, Chen Z, Voutev R, Venkatesh S, Morante J, Celik A, Desplan C. Temporal patterning of *Drosophila* medulla neuroblasts controls neural fates. *Nature*. 2013 Jun 27;498(7455):456-62.
- Li X**, Xie Y, Zhu S. Notch maintains *Drosophila* type II neuroblasts by suppressing expression of the Fez transcription factor Earmuff. *Development*. 2016 Jul 15;143(14):2511-21.
- Li Y**, **Padgett RW**. *Bantam* is required for optic lobe development and glial cell proliferation. *PLoS One*. 2012;7(3):e32910.
- Lim DH**, Lee S, Han JY, Choi MS, Hong JS, Seong Y, Kwon YS, Lee YS. Ecdysone-responsive microRNA-252-5p controls the cell cycle by targeting *Abi* in *Drosophila*. *FASEB J*. 2018 Aug;32(8):4519-4533.
- Lim DH**, Lee S, Han JY, Choi MS, Hong JS, Lee YS. MicroRNA miR-252 targets *mbt* to control the developmental growth of *Drosophila*. *Insect Mol Biol*. 2019 Jun;28(3):444-454.
- Lim LP**, Lau NC, Garrett-Engele P, Grimson A, Schelter JM, Castle J, Bartel DP, Linsley PS, Johnson JM. Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. *Nature*. 2005 Feb 17;433(7027):769-73.
- Lin SY**, Johnson SM, Abraham M, Vella MC, Pasquinelli A, Gamberi C, Gottlieb E, Slack FJ. The *C. elegans* hunchback homolog, *hbl-1*, controls temporal patterning and is a probable microRNA target. *Dev Cell*. 2003 May;4(5):639-50.
- Lin X**, State MW, Vaccarino FM, Grealley J, Hass M, Leckman JF. Identification, chromosomal assignment, and expression analysis of the human homeodomain-containing gene *Orthopedia* (OTP). *Genomics*. 1999 Aug 15;60(1):96-104.
- Liu Y**, Liao S, Veenstra JA, Nässel DR. *Drosophila* insulin-like peptide 1 (DILP1) is transiently expressed during non-feeding stages and reproductive dormancy. *Sci Rep*. 2016 May 20;6:26620.

- Liu Z**, Tabuloc CA, Xue Y, Cai Y, Mcintire P, Niu Y, Lam VH, Chiu JC, Zhang Y. Splice variants of DOMINO control *Drosophila* circadian behavior and pacemaker neuron maintenance. PLoS Genet. 2019 Oct 28;15(10):e1008474.
- Loesel R**, Nässel DR, Strausfeld NJ. Common design in a unique midline neuropil in the brains of arthropods. Arthropod Struct Dev. 2002 Sep;31(1):77-91.
- López JM**, Domínguez L, González A. Immunohistochemical localization of thyrotropin-releasing hormone in the brain of reptiles. J Chem Neuroanat. 2008 Dec;36(3-4):251-63.
- Lovick JK**, Ngo KT, Omoto JJ, Wong DC, Nguyen JD, Hartenstein V. Postembryonic lineages of the *Drosophila* brain: I. Development of the lineage-associated fiber tracts. Dev Biol. 2013 Dec 15;384(2):228-57.
- Lu J**, He ML, Wang L, Chen Y, Liu X, Dong Q, Chen YC, Peng Y, Yao KT, Kung HF, Li XP. MiR-26a inhibits cell growth and tumorigenesis of nasopharyngeal carcinoma through repression of EZH2. Cancer Res. 2011 Jan 1;71(1):225-33.
- Lu Y**, Thomson JM, Wong HY, Hammond SM, Hogan BL. Transgenic over-expression of the microRNA miR-17-92 cluster promotes proliferation and inhibits differentiation of lung epithelial progenitor cells. Dev Biol. 2007 Oct 15;310(2):442-53.
- Ludwig P**, Williams L, Boyan G. The *pars intercerebralis* of the locust brain: a developmental and comparative study. Microsc Res Tech. 2002 Feb 1;56(3):174-88.
- Machluf Y**, Gutnick A, Levkowitz G. Development of the zebrafish hypothalamus. Ann N Y Acad Sci. 2011 Mar;1220:93-105.
- Manning L**, Heckscher ES, Purice MD, Roberts J, Bennett AL, Kroll JR, Pollard JL, Strader ME, Lupton JR, Dyukareva AV, Doan PN, Bauer DM, Wilbur AN, Tanner S, Kelly JJ, Lai SL, Tran KD, Kohwi M, Laverty TR, Pearson JC, Crews ST, Rubin GM, Doe CQ. A resource for manipulating gene expression and analyzing cis-regulatory modules in the *Drosophila* CNS. Cell Rep. 2012 Oct 25;2(4):1002-13.
- Marin EC**, Watts RJ, Tanaka NK, Ito K, Luo L. Developmentally programmed remodeling of the *Drosophila* olfactory circuit. Development. 2005 Feb;132(4):725-37.
- Marrone AK**, Edeleva EV, Kucherenko MM, Hsiao NH, Shcherbata HR. Dg-Dys-Syn1 signaling in *Drosophila* regulates the microRNA profile. BMC Cell Biol. 2012 Oct 29;13:26.
- Martelli C**, Pech U, Kobbenbring S, Pauls D, Bahl B, Sommer MV, Pooryasin A, Barth J, Arias CWP, Vassiliou C, Luna AJF, Poppinga H, Richter FG, Wegener C, Fiala A, Riemensperger T. SIFamide translates hunger signals into appetitive and feeding behavior in *Drosophila*. Cell Rep. 2017 Jul 11;20(2):464-478.
- Martin J**, Faure P, Ernst R. The power law distribution for walking-time intervals correlates with the ellipsoid-body in *Drosophila*. J Neurogenet. 2001;15(3-4):205-19.
- Martin JR**, Ernst R, Heisenberg M. Mushroom bodies suppress locomotor activity in *Drosophila melanogaster*. Learn Mem. 1998 May-Jun;5(1-2):179-91.

- Masuda-Nakagawa** LM, Tanaka NK, O'Kane CJ. Stereotypic and random patterns of connectivity in the larval mushroom body calyx of *Drosophila*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2005 Dec 27;102(52):19027-32.
- Masuda-Nakagawa** LM, Gendre N, O'Kane CJ, Stocker RF. Localized olfactory representation in mushroom bodies of *Drosophila* larvae. Proc Natl Acad Sci U S A. 2009 Jun 23;106(25):10314-9.
- Mathers** PH, Grinberg A, Mahon KA, Jamrich M. The Rx homeobox gene is essential for vertebrate eye development. Nature. 1997 Jun 5;387(6633):603-7.
- Matsuo** E, Yamada D, Ishikawa Y, Asai T, Ishimoto H, Kamikouchi A. Identification of novel vibration- and deflection-sensitive neuronal subgroups in Johnston's organ of the fruit fly. Front Physiol. 2014 May 9;5:179.
- Matsuo-Takasaki** M, Lim JH, Beanan MJ, Sato SM, Sargent TD. Cloning and expression of a novel zinc finger gene, Fez, transcribed in the forebrain of *Xenopus* and mouse embryos. Mech Dev. 2000 May;93(1-2):201-4.
- Maurange** C, Cheng L, Gould AP. Temporal transcription factors and their targets schedule the end of neural proliferation in *Drosophila*. Cell. 2008 May 30;133(5):891-902.
- McGinnis** W, Garber RL, Wirz J, Kuroiwa A, Gehring WJ. A homologous protein-coding sequence in *Drosophila* homeotic genes and its conservation in other metazoans. Cell. 1984 Jun;37(2):403-8.
- Medina** L. Evolution and embryological development of forebrain. In Encyclopedia of Neuroscience, eds Binder MD, Hirokawa N, Windhorst U (Berlin Heidelberg: Springer-Verlag), 2008;1172-1192.
- Meinertzhagen** IA, Hanson TE. The development of the optic lobe. In: Bate, Martinez Arias; 1993. S. 1363-491.
- Menzel** P, McCorkindale AL, Stefanov SR, Zinzen RP, Meyer IM. Transcriptional dynamics of microRNAs and their targets during *Drosophila* neurogenesis. RNA Biol. 2019 Jan;16(1):69-81.
- Messiaen** L, Wimmer K. NF1 mutational spectrum. In: Kaufmann D, editor. Neurofibromatoses, vol. 16. Basel: Karger; 2008. p. 63-77.
- Michaud** JL, Rosenquist T, May NR, Fan CM. Development of neuroendocrine lineages requires the bHLH-PAS transcription factor SIM1. Genes Dev. 1998 Oct 15;12(20):3264-75.
- Milyaev** N, Osumi-Sutherland D, Reeve S, Burton N, Baldock RA, Armstrong JD. The Virtual Fly Brain browser and query interface. Bioinformatics. 2012 Feb 1;28(3):411-5.
- Minet** M. Functional characterization of the transcription factors *homeobrain* and *earmuff* during the embryonic brain development of *Drosophila melanogaster*. Masterarbeit, Universität des Saarlandes. 2015.
- Miroschnikow** A, Schlegel P, Schoofs A, Hueckesfeld S, Li F, Schneider-Mizell CM, Fetter RD, Truman JW, Cardona A, Pankratz MJ. Convergence of monosynaptic and polysynaptic sensory paths onto common motor outputs in a *Drosophila* feeding connectome. Elife. 2018 Dec 11;7:e40247.
- Mizutani** K, Yoon K, Dang L, Tokunaga A, Gaiano N. Differential Notch signalling distinguishes neural stem cells from intermediate progenitors. Nature. 2007 Sep 20;449(7160):351-5.

- Moede T**, Leibiger IB, Berggren PO. Alpha cell regulation of beta cell function. *Diabetologia*. 2020;63(10):2064-2075.
- Mohrmann L**, Langenberg K, Krijgsveld J, Kal AJ, Heck AJ, Verrijzer CP. Differential targeting of two distinct SWI/SNF-related *Drosophila* chromatin-remodeling complexes. *Mol Cell Biol*. 2004 Apr;24(8):3077-88.
- Montavon T**, Soshnikova N, Mascrez B, Joye E, Thevenet L, Splinter E, de Laat W, Spitz F, Duboule D. A regulatory archipelago controls Hox genes transcription in digits. *Cell*. 2011 Nov 23;147(5):1132-45.
- Morales-Delgado N**, Merchan P, Bardet SM, Ferrán JL, Puelles L, Díaz C. Topography of Somatostatin gene expression relative to molecular progenitor domains during ontogeny of the mouse hypothalamus. *Front Neuroanat*. 2011 Feb 28;5:10.
- Morales-Delgado N**, Castro-Robles B, Ferrán JL, Martínez-de-la-Torre M, Puelles L, Díaz C. Regionalized differentiation of CRH, TRH, and GHRH peptidergic neurons in the mouse hypothalamus. *Brain Struct Funct*. 2014 May;219(3):1083-111.
- Moreno N**, Domínguez L, Rétaux S, González A. Islet1 as a marker of subdivisions and cell types in the developing forebrain of *Xenopus*. *Neuroscience*. 2008 Jul 17;154(4):1423-39.
- Moreno N**, **González A**. The non-evaginated secondary prosencephalon of vertebrates. *Front Neuroanat*. 2011 Mar 2;5:12.
- Moreno N**, Domínguez L, Morona R, González A. Subdivisions of the turtle *Pseudemys scripta* hypothalamus based on the expression of regulatory genes and neuronal markers. *J Comp Neurol*. 2012 Feb 15;520(3):453-78.
- Mukherjee S**, Paricio N, Sokol NS. A stress-responsive miRNA regulates BMP signaling to maintain tissue homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2021 May 25;118(21):e2022583118.
- Nairz K**, Rottig C, Rintelen F, Zdobnov E, Moser M, Hafen E. Overgrowth caused by misexpression of a microRNA with dispensable wild-type function. *Dev Biol*. 2006 Mar 15;291(2):314-24.
- Nakamura M**, Baldwin D, Hannaford S, Palka J, Montell C. Defective proboscis extension response (DPR), a member of the Ig superfamily required for the gustatory response to salt. *J Neurosci*. 2002 May 1;22(9):3463-72.
- Nässel DR**. Tachykinin-related peptides in invertebrates: a review. *Peptides*. 1999;20(1):141-58.
- Nässel DR**, **Vanden Broeck J**. Insulin/IGF signaling in *Drosophila* and other insects: factors that regulate production, release and post-release action of the insulin-like peptides. *Cell Mol Life Sci*. 2016 Jan;73(2):271-90.
- Nässel DR**, Pauls D, Huetteroth W. Neuropeptides in modulation of *Drosophila* behavior: how to get a grip on their pleiotropic actions. *Curr Opin Insect Sci*. 2019 Dec;36:1-8.
- Nässel DR**, **Zandawala M**. Recent advances in neuropeptide signaling in *Drosophila*, from genes to physiology and behavior. *Prog Neurobiol*. 2019 Aug;179:101607.
- Nassif C**, Noveen A, Hartenstein V. Embryonic development of the *Drosophila* brain. I. Pattern of pioneer tracts. *J Comp Neurol*. 1998 Dec 7;402(1):10-31.

- Nassif C, Noveen A, Hartenstein V.** Early development of the *Drosophila* brain: III. The pattern of neuropile founder tracts during the larval period. *J Comp Neurol.* 2003 Jan 20;455(4):417-34.
- Nederbragt AJ, te Welscher P, van den Driesche S, van Loon AE, Dictus WJ.** Novel and conserved roles for *orthodenticle/otx* and *orthopedia/otp* orthologs in the gastropod mollusc *Patella vulgata*. *Dev Genes Evol.* 2002 Aug;212(7):330-7.
- Neuser K, Triphan T, Mronz M, Poeck B, Strauss R.** Analysis of a spatial orientation memory in *Drosophila*. *Nature.* 2008 Jun 26;453(7199):1244-7.
- Noyes BE, Katz FN, Schaffer MH.** Identification and expression of the *Drosophila* adipokinetic hormone gene. *Mol Cell Endocrinol.* 1995 Apr 1;109(2):133-41.
- O'Brien J, Hayder H, Zayed Y, Peng C.** Overview of microRNA biogenesis, mechanisms of actions, and circulation. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2018 Aug 3;9:402.
- Ofstad TA, Zuker CS, Reiser MB.** Visual place learning in *Drosophila melanogaster*. *Nature.* 2011 Jun 8;474(7350):204-7.
- Oh H, Irvine KD.** Cooperative regulation of growth by Yorkie and Mad through *bantam*. *Dev Cell.* 2011 Jan 18;20(1):109-22.
- Oh Y, Lai JS, Mills HJ, Erdjument-Bromage H, Giammarinaro B, Saadipour K, Wang JG, Abu F, Neubert TA, Suh GSB.** A glucose-sensing neuron pair regulates insulin and glucagon in *Drosophila*. *Nature.* 2019 Oct;574(7779):559-564.
- Omoto JJ, Keleş MF, Nguyen BM, Bolanos C, Lovick JK, Frye MA, Hartenstein V.** Visual input to the *Drosophila* central complex by developmentally and functionally distinct neuronal populations. *Curr Biol.* 2017 Apr 24;27(8):1098-1110.
- Omoto JJ, Nguyen BM, Kandimalla P, Lovick JK, Donlea JM, Hartenstein V.** Neuronal constituents and putative interactions within the *Drosophila* ellipsoid body neuropil. *Front Neural Circuits.* 2018 Nov 27;12:103.
- Ørom UA, Nielsen FC, Lund AH.** MicroRNA-10a binds the 5'UTR of ribosomal protein mRNAs and enhances their translation. *Mol Cell.* 2008 May 23;30(4):460-71.
- O'Shea M, Rayne RC.** Adipokinetic hormones: cell and molecular biology. *Experientia.* 1992 May 15;48(5):430-8.
- Osterwalder M, Barozzi I, Tissières V, Fukuda-Yuzawa Y, Mannion BJ, Afzal SY, Lee EA, Zhu Y, Plajzer-Frick I, Pickle CS, Kato M, Garvin TH, Pham QT, Harrington AN, Akiyama JA, Afzal V, Lopez-Rios J, Dickel DE, Visel A, Pennacchio LA.** Enhancer redundancy provides phenotypic robustness in mammalian development. *Nature.* 2018 Feb 8;554(7691):239-243.
- Otting G, Qian YQ, Billeter M, Müller M, Affolter M, Gehring WJ, Wüthrich K.** Protein-DNA contacts in the structure of a homeodomain-DNA complex determined by nuclear magnetic resonance spectroscopy in solution. *EMBO J.* 1990 Oct;9(10):3085-92.
- Oudejans RC, Harthoorn LF, Diederens JH, van der Horst DJ.** Adipokinetic hormones. Coupling between biosynthesis and release. *Ann N Y Acad Sci.* 1999;897:291-9.

- Özkan E**, Carrillo RA, Eastman CL, Weiszmann R, Waghray D, Johnson KG, Zinn K, Celniker SE, Garcia KC. An extracellular interactome of immunoglobulin and LRR proteins reveals receptor-ligand networks. *Cell*. 2013 Jul 3;154(1):228-39.
- Palatnik JF**, Allen E, Wu X, Schommer C, Schwab R, Carrington JC, Weigel D. Control of leaf morphogenesis by microRNAs. *Nature*. 2003 Sep 18;425(6955):257-63.
- Park J**, Zhu Y, Tao X, Brazill JM, Li C, Wuchty S, Zhai RG. MicroRNA miR-1002 enhances NMNAT-mediated stress response by modulating alternative splicing. *iScience*. 2019 Sep 27;19:1048-1064.
- Park W**, Li J, Song R, Messing J, Chen X. CARPEL FACTORY, a Dicer homolog, and HEN1, a novel protein, act in microRNA metabolism in *Arabidopsis thaliana*. *Curr Biol*. 2002 Sep 3;12(17):1484-95.
- Parrish JZ**, Xu P, Kim CC, Jan LY, Jan YN. The microRNA *bantam* functions in epithelial cells to regulate scaling growth of dendrite arbors in *Drosophila* sensory neurons. *Neuron*. 2009 Sep 24;63(6):788-802.
- Pecot MY**, Chen Y, Akin O, Chen Z, Tsui CY, Zipursky SL. Sequential axon-derived signals couple target survival and layer specificity in the *Drosophila* visual system. *Neuron*. 2014 Apr 16;82(2):320-33.
- Pellizzari L**, Tell G, Fabbro D, Pucillo C, Damante G. Functional interference between contacting amino acids of homeodomains. *FEBS Lett*. 1997 May 5;407(3):320-4.
- Peng HW**, Slattery M, Mann RS. Transcription factor choice in the Hippo signaling pathway: homothorax and yorkie regulation of the microRNA *bantam* in the progenitor domain of the *Drosophila* eye imaginal disc. *Genes Dev*. 2009 Oct 1;23(19):2307-19.
- Peng J**, Santiago IJ, Ahn C, Gur B, Tsui CK, Su Z, Xu C, Karakhanyan A, Silies M, Pecot MY. *Drosophila* Fezf coordinates laminar-specific connectivity through cell-intrinsic and cell-extrinsic mechanisms. *Elife*. 2018 Mar 7;7:e33962.
- Percival-Smith A**, Müller M, Affolter M, Gehring WJ. The interaction with DNA of wild-type and mutant *fushi tarazu* homeodomains. *EMBO J*. 1990 Dec;9(12):3967-74. Erratum in: *EMBO J* 1992 Jan;11(1):382.
- Pereanu W**, Hartenstein V. Neural lineages of the *Drosophila* brain: a three-dimensional digital atlas of the pattern of lineage location and projection at the late larval stage. *J Neurosci*. 2006 May 17;26(20):5534-53.
- Pereanu W**, Kumar A, Jennett A, Reichert H, Hartenstein V. Development-based compartmentalization of the *Drosophila* central brain. *J Comp Neurol*. 2010 Aug 1;518(15):2996-3023.
- Perkins LA**, Holderbaum L, Tao R, Hu Y, Sopko R, McCall K, Yang-Zhou D, Flockhart I, Binari R, Shim HS, Miller A, Housden A, Foos M, Randkelv S, Kelley C, Namgyal P, Villalta C, Liu LP, Jiang X, Huan-Huan Q, Wang X, Fujiyama A, Toyoda A, Ayers K, Blum A, Czech B, Neumuller R, Yan D, Cavallaro A, Hibbard K, Hall D, Cooley L, Hannon GJ, Lehmann R, Parks A, Mohr SE, Ueda R, Kondo S, Ni JQ, Perrimon N. The Transgenic RNAi Project at Harvard Medical School: Resources and Validation. *Genetics*. 2015 Nov;201(3):843-52.
- Perry MW**, Boettiger AN, Bothma JP, Levine M. Shadow enhancers foster robustness of *Drosophila* gastrulation. *Curr Biol*. 2010 Sep 14;20(17):1562-7.

- Perry** MW, Bothma JP, Luu RD, Levine M. Precision of hunchback expression in the *Drosophila* embryo. *Curr Biol*. 2012 Dec 4;22(23):2247-52.
- Pfeiffer** BD, Jenett A, Hammonds AS, Ngo TT, 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. Tools for neuroanatomy and neurogenetics in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Jul 15;105(28):9715-20.
- Pipa** RL. Locations and central projections of neurons associated with the retrocerebral neuroendocrine complex of the cockroach *Periplaneta americana* (L.). *Cell Tissue Res*. 1978 Oct 30;193(3):443-55.
- Plotsky** PM, **Vale** W. Patterns of growth hormone-releasing factor and somatostatin secretion into the hypophysial-portal circulation of the rat. *Science*. 1985 Oct 25;230(4724):461-3.
- Poernbacher** I, Crossman S, Kurth J, Nojima H, Baena-Lopez A, Alexandre C, Vincent JP. Lessons in genome engineering: opportunities, tools and pitfalls. *bioRxiv* 710871, 2019 Jul 22.
- Ponton** F, Chapuis MP, Pernice M, Sword GA, Simpson SJ. Evaluation of potential reference genes for reverse transcription-qPCR studies of physiological responses in *Drosophila melanogaster*. *J Insect Physiol*. 2011 Jun;57(6):840-50.
- Prokop** A, **Technau** GM. The origin of postembryonic neuroblasts in the ventral nerve cord of *Drosophila melanogaster*. *Development*. 1991 Jan;111(1):79-88.
- Propper** CR, Jones RE, Lopez KH. Distribution of arginine vasotocin in the brain of the lizard *Anolis carolinensis*. *Cell Tissue Res*. 1992 Feb;267(2):391-8.
- Puelles** L, **Rubenstein** JL. Forebrain gene expression domains and the evolving prosomeric model. *Trends Neurosci*. 2003 Sep;26(9):469-76.
- Puelles** L, Martinez S, Martínez de la Torre M, Rubenstein JL. Gene maps and related histogenetic domains in the forebrain and midbrain. In *The Rat Nervous System*, 3rd Edn., ed. G. Paxinos (San Diego: Elsevier), 2004;3-25.
- Puelles** L, Martínez de la Torre M, Bardet S, Rubenstein JL. Hypothalamus. In *The Mouse Nervous System*, eds Watson C, Paxinos G, Puelles L (London: Academic press. Elsevier), 2012;221-313.
- Python** F, Stocker RF. Adult-like complexity of the larval antennal lobe of *D. melanogaster* despite markedly low numbers of odorant receptor neurons. *J Comp Neurol*. 2002 Apr 15;445(4):374-87.
- Ramaekers** A, Magnenat E, Marin EC, Gendre N, Jefferis GS, Luo L, Stocker RF. Glomerular maps without cellular redundancy at successive levels of the *Drosophila* larval olfactory circuit. *Curr Biol*. 2005 Jun 7;15(11):982-92.
- Rausch** H, **Lehmann** M. Structural analysis of the actinophage phi C31 attachment site. *Nucleic Acids Res*. 1991 Oct 11;19(19):5187-9.
- Reiher** W, Shirras C, Kahnt J, Baumeister S, Isaac RE, Wegener C. Peptidomics and peptide hormone processing in the *Drosophila* midgut. *J Proteome Res*. 2011 Apr 1;10(4):1881-92.



**Reinhart** BJ, Slack FJ, Basson M, Pasquinelli AE, Bettinger JC, Rougvie AE, Horvitz HR, Ruvkun G. The 21-nucleotide *let-7* RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 2000 Feb 24;403(6772):901-6.

**Reiter** LT, Potocki L, Chien S, Gribskov M, Bier E. A systematic analysis of human disease-associated gene sequences in *Drosophila melanogaster*. *Genome Res*. 2001 Jun;11(6):1114-25.

**Ren** Q, Awasaki T, Huang YF, Liu Z, Lee T. Cell class-lineage analysis reveals sexually dimorphic lineage compositions in the *Drosophila* brain. *Curr Biol*. 2016 Oct 10;26(19):2583-2593.

**Renn** SC, Armstrong JD, Yang M, Wang Z, An X, Kaiser K, Taghert PH. Genetic analysis of the *Drosophila* ellipsoid body neuropil: organization and development of the central complex. *J Neurobiol*. 1999 Nov 5;41(2):189-207.

**Rhoades** MW, Reinhart BJ, Lim LP, Burge CB, Bartel B, Bartel DP. Prediction of plant microRNA targets. *Cell*. 2002 Aug 23;110(4):513-20.

**Rödel** CJ, Gilles AF, Averof M. MicroRNAs act as cofactors in *bicoid*-mediated translational repression. *Curr Biol*. 2013 Aug 19;23(16):1579-84.

**Rubin** GM, **Spradling** AC. Genetic transformation of *Drosophila* with transposable element vectors. *Science*. 1982 Oct 22;218(4570):348-53.

**Rubio** M, de Horna A, Belles X. MicroRNAs in metamorphic and non-metamorphic transitions in hemimetabolous insect metamorphosis. *BMC Genomics*. 2012 Aug 10;13:386.

**Ruby** JG, Stark A, Johnston WK, Kellis M, Bartel DP, Lai EC. Evolution, biogenesis, expression, and target predictions of a substantially expanded set of *Drosophila* microRNAs. *Genome Res*. 2007 Dec;17(12):1850-64.

**Rulifson** EJ, Kim SK, Nusse R. Ablation of insulin-producing neurons in flies: growth and diabetic phenotypes. *Science*. 2002 May 10;296(5570):1118-20.

**Sakai** T, **Kitamoto** T. Differential roles of two major brain structures, mushroom bodies and central complex, for *Drosophila* male courtship behavior. *J Neurobiol*. 2006 Jul;66(8):821-34.

**Sambrook** J, **Russell** DW (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

**Santiago** IJ, Zhang D, Saras A, Pontillo N, Xu C, Chen X, Weirauch MT, Mistry M, Ginty DD, Pecot MY, Peng J. *Drosophila* Fezf functions as a transcriptional repressor to direct layer-specific synaptic connectivity in the fly visual system. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2021 Mar 30;118(13):e2025530118.

**Sanz** DJ, Hollywood JA, Scallan MF, Harrison PT. Cas9/gRNA targeted excision of cystic fibrosis-causing deep-intronic splicing mutations restores normal splicing of CFTR mRNA. *PLoS One*. 2017 Sep 1;12(9):e0184009.

**Saper** CB, **Lowell** BB. The hypothalamus. *Curr Biol*. 2014 Dec 1;24(23):R1111-6.

**Sawamoto** K, Yamamoto A, Kawaguchi A, Yamaguchi M, Mori K, Goldman SA, Okano H. Direct isolation of committed neuronal progenitor cells from transgenic mice coexpressing spectrally distinct fluorescent proteins regulated by stage-specific neural promoters. *J Neurosci Res*. 2001 Aug 1;65(3):220-7.

- Schertel** C, Rutishauser T, Förstemann K, Basler K. Functional characterization of *Drosophila* microRNAs by a novel *in vivo* library. *Genetics*. 2012 Dec;192(4):1543-52.
- Schlegel** P, Texada MJ, Miroschnikow A, Schoofs A, Hückesfeld S, Peters M, Schneider-Mizell CM, Lacin H, Li F, Fetter RD, Truman JW, Cardona A, Pankratz MJ. Synaptic transmission parallels neuromodulation in a central food-intake circuit. *Elife*. 2016 Nov 15;5:e16799.
- Schmidt** H, Rickert C, Bossing T, Vef O, Urban J, Technau GM. The embryonic central nervous system lineages of *Drosophila melanogaster*. II. Neuroblast lineages derived from the dorsal part of the neuroectoderm. *Dev Biol*. 1997 Sep 15;189(2):186-204.
- Schmucker** D, Clemens JC, Shu H, Worby CA, Xiao J, Muda M, Dixon JE, Zipursky SL. *Drosophila* Dscam is an axon guidance receptor exhibiting extraordinary molecular diversity. *Cell*. 2000 Jun 9;101(6):671-84.
- Schneitz** K, Spielmann P, Noll M. 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*. 1993 May;7(5):911.
- Schoofs** L, De Loof A, Van Hiel MB. Neuropeptides as regulators of behavior in insects. *Annu Rev Entomol*. 2017 Jan 31;62:35-52.
- Selbach** M, Schwanhäusser B, Thierfelder N, Fang Z, Khanin R, Rajewsky N. Widespread changes in protein synthesis induced by microRNAs. *Nature*. 2008 Sep 4;455(7209):58-63.
- Sharan** SK, Thomason LC, Kuznetsov SG, Court DL. Recombineering: a homologous recombination-based method of genetic engineering. *Nat Protoc*. 2009;4(2):206-23.
- Shimogori** T, Lee DA, Miranda-Angulo A, *et al*. A genomic atlas of mouse hypothalamic development. *Nat Neurosci*. 2010;13(6):767-775.
- Shu** X, Hildebrandt MA, Gu J, Tannir NM, Matin SF, Karam JA, Wood CG, Wu X. MicroRNA profiling in clear cell renal cell carcinoma tissues potentially links tumorigenesis and recurrence with obesity. *Br J Cancer*. 2017 Jan 3;116(1):77-84.
- Siegmund** T, **Korge** G. Innervation of the ring gland of *Drosophila melanogaster*. *J Comp Neurol*. 2001 Mar 19;431(4):481-91.
- Siegrist** SE, Haque NS, Chen CH, Hay BA, Hariharan IK. Inactivation of both Foxo and reaper promotes long-term adult neurogenesis in *Drosophila*. *Curr Biol*. 2010 Apr 13;20(7):643-8.
- Siga** S. Anatomy and functions of brain neurosecretory cells in diptera. *Microsc Res Tech*. 2003 Oct 1;62(2):114-31.
- Simeone** A, D'Apice MR, Nigro V, Casanova J, Graziani F, Acampora D, Avantsaggiato V. *Orthopedia*, a novel homeobox-containing gene expressed in the developing CNS of both mouse and *Drosophila*. *Neuron*. 1994 Jul;13(1):83-101.
- Singson** A, Leviten MW, Bang AG, Hua XH, Posakony JW. Direct downstream targets of proneural activators in the imaginal disc include genes involved in lateral inhibitory signaling. *Genes Dev*. 1994 Sep 1;8(17):2058-71.

- Skeath JB, Carroll SB.** Regulation of *achaete-scute* gene expression and sensory organ pattern formation in the *Drosophila* wing. *Genes Dev.* 1991 Jun;5(6):984-95.
- Skeath JB, Carroll SB.** Regulation of proneural gene expression and cell fate during neuroblast segregation in the *Drosophila* embryo. *Development.* 1992 Apr;114(4):939-46.
- Slack FJ, Basson M, Liu Z, Ambros V, Horvitz HR, Ruvkun G.** The *lin-41* RBCC gene acts in the *C. elegans* heterochronic pathway between the *let-7* regulatory RNA and the LIN-29 transcription factor. *Mol Cell.* 2000 Apr;5(4):659-69.
- Smeets WJ, Sevensma JJ, Jonker AJ.** Comparative analysis of vasotocin-like immunoreactivity in the brain of the turtle *Pseudemys scripta elegans* and the snake *Python regius*. *Brain Behav Evol.* 1990;35(2):65-84.
- Sokol NS, Ambros V.** Mesodermally expressed *Drosophila* microRNA-1 is regulated by Twist and is required in muscles during larval growth. *Genes Dev.* 2005 Oct 1;19(19):2343-54.
- Sousa-Nunes R, Cheng LY, Gould AP.** Regulating neural proliferation in the *Drosophila* CNS. *Curr Opin Neurobiol.* 2010 Feb;20(1):50-7.
- Spindler SR, Hartenstein V.** The *Drosophila* neural lineages: a model system to study brain development and circuitry. *Dev Genes Evol.* 2010 Jun;220(1-2):1-10.
- Stay B, Fairbairn S, Yu CG.** Role of allatostatins in the regulation of juvenile hormone synthesis. *Arch Insect Biochem Physiol.* 1996;32(3-4):287-97.
- Stay B.** A review of the role of neurosecretion in the control of juvenile hormone synthesis: a tribute to Berta Scharrer. *Insect Biochem Mol Biol.* 2000 Aug-Sep;30(8-9):653-62.
- Stockler RF.** The organization of the chemosensory system in *Drosophila melanogaster*: a review. *Cell Tissue Res.* 1994 Jan;275(1):3-26.
- Strausfeld NJ, Hildebrand JG.** Olfactory systems: common design, uncommon origins? *Curr Opin Neurobiol.* 1999 Oct;9(5):634-9.
- Strauss R, Heisenberg M.** A higher control center of locomotor behavior in the *Drosophila* brain. *J Neurosci.* 1993 May;13(5):1852-61.
- Suh MR, Lee Y, Kim JY, Kim SK, Moon SH, Lee JY, Cha KY, Chung HM, Yoon HS, Moon SY, Kim VN, Kim KS.** Human embryonic stem cells express a unique set of microRNAs. *Dev Biol.* 2004 Jun 15;270(2):488-98.
- Suh YS, Bhat S, Hong SH, Shin M, Bahk S, Cho KS, Kim SW, Lee KS, Kim YJ, Jones WD, Yu K.** Genome-wide microRNA screening reveals that the evolutionary conserved miR-9a regulates body growth by targeting sNPF1/NPYR. *Nat Commun.* 2015 Jul 3;6:7693.
- Suzuki T, Kaido M, Takayama R, Sato M.** A temporal mechanism that produces neuronal diversity in the *Drosophila* visual center. *Dev Biol.* 2013 Aug 1;380(1):12-24.
- Swanson LW, Sawchenko PE.** Hypothalamic integration: organization of the paraventricular and supraoptic nuclei. *Annu Rev Neurosci.* 1983;6:269-324.

**Swarts** DR, Henfling ME, Van Neste L, van Suylen RJ, Dingemans AM, Dinjens WN, Haesevoets A, Rudelius M, Thunnissen E, Volante M, Van Criekinge W, van Engeland M, Ramaekers FC, Speel EJ. CD44 and OTP are strong prognostic markers for pulmonary carcinoids. *Clin Cancer Res*. 2013a Apr 15;19(8):2197-207.

**Swarts** DR, Van Neste L, Henfling ME, Eijkenboom I, Eijk PP, van Velthuysen ML, Vink A, Volante M, Ylstra B, Van Criekinge W, van Engeland M, Ramaekers FC, Speel EJ. An exploration of pathways involved in lung carcinoid progression using gene expression profiling. *Carcinogenesis*. 2013b Dec;34(12):2726-37.

**Takemura** SY, Bharioke A, Lu Z, Nern A, Vitaladevuni S, Rivlin PK, Katz WT, Olbris DJ, Plaza SM, Winston P, Zhao T, Horne JA, Fetter RD, Takemura S, Blazek K, Chang LA, Ogundeyi O, Saunders MA, Shapiro V, Sigmund C, Rubin GM, Scheffer LK, Meinertzhagen IA, Chklovskii DB. A visual motion detection circuit suggested by *Drosophila* connectomics. *Nature*. 2013 Aug 8;500(7461):175-81.

**Takemura** SY, Xu CS, Lu Z, Rivlin PK, Parag T, Olbris DJ, Plaza S, Zhao T, Katz WT, Umayam L, Weaver C, Hess HF, Horne JA, Nunez-Iglesias J, Aniceto R, Chang LA, Lauchie S, Nasca A, Ogundeyi O, Sigmund C, Takemura S, Tran J, Langille C, Le Lacheur K, McLin S, Shinomiya A, Chklovskii DB, Meinertzhagen IA, Scheffer LK. Synaptic circuits and their variations within different columns in the visual system of *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015 Nov 3;112(44):13711-6.

**Tan** L, Zhang KX, Pecot MY, Nagarkar-Jaiswal S, Lee PT, Takemura SY, McEwen JM, Nern A, Xu S, Tadros W, Chen Z, Zinn K, Bellen HJ, Morey M, Zipursky SL. Ig superfamily ligand and receptor pairs expressed in synaptic partners in *Drosophila*. *Cell*. 2015 Dec 17;163(7):1756-69.

**Tanaka** NK, Awasaki T, Shimada T, Ito K. Integration of chemosensory pathways in the *Drosophila* second-order olfactory centers. *Curr Biol*. 2004 Mar 23;14(6):449-57.

**Tang** G, Reinhart BJ, Bartel DP, Zamore PD. A biochemical framework for RNA silencing in plants. *Genes Dev*. 2003 Jan 1;17(1):49-63.

**Tattikota** SG, Rathjen T, Hausser J, Khedkar A, Kabra UD, Pandey V, Sury M, Wessels HH, Mollet IG, Eliasson L, Selbach M, Zinzen RP, Zavolan M, Kadener S, Tschöp MH, Jastroch M, Friedländer MR, Poy MN. miR-184 regulates pancreatic  $\beta$ -cell function according to glucose metabolism. *J Biol Chem*. 2015 Aug 14;290(33):20284-94.

**Taylor** T, Wondisford FE, Blaine T, Weintraub BD. The paraventricular nucleus of the hypothalamus has a major role in thyroid hormone feedback regulation of thyrotropin synthesis and secretion. *Endocrinology*. 1990 Jan;126(1):317-24.

**Technau** GM, Berger C, Urbach R. Generation of cell diversity and segmental pattern in the embryonic central nervous system of *Drosophila*. *Dev Dyn*. 2006 Apr;235(4):861-9.

**Teleman** AA, Maitra S, Cohen SM. *Drosophila* lacking microRNA miR-278 are defective in energy homeostasis. *Genes Dev*. 2006 Feb 15;20(4):417-22.

**Terhzaz** S, Rosay P, Goodwin SF, Veenstra JA. The neuropeptide SIFamide modulates sexual behavior in *Drosophila*. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007 Jan 12;352(2):305-10.

**Tessmar-Raible** K, Raible F, Christodoulou F, Guy K, Rembold M, Hausen H, Arendt D. Conserved sensory-neurosecretory cell types in annelid and fish forebrain: insights into hypothalamus evolution. *Cell*. 2007 Jun 29;129(7):1389-400.

- Therianos S, Leuzinger S, Hirth F, Goodman CS, Reichert H.** Embryonic development of the *Drosophila* brain: formation of commissural and descending pathways. *Development*. 1995 Nov;121(11):3849-60.
- Thompson BJ, Cohen SM.** The Hippo pathway regulates the *bantam* microRNA to control cell proliferation and apoptosis in *Drosophila*. *Cell*. 2006 Aug 25;126(4):767-74.
- Thorndyke MC, Georges D.** Functional aspects of peptide neurohormones in protochordates. In *Neurohormones in Invertebrates*. Eds MC Thorndyke & GJ Goldsworthy. Cambridge: Cambridge University Press. 1988.
- Thorpe HM, Smith MC.** *In vitro* site-specific integration of bacteriophage DNA catalyzed by a recombinase of the resolvase/invertase family. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 May 12;95(10):5505-10.
- Thurmond J, Goodman JL, Strelets VB, Attrill H, Gramates LS, Marygold SJ, Matthews BB, Millburn G, Antonazzo G, Trovisco V, Kaufman TC, Calvi BR; FlyBase Consortium.** FlyBase 2.0: the next generation. *Nucleic Acids Res*. 2019 Jan 8;47(D1):D759-D765.
- Timofeev K, Joly W, Hadjieconomou D, Salecker I.** Localized netrins act as positional cues to control layer-specific targeting of photoreceptor axons in *Drosophila*. *Neuron*. 2012 Jul 12;75(1):80-93.
- Towler BP, Jones CI, Viegas SC, Apura P, Waldron JA, Smalley SK, Arraiano CM, Newbury SF.** The 3'-5' exoribonuclease Dis3 regulates the expression of specific microRNAs in *Drosophila* wing imaginal discs. *RNA Biol*. 2015;12(7):728-41.
- Trapnell C.** Defining cell types and states with single-cell genomics. *Genome Res*. 2015 Oct;25(10):1491-8.
- Treisman J, Gönczy P, Vashishtha M, Harris E, Desplan C.** A single amino acid can determine the DNA binding specificity of homeodomain proteins. *Cell*. 1989 Nov 3;59(3):553-62.
- Triphan T, Poeck B, Neuser K, Strauss R.** Visual targeting of motor actions in climbing *Drosophila*. *Curr Biol*. 2010 Apr 13;20(7):663-8.
- Truman JW, Schuppe H, Shepherd D, Williams DW.** Developmental architecture of adult-specific lineages in the ventral CNS of *Drosophila*. *Development*. 2004 Oct;131(20):5167-84.
- Turner GC, Bazhenov M, Laurent G.** Olfactory representations by *Drosophila* mushroom body neurons. *J Neurophysiol*. 2008 Feb;99(2):734-46.
- Umesono Y, Watanabe K, Agata K.** A planarian *orthopedia* homolog is specifically expressed in the branch region of both the mature and regenerating brain. *Dev Growth Differ*. 1997 Dec;39(6):723-7.
- Urbach R, Schnabel R, Technau GM.** The pattern of neuroblast formation, mitotic domains and proneural gene expression during early brain development in *Drosophila*. *Development*. 2003 Aug;130(16):3589-606.
- Urbach R, Technau GM.** Molecular markers for identified neuroblasts in the developing brain of *Drosophila*. *Development*. 2003 Aug;130(16):3621-37.

**Varadi M**, Anyango S, Deshpande M, Nair S, Natassia C, Yordanova G, Yuan D, Stroe O, Wood G, Laydon A, Židek A, Green T, Tunyasuvunakool K, Petersen S, Jumper J, Clancy E, Green R, Vora A, Lutfi M, Figurnov M, Cowie A, Hobbs N, Kohli P, Kleywegt G, Birney E, Hassabis D, Velankar S. AlphaFold Protein Structure Database: massively expanding the structural coverage of protein-sequence space with high-accuracy models. *Nucleic Acids Res.* 2022 Jan 7;50(D1):D439-D444.

**Varghese J**, Lim SF, Cohen SM. *Drosophila* miR-14 regulates insulin production and metabolism through its target, *sugarbabe*. *Genes Dev.* 2010 Dec 15;24(24):2748-53.

**Veelaert D**, Schoofs L, De Loof A. Peptidergic control of the *corpus cardiacum-corpora allata* complex of locusts. *Int Rev Cytol.* 1998;182:249-302.

**Viktorin G**, Riebli N, Popkova A, Giangrande A, Reichert H. Multipotent neural stem cells generate glial cells of the central complex through transit amplifying intermediate progenitors in *Drosophila* brain development. *Dev Biol.* 2011 Aug 15;356(2):553-65.

**Vosshall LB**, Amrein H, Morozov PS, Rzhetsky A, Axel R. A spatial map of olfactory receptor expression in the *Drosophila* antenna. *Cell.* 1999 Mar 5;96(5):725-36.

**Vosshall LB**. Olfaction in *Drosophila*. *Curr Opin Neurobiol.* 2000 Aug;10(4):498-503.

**Vosshall LB**, Wong AM, Axel R. An olfactory sensory map in the fly brain. *Cell.* 2000 Jul 21;102(2):147-59.

**Vullings HG**, Diederer JH, Veelaert D, Van der Horst DJ. Multifactorial control of the release of hormones from the locust retrocerebral complex. *Microsc Res Tech.* 1999 May 1;45(3):142-53.

**Walldorf U**, Kiewe A, Wickert M, Ronshaugen M, McGinnis W. *Homeobrain*, a novel paired-like homeobox gene is expressed in the *Drosophila* brain. *Mech Dev.* 2000 Aug;96(1):141-4.

**Wang ET**, Sandberg R, Luo S, Khrebtkova I, Zhang L, Mayr C, Kingsmore SF, Schroth GP, Burge CB. Alternative isoform regulation in human tissue transcriptomes. *Nature.* 2008 Nov 27;456(7221):470-6.

**Wang W**, Lufkin T. Otp maps to mouse chromosome 13. *Mamm Genome.* 1997 Jul;8(7):537-8.

**Wang W**, Lufkin T. The murine Otp homeobox gene plays an essential role in the specification of neuronal cell lineages in the developing hypothalamus. *Dev Biol.* 2000 Nov 15;227(2):432-49.

**Wang Z**, Singhvi A, Kong P, Scott K. Taste representations in the *Drosophila* brain. *Cell.* 2004 Jun 25;117(7):981-91.

**Weng M**, Golden KL, Lee CY. dFezf/Earmuff maintains the restricted developmental potential of intermediate neural progenitors in *Drosophila*. *Dev Cell.* 2010 Jan 19;18(1):126-35.

**Weng M**, Lee CY. Keeping neural progenitor cells on a short leash during *Drosophila* neurogenesis. *Curr Opin Neurobiol.* 2011 Feb;21(1):36-42.

**Weng R**, Cohen SM. Control of *Drosophila* Type I and Type II central brain neuroblast proliferation by *bantam* microRNA. *Development.* 2015 Nov 1;142(21):3713-20.

- Wightman B, Ha I, Ruvkun G.** Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell*. 1993 Dec 3;75(5):855-62.
- Wittling F.** Funktionelle Analyse von potentiellen Enhancern des *Drosophila* Gens *homeobrain* durch Gene-Targeting. Bachelorarbeit, Universität des Saarlandes. 2017.
- Wolf A, Ryu S.** Specification of posterior hypothalamic neurons requires coordinated activities of *Fezf2*, *Otp*, *Sim1a* and *Foxb1.2*. *Development*. 2013 Apr;140(8):1762-73.
- Wong DC, Lovick JK, Ngo KT, Borisuthirattana W, Omoto JJ, Hartenstein V.** Postembryonic lineages of the *Drosophila* brain: II. Identification of lineage projection patterns based on MARCM clones. *Dev Biol*. 2013 Dec 15;384(2):258-89.
- Wu L, Belasco JG.** Let me count the ways: mechanisms of gene regulation by miRNAs and siRNAs. *Mol Cell*. 2008 Jan 18;29(1):1-7.
- Yaksi E, Wilson RI.** Electrical coupling between olfactory glomeruli. *Neuron*. 2010 Sep 23;67(6):1034-47.
- Yang CP, Samuels TJ, Huang Y, Yang L, Ish-Horowitz D, Davis I, Lee T.** Imp and Syp RNA-binding proteins govern decommissioning of *Drosophila* neural stem cells. *Development*. 2017 Oct 1;144(19):3454-3464.
- Yasuyama K, Meinertzhagen IA, Schürmann FW.** Synaptic organization of the mushroom body calyx in *Drosophila melanogaster*. *J Comp Neurol*. 2002 Apr 8;445(3):211-26.
- Ylla G, Piulachs MD, Belles X.** Comparative analysis of miRNA expression during the development of insects of different metamorphosis modes and germ-band types. *BMC Genomics*. 2017 Oct 11;18(1):774.
- Yorozu S, Wong A, Fischer BJ, Dankert H, Kernan MJ, Kamikouchi A, Ito K, Anderson DJ.** Distinct sensory representations of wind and near-field sound in the *Drosophila* brain. *Nature*. 2009 Mar 12;458(7235):201-5.
- Younossi-Hartenstein A, Nassif C, Green P, Hartenstein V.** Early neurogenesis of the *Drosophila* brain. *J Comp Neurol*. 1996 Jul 1;370(3):313-29.
- Younossi-Hartenstein A, Nguyen B, Shy D, Hartenstein V.** Embryonic origin of the *Drosophila* brain neuropile. *J Comp Neurol*. 2006 Aug 20;497(6):981-98.
- Yu HH, Kao CF, He Y, Ding P, Kao JC, Lee T.** A complete developmental sequence of a *Drosophila* neuronal lineage as revealed by twin-spot MARCM. *PLoS Biol*. 2010 Aug 24;8(8):e1000461.
- Yu HH, Awasaki T, Schroeder MD, Long F, Yang JS, He Y, Ding P, Kao JC, Wu GY, Peng H, Myers G, Lee T.** Clonal development and organization of the adult *Drosophila* central brain. *Curr Biol*. 2013 Apr 22;23(8):633-43.
- Yu JY, Reynolds SH, Hatfield SD, Shcherbata HR, Fischer KA, Ward EJ, Long D, Ding Y, Ruohola-Baker H.** Dicer-1-dependent Dacapo suppression acts downstream of Insulin receptor in regulating cell division of *Drosophila* germline stem cells. *Development*. 2009 May;136(9):1497-507.

- Xiao Q**, Komori H, Lee CY. *klumpfuss* distinguishes stem cells from progenitor cells during asymmetric neuroblast division. *Development*. 2012 Aug;139(15):2670-80.
- Xie X**, Tabuchi M, Brown MP, Mitchell SP, Wu MN, Kolodkin AL. The laminar organization of the *Drosophila* ellipsoid body is semaphorin-dependent and prevents the formation of ectopic synaptic connections. *Elife*. 2017 Jun 20;6:e25328.
- Xing Y**, Su TT, Ruohola-Baker H. Tie-mediated signal from apoptotic cells protects stem cells in *Drosophila melanogaster*. *Nat Commun*. 2015 May 11;6:7058.
- Yang CP**, Fu CC, Sugino K, Liu Z, Ren Q, Liu LY, Yao X, Lee LP, Lee T. Transcriptomes of lineage-specific *Drosophila* neuroblasts profiled by genetic targeting and robotic sorting. *Development*. 2016 Feb 1;143(3):411-21.
- Zacharioudaki E**, Magadi SS, Delidakis C. bHLH-O proteins are crucial for *Drosophila* neuroblast self-renewal and mediate Notch-induced overproliferation. *Development*. 2012 Apr;139(7):1258-69.
- Zandawala M**, Yurgel ME, Texada MJ, Liao S, Rewitz KF, Keene AC, Nässel DR. Modulation of *Drosophila* post-feeding physiology and behavior by the neuropeptide leucokinin. *PLoS Genet*. 2018 Nov 20;14(11):e1007767.
- Zhang B**, Liu XX, He JR, Zhou CX, Guo M, He M, Li MF, Chen GQ, Zhao Q. Pathologically decreased miR-26a antagonizes apoptosis and facilitates carcinogenesis by targeting MTDH and EZH2 in breast cancer. *Carcinogenesis*. 2011 Jan;32(1):2-9.
- Zhang H**, Kolb FA, Brondani V, Billy E, Filipowicz W. Human Dicer preferentially cleaves dsRNAs at their termini without a requirement for ATP. *EMBO J*. 2002 Nov 1;21(21):5875-85.
- Zhang H**, Kolb FA, Jaskiewicz L, Westhof E, Filipowicz W. Single processing center models for human Dicer and bacterial RNase III. *Cell*. 2004 Jul 9;118(1):57-68.
- Zhang S**, **Bernstein** SI. Spatially and temporally regulated expression of myosin heavy chain alternative exons during *Drosophila* embryogenesis. *Mech Dev*. 2001 Mar;101(1-2):35-45.
- Zheng X**, Zugates CT, Lu Z, Shi L, Bai JM, Lee T. Baboon/dSmad2 TGF-beta signaling is required during late larval stage for development of adult-specific neurons. *EMBO J*. 2006 Feb 8;25(3):615-27.
- Zhou L**, Lim MYT, Kaur P, Saj A, Bortolamiol-Becet D, Gopal V, Tolwinski N, Tucker-Kellogg G, Okamura K. Importance of miRNA stability and alternative primary miRNA isoforms in gene regulation during *Drosophila* development. *Elife*. 2018 Jul 19;7:e38389.
- Zhu Z**, Fang Z, Hu X, Zhou S. MicroRNAs and mesenchymal stem cells: hope for pulmonary hypertension. *Rev Bras Cir Cardiovasc*. 2015 Jul-Sep;30(3):380-5.



## 6.2 Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 2.1:</b> Allgemeiner Mechanismus des UAS/Gal4-Systems zur ektopischen Expression eines Zielgens in <i>Drosophila melanogaster</i> . .....	5
<b>Abbildung 2.2:</b> Mechanismus der PhiC31-vermittelten Transformation. ....	6
<b>Abbildung 2.3:</b> Der zur P-Element-vermittelten Keimbahntransformation zu verwendende Targetingvektor pTV[cherry] (Baena-Lopez <i>et al.</i> , 2013). ....	7
<b>Abbildung 2.4:</b> Aufbau des embryonalen Nervensystems von <i>Drosophila melanogaster</i> . ....	9
<b>Abbildung 2.5:</b> Aufbau des larvalen Gehirns von <i>Drosophila melanogaster</i> . ....	10
<b>Abbildung 2.6:</b> Grafische Darstellung des Teilungsschemas von Typ I und Typ II Neuroblasten sowie Typ I und Typ II Lineages. ....	11
<b>Abbildung 2.7:</b> Aufbau des adulten <i>Drosophila</i> -Gehirns in anteriorer Ansicht. ....	14
<b>Abbildung 2.8:</b> Übersicht über das Homeoboxgen <i>orthopedia (otp)</i> in <i>Drosophila melanogaster</i> . ....	18
<b>Abbildung 2.9:</b> Mechanismus der Feinregulation der Genexpression durch microRNAs. ....	20
<b>Abbildung 2.10:</b> Untersuchung der Interaktion von miR-252 mit der 3'UTR von <i>otp</i> durch kontrollierte Fehlexpression der miRNA mithilfe des UAS/Gal4-Systems in Kombination mit einem ubiquitär exprimierten Sensorbaustein mit GFP und der <i>otp</i> 3'UTR. ....	22
<b>Abbildung 2.11:</b> Lokalisation der Gene <i>orthopedia (otp)</i> , <i>Drosophila Retinal Homeobox (DRx)</i> und <i>homeobrain (hbn)</i> in der 57B-Region auf dem rechten Arm des zweiten Chromosoms von <i>Drosophila</i> (A) sowie <i>earmuff (erm)</i> in der 22B6-8-Region auf dem linken Arm des zweiten Chromosoms von <i>Drosophila</i> (B). ....	23
<b>Abbildung 4.1:</b> Untersuchung der wildtypischen Otp-Expression im embryonalen Gehirn, in der larvalen Gehirnhemisphäre und im adulten Gehirn von <i>Drosophila melanogaster</i> mittels Immunfluoreszenzfärbung. ....	67
<b>Abbildung 4.2:</b> Sequenzierungsergebnis des EMS-induzierten Mutationsstammes <i>otp</i> <sup>1024</sup> . ....	69
<b>Abbildung 4.3:</b> Phänotypische und molekulare Analyse verschiedener <i>otp</i> -Mutantenstämme mittels Immunfluoreszenzfärbung und Sequenzierung. ....	70
<b>Abbildung 4.4:</b> Überprüfung der Klonierung und Proteinexpression zur Herstellung des <i>otp</i> -RE-spezifischen Antikörpers Otp-PE. ....	73
<b>Abbildung 4.5:</b> Untersuchung des Transkripts <i>otp</i> -RE und des Proteins Otp-PE im <i>Drosophila</i> -Embryo mittels <i>in situ</i> Hybridisierung und Immunfluoreszenzfärbung. ....	75
<b>Abbildung 4.6:</b> Untersuchung der Expression der beiden <i>otp</i> -Transkriptvarianten <i>otp</i> -RC und <i>otp</i> -RE durch transkriptspezifische RT-qPCR. ....	77
<b>Abbildung 4.7:</b> Lokalisation der Deletionsregion des <i>Genetargeting</i> -Stammes <i>otp</i> <sup>REGT</sup> sowie des Gal4-Konstrukts nach der anschließenden Reintegration von Gal4 in <i>otp</i> <sup>REGT</sup> . ....	78
<b>Abbildung 4.8:</b> Untersuchung der Otp-Expression im embryonalen, larvalen und adulten <i>Drosophila</i> -Gehirn des <i>Genetargeting</i> -Stammes <i>otp</i> <sup>REGT</sup> . ....	79
<b>Abbildung 4.9:</b> Untersuchung der Expression der <i>otp</i> -Transkriptvariante <i>otp</i> -RE in Embryonen von <i>Drosophila melanogaster</i> (Stadium 14) mithilfe des Treiberstammes <i>otp</i> <sup>REGal4</sup> . ....	81
<b>Abbildung 4.10:</b> Untersuchung der Reportergenexpression von H2B-mRFP1 bzw. mCD8-GFP im Expressionsmuster der <i>otp</i> -Transkriptvariante <i>otp</i> -RE in larvalen Geweben von <i>Drosophila melanogaster</i> mithilfe des Treiberstammes <i>otp</i> <sup>REGal4</sup> . ....	82
<b>Abbildung 4.11:</b> Untersuchung der Reportergenexpression von mCD8-GFP bzw. H2B-mRFP1 im <i>otp</i> -RE-Expressionsmuster in adulten <i>Drosophila</i> -Geweben mithilfe des Treiberstammes <i>otp</i> <sup>REGal4</sup> . ....	84

<b>Abbildung 4.12:</b> <i>Otp</i> -Sensorstrukture und Kreuzungsschemata zur Untersuchung der Fehlexpression von <i>otp</i> -Sensor und UAS-miR-252 mithilfe der Treiberstämme <i>engrailed (en)</i> -Gal4 und <i>deadpan (dnp)</i> -Gal4.....	<b>87</b>
<b>Abbildung 4.13:</b> Untersuchung der Fehlexpression der <i>otp</i> -Sensorstrukture (wildtypisch bzw. mit Mutation oder Deletion innerhalb der <i>otp</i> 3'UTR) zusammen mit UAS-miR-252 mithilfe der Treiberstämme <i>engrailed (en)</i> -Gal4 (A–E) und <i>deadpan (dnp)</i> -Gal4 (F–J) in larvalen Geweben durch Konfokalmikroskopie und qPCR. ....	<b>89</b>
<b>Abbildung 4.14:</b> <i>Otp</i> -Immunfluoreszenzfärbung an <i>Drosophila</i> -Embryonen sowie larvalen und adulten <i>Drosophila</i> -Gehirnen des Wildtyps (WT) (A–F) und des Stammes miR-252 <i>Knockout</i> (KO) (A'–F')......	<b>91</b>
<b>Abbildung 4.15:</b> Untersuchung des neu hergestellten Treiberstammes DRx <sup>Gal4</sup> mithilfe von H2B-mRFP1- bzw. mCD8-GFP-Reporterexpressionen.....	<b>94</b>
<b>Abbildung 4.16:</b> Untersuchung des neu hergestellten Treiberstammes hbn <sup>KOGal4</sup> mithilfe von H2B-mRFP1- bzw. mCD8-GFP-Reporterexpressionen.....	<b>96</b>
<b>Abbildung 4.17:</b> Untersuchung des neu hergestellten Treiberstammes erm <sup>KOGal4</sup> mithilfe von H2B-mRFP1- bzw. mCD8-GFP-Reporterexpressionen.....	<b>97</b>
<b>Abbildung 4.18:</b> Untersuchung der mittels <i>Genetargeting</i> generierten DRx-Enhancer-Deletionsstämme 77F11 <sup>KO</sup> , 77F06 <sup>KO</sup> und 77F09 <sup>KO</sup> durch Immunfluoreszenzfärbung.....	<b>100</b>
<b>Abbildung 4.19:</b> Untersuchung der <i>hbn</i> -Enhancer- <i>Genetargeting</i> -Stämme 35D05 <sup>KO</sup> , 34G10 <sup>KO</sup> , 35A03 <sup>KO</sup> , 34G10,35A03 <sup>KO</sup> und hbn3 <sup>KO</sup> mit Deletion des jeweiligen Enhancers bzw. im Falle von 34G10,35A03 <sup>KO</sup> der jeweiligen Enhancer mittels Immunfluoreszenzfärbungen. ....	<b>102</b>
<b>Abbildung 4.20:</b> Untersuchung der durch <i>Genetargeting</i> hergestellten <i>erm</i> -Enhancer-Deletionsstämme R9D08 <sup>KO</sup> , R9D10 <sup>KO</sup> , R9D11 <sup>KO</sup> und R9D11S <sup>KO</sup> mithilfe von Immunfluoreszenzfärbungen. ....	<b>104</b>
<b>Abbildung 5.1:</b> Beteiligung der <i>Otp</i> -positiven Lineages BAmv3, BA1c und BA1p4 am olfaktorischen System von <i>Drosophila melanogaster</i> .....	<b>112</b>
<b>Abbildung 5.2:</b> Grafische Darstellung der <i>Otp</i> -Expression im Hypothalamus der Maus, angelehnt an Diaz und Puelles (2020), stark vereinfacht.....	<b>115</b>
<b>Abbildung 5.3:</b> Grafische Darstellung des neuroendokrinen Systems von <i>Drosophila</i> im dritten Larvalstadium (A) sowie im adulten Tier (B). ....	<b>119</b>

## 6.3 Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 3.1:</b> Verwendete DNA-Klone. ....	<b>28</b>
<b>Tabelle 3.2:</b> Vektorkarten der verwendeten Vektoren.....	<b>29</b>
<b>Tabelle 3.3:</b> Verwendete Fliegenstämme. ....	<b>31</b>
<b>Tabelle 3.4:</b> Verwendete primäre Antikörper.....	<b>34</b>
<b>Tabelle 3.5:</b> Verwendete sekundäre Antikörper.....	<b>35</b>
<b>Tabelle 3.6:</b> Verwendete Restriktionsenzyme. ....	<b>35</b>
<b>Tabelle 3.7:</b> Verwendete Oligonukleotide (Primer).....	<b>36</b>
<b>Tabelle 3.8:</b> Verwendete Geräte.....	<b>37</b>
<b>Tabelle 3.9:</b> Verwendete Kits. ....	<b>39</b>
<b>Tabelle 3.10:</b> Rezept für 4 SDS-Gele. ....	<b>41</b>

## 6.4 Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
% (v/v)	Volumenprozent ( <i>volume per volume</i> )
% (w/v)	Gewichtsprozent ( <i>weight per volume</i> )
°C	Grad Celsius
+	wildtypisches Chromosom
∞	unendlich
♀	weiblich (mit oben aufgesetztem Halbkreis: Jungfrau)
♂	männlich
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromol
A	Abdominalsegmente
A	Adenin
Abb.	Abbildung
ACTH	adrenocorticotropes Hypophysen-Hormon
ad	auffüllen auf
ADH	antidiuretisches Hormon
adNB	anterodorsaler Neuroblast
AKH	adipokinetisches Hormon
AL	Antennale Lobe des adulten Gehirns
AMMC	Antennales mechanosensorisches und Motorzentrum des adulten Gehirns
Amp	Ampicillin
AOTU	<i>anterior optical tubercle</i> des adulten Gehirns
AP	Alkalische Phosphatase
AP	Analplatten
AP-Musterung	anterior-posteriore Musterung
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure(n)
aSAP	anteriores Portal des anterioren SOG
ATG	Adenin Thymin Guanin (DNA-Sequenz des Start-Codons)
attB	bakterielle Attachment-Site
attL	linke Attachment-Site
attP	Phagen-spezifische Attachment-Site
attR	rechte Attachment-Site
BA	basales anterior-antennales Kompartiment des larvalen Gehirns
BAIa	baso-anteriore Lineages, anterior-laterale Subgruppen
BAIc	baso-anteriore Lineages, caudo-laterale Subgruppen
BAIp	baso-anteriore Lineages, postero-laterale Subgruppen
BAmv	baso-anteriore Lineages, ventro-mediale Subgruppen
BAP	Brahma-assoziierte Proteine
BC	basal-zentrales Kompartiment des larvalen Gehirns
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat

BL	Bloomington Stock Center (in Verbindung mit einer Nummer als Stammbezeichnung)
BLD	basal lateral dorsal (Region im embryonalen Gehirn)
bp	Basenpaare
bHLH	<i>basic Helix-Loop-Helix</i>
BLAd	anteriore baso-laterale Lineages, dorsale Subgruppe
<i>brat</i>	<i>brain tumor</i>
Brn2	Synonym für Pou3f2 (POU Domäne Klasse 3 Transkriptionsfaktor 2)
Brp	Bruchpilot
BU	<i>bulb</i> des adulten Gehirns
<i>byn</i>	<i>brachyenteron</i>
C	Cytosin
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
C-terminal/COOH	Carboxyl-terminal
CA	Calyx des Pilzkörpers des adulten Gehirns
CA	<i>Corpora allata</i>
CaCl <sub>2</sub>	Calciumchlorid
CC	<i>Corpora cardiaca</i>
CCX	<i>central complex</i> (Zentralkomplex des adulten Gehirns)
cDNA	<i>complementary DNA</i> (komplementäre DNA)
CD8	Cluster of Differentiation 8 (Transmembranglykoprotein)
cel	<i>Caenorhabditis elegans</i> Genbezeichnung
CF	zystische Fibrose
Chr.	Chromosom
CL	clypeolabrale Region
cOTP	cytoplasmatisches OTP
CPI	<i>central postero-intermediate compartment</i> (zentrales postero-intermediäres Kompartiment des larvalen Gehirns)
CPL	<i>central postero-lateral compartment</i> (zentrales postero-laterales Kompartiment des larvalen Gehirns)
CPLd	dorsaler Bereich des CPL im larvalen Gehirn
CPM	<i>central postero-medial compartment</i> (zentrales postero-mediales Kompartiment des larvalen Gehirns)
<i>crb</i>	<i>crumbs</i>
CRH	Corticotropin <i>releasing</i> Hormon
CRISPR	<i>clustered regularly interspaced short palindromic repeats</i>
CRZ	Corazonin
Ct	<i>Cycle threshold</i>
CyO	<i>Curly of Oster</i> (phänotypischer Marker: nach oben gebogene Flügel)
D	Durchfluss (GST-Fusionsproteinexpression und -aufreinigung)
D1	Otp-Expressionsdomäne im Deutocerebrum des embryonalen Gehirns
DA	dorsal-anteriores Kompartiment des larvalen Gehirns
DAL	dorso anterior lateral (Region im embryonalen Gehirn)
DAM	dorso anterior medial (Region im embryonalen Gehirn)
DC	Deutocerebrum
deion.	deionisiert

Del	Deletion
DFHBI	3,5-Difluoro-4-Hydroxybenzyliden Imidazolinon
DH44	diuretisches Hormon 44
DH44n	DH44-produzierende Neurone
Dig	Digoxigenin
DIP	Dpr-interagierende Proteine
dIPC	dorsales inneres Proliferationszentrum
DILP	<i>Drosophila</i> Insulin-like Peptid
DL	dorsolateral
DLP	dorsal-lateral-protocerebrale Zellen
DM	dorsomedial
dme	<i>Drosophila melanogaster</i> Genbezeichnung
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonucleinsäure)
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
Dom	Domino
DP	dorsal-posteriores Kompartiment des larvalen Gehirns
DPLc	dorso posterior lateral (zentral) (Region im embryonalen Gehirn)
DPLc	laterale dorso-posteriore Lineages, zentrale Subgruppen
DPLI	laterale dorso-posteriore Lineages, laterale Subgruppen
DPM	dorso posterior medial (Region im embryonalen Gehirn)
<i>dpn</i>	<i>deadpan</i>
<i>dpr</i>	<i>defective proboscis extension response</i>
<i>DRx</i>	<i>Drosophila Retinal Homeobox</i>
ds	doppelsträngig
Dscam	Downsyndrom-Zelladhäsionsmolekül
Dsx	Doublesex
dT	Desoxythymidin
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
E	Elution (GST-Fusionsproteinexpression und -aufreinigung)
EB	<i>Ellipsoid Body</i> des adulten Gehirns
ED	Enddarm
EDTA	<i>ethylenediaminetetraacetic acid</i> (Ethylendiamintetraessigsäure)
eGFP	<i>enhanced GFP</i>
EGTA	<i>ethylene glycol-bis(β-aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid</i> (Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure)
EMS	Ethylmethansulfonat
<i>en</i>	<i>engrailed</i>
<i>E(spl)my</i>	<i>Enhancer of split my</i>
<i>et al.</i>	<i>et alii/et aliae</i> (lateinisch ‚und andere‘)
<i>erm</i>	<i> earmuff</i>
F1	Filialgeneration 1
F2	Filialgeneration 2
FasII	Fasciclin II
FB	Fan-shaped Body des adulten Gehirns
Fezf2	FEZ Familie Zinkfinger 2 Protein

FGF8	Fibroblast <i>growth</i> Faktor 8 Protein
FITC	Fluorescein-5-isothiocyanat
FK	Frontalkommissur
for	<i>forward</i>
FRT	<i>Flippase Recognition Target</i> (Flippase Erkennungssequenz)
FSH	follikelstimulierendes Hormon
g	Gramm
G	Gliazelle
G	Guanin
GFP	grün fluoreszierendes Protein
GH	Wachstumshormon (Growth Hormone)
GHRH	Wachstumshormon Releasing Hormon
GMC	Ganglionmutterzelle
GnRH	Gonadotropin <i>releasing</i> Hormon
<i>grhO</i>	<i>grainy head</i> (O-Isoform)
GST	Glutathion-S-Transferase
GT	<i>Genetargeting</i>
h	Stunde(n)
H	Hemisphären
H2B	Histon 2B
H <sub>2</sub> O	Wasser
HAT	Histon-Acetyltransferase
<i>hbn</i>	<i>homeobrain</i>
HCl	Chlorwasserstoffsäure, Salzsäure
Hdac1	Histondeacetylase 1
<i>hid</i>	<i>head involution defective</i>
HRP	<i>horseradishperoxidase</i> (Meerrettichperoxidase)
HS	Hirnstamm
hsa	<i>Homo sapiens</i> Genbezeichnung
hsp	Hitzeschockprotein
HybMix	Hybridisierungslösung
iACT	innerer antennocerebraler Trakt
IgG	Immunglobulin G
Indel	Insertionen und Deletionen
INP	<i>intermediate neural progenitor</i> (intermediäre neurale Vorläuferzelle)
IP	<i>inferior</i> Protocerebrum des adulten Gehirns
IPC	Insulin-produzierende Zellen
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
Isl1	ISL LIM Homeobox 1
ITP	Ionen-transport-Peptid
ITPn	ITP-produzierende Neurone
JV	juveniles Hormon
K	Kommissur
K	Hbn-Expressionsdomäne im Kommissur-assoziierten Bereich des embryonalen Gehirns
K	Kontrolle (GST-Fusionsproteinexpression und -aufreinigung)

K	Lysin
KAc	Kaliumacetat
kb	Kilobasenpaare
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
<i>klu</i>	<i>klumpfuss</i>
KO	Knockout
KOH	Kaliumhydroxid
l	Liter
L	Hbn-Expressionsdomäne im lateralen Bereich des embryonalen Gehirns
L1–L5	Lamina-Neurone 1–5
L3	Larvalstadium 3
La	Lamina
lac	Lactose
LAL	laterale Accessorylobe des adulten Gehirns
LB	Luria-Bertani Medium
LiCl	Litiumchlorid
LH	Laterales Horn des adulten Gehirns
LH	luteinisierendes Hormon
Lhx5	LIM Homeobox 5
LN	lokale Interneurone
InB	lateraler Neuroblast
LNC	laterale neurosekretorische Zellen
Lo	Lobula
loSL	longitudinales superior-laterales Faszikel
loVI	intermediales ventral-longitudinales Faszikel
M	Marker
M	Mol
M	Hbn-Expressionsdomäne im medialen Bereich des embryonalen Gehirns
M1–M10	Medullaschichten 1–10
mACT	medialer antennoocerebraler Trakt
MB	Mushroom Body (Pilzkörper)
MCS	Multiple Cloning Site
Me	Medulla
MD	Mitteldarm
MD SA	mandibulare suboesophageale anteriore Domäne
mg	Milligramm
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
MgSO <sub>4</sub>	Magnesiumsulfat
<i>Mhc</i>	<i>Myosin heavy chain</i>
min	Minuten
miR/miRNA	microRNA
ml	Milliliter
ML	mediale Lobe des Pilzkörpers des adulten Gehirns
mM	Millimol
MNC	mediale neurosekretorische Zellen



MnCl <sub>2</sub>	Mangan(II)-chlorid
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
mRNA	<i>messenger</i> RNA
Mut	Mutation
N	Neuron
N-terminal/NH <sub>2</sub>	Amino-terminal
NaCl	Natriumchlorid
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (2H <sub>2</sub> O)	Dinatriumhydrogenphosphat
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (H <sub>2</sub> O)	Natriumdihydrogenphosphat
NaOH	Natriumhydroxid
NB	Neuroblast
NBT	Nitroblautetrazoliumchlorid
NCC	<i>Nervii Corpora Cardiac</i> a
neurog1	neurogenin 1
NFI	Neurofibromatose Typ I
ng	Nanogramm
NI	nach Induktion (GST-Fusionsproteinexpression und -aufreinigung)
Nkx2.1	NK2 Homeobox 1 Protein
Nkx2.2	NK2 Homeobox 2 Protein
NO	Noduli des adulten Gehirns
noRT	qPCR Kontrollreaktion ohne Reverse Transkriptase während der cDNA-Synthese
nOTP	nukleäres OTP
NP	Neuropil
Nrt	Neurotactin
NSC	neurosekretorische Zellen
nt	Nukleotid
oACT	<i>outer antennocerebral tract</i> (äußerer antennocerebraler Trakt)
OAR	Otp, Aristaless, Rx (Domäne)
OD	optische Dichte
OL	optische Lobe(n)
Olig2	Oligodendrocyte Transcription Factor 2
ORN	olfaktorische Rezeptorneurone
ORR	optic recess region
<i>otp/Otp</i>	<i>orthopedia/Orthopedia</i>
P	Peduncle des Pilzkörpers des adulten Gehirns
P	Pellet (GST-Fusionsproteinexpression und -aufreinigung)
P1, P2	Otp-Expressionsdomänen 1 und 2 im Protocerebrum des embryonalen Gehirns
P2l	Pioniertrakt-Gründungscluster 2, lateral
P2m	Pioniertrakt-Gründungscluster 2, medial
PAT	Primäre Axontrakte
Pax6	<i>paired box</i> 6 Protein
PB	protocerebrale Brücke des adulten Gehirns
PBAP	Polybromo Brahma-assoziierte Proteine
PBS	<i>Phosphat buffered saline</i> (Phosphat-gepufferte Salzlösung)

PBT	1x PBS mit 0,1 bis 0,2 % Tween20 (je nach Methode)
PBX	1x PBS mit 0,2 % Triton-X100
PC	Protocerebrum
PCN	protocerebrale Konnektive
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerasekettenreaktion)
PD	proximal-distale Lineages
PEM	PIPES-EGTA-MgSO <sub>4</sub> Puffer
PFA	Paraformaldehyd
pg	Pikogramm
pH	<i>potentia hydrogenii</i> (Potential des Wasserstoffs)
PI	<i>Pars intercerebralis</i>
PIPES	Piperazine-N,N'-bis(2-Ethansulfonsäure)
PL	<i>Pars lateralis</i>
PLP	posterolaterales Protocerebrum des adulten Gehirns
pMol	Pikomol
PN	Projektionsneurone
<i>pnt P1</i>	<i>pointed P1</i>
PONP	perioesophageales Ganglion des adulten Gehirns
<i>prd</i>	<i>paired</i>
pre-miRNA	<i>precursor</i> -miRNA (Vorläufer-miRNA)
pri-miRNA	primäres Transkript der miRNA
PTG	Prothoraxdrüse
PY	Pylorus
Q	Glutamin
qPCR	quantitative Polymerasekettenreaktion
R1–R8	Photorezeptoren
RbCl	Rubidiumchlorid
RE	Rektum
rev	<i>reverse</i>
RFP	rot fluoreszierendes Protein
RISC	<i>RNA-induced Silencing Complex</i>
RN	Rekurrenznerve
RNA	<i>ribonucleinacid</i> (Ribonucleinsäure)
RNase	Ribonuklease
Rpd3	Reduced potassium dependency 3
rpm	<i>revolutions per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
RQ	<i>relative quantification</i> (relativer Expressionsunterschied)
RT	Raumtemperatur
RT	Reverse Transkription
Rx	Retinal Homeobox Protein
S	Serin
S	Sonikat (GST-Fusionsproteinexpression und -aufreinigung)
S	Sporn des Pilzkörpers des adulten Gehirns
s	Sekunden
SAG	Supraoesophageales Ganglion
SAT	Sekundäre Axontrakte

Sb	<i>Stubble</i> (phänotypischer Marker: kurze Borsten)
Sco	<i>Scutoid</i> (phänotypischer Marker: teilweise fehlende Borsten)
SDS	<i>sodiumdodecylsulfate</i> (Natriumlaurylsulfat)
SEK	supraoesophageale Kommissur
Ser	<i>Serrate</i> (phänotypischer Marker: eingekerbte Flügel)
Shh	<i>Sonic Hedgehog</i> Protein
Sim1	<i>Single-minded 1</i> Protein
Sim2	<i>Single minded 2</i> Protein
SIP	intermediäres <i>superior</i> Protocerebrum des adulten Gehirns
SLP	laterales <i>superior</i> Protocerebrum des adulten Gehirns
SMP	mediales <i>superior</i> Protocerebrum des adulten Gehirns
SOC	<i>Super Optimal Broth</i> (optimales Nährmedium für Bakterien)
SOG	Suboesophageales Ganglion
spez.	spezifisch
SPV	supraoptoparaventriculäre Region
SSC	<i>saline sodium citrate</i> (Salzlösung Natriumcitrat)
<i>Su(H)</i>	<i>Suppressor of Hairless</i>
SWI/SNF	<i>switching defective and sucrose nonfermenting</i>
T	Thorakalsegmente
T	Thymin
TA-Klonierung	Thymin-Adenosin-Klonierung
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA Puffer
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
Tb	<i>Tubby</i> (phänotypischer Marker: kleiner, gedrungener Körper)
TC	Tritocerebrum
TCEP	Tris(2-carboxyethyl)phosphin
TE	Tris-EDTA Puffer
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TGFβ	<i>Transforming Growth Factor beta</i> (Transformierender Wachstumsfaktor beta)
TK	tritocerebrale Kommissur
TM3/TM6	<i>Third multiple 3/Third multiple 6</i> (Balancer, 3. Chromosom)
Tm9	transmedulläre Neurone 9
TNB	Tris-NaCl-Blockingpuffer
TRH	Thyrotropin <i>releasing</i> Hormon
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
tRNA	<i>transfer</i> -RNA
trSl	intermediäres <i>superior</i> transverses Faszikel
trSP	transverses <i>superior</i> posteriores Faszikel
TSH	Thyroidea-stimulierendes Hypophysen-Hormon
U	<i>Units</i> (Enzymeinheit)
U	Uracil
UAS	<i>Upstream Activating Sequence</i>
UTR	untranslatierte Region
UV	Ultraviolettstrahlung

ü. N.	über Nacht
V	Volt
VK	Vektorkonstrukt
VL	vertikale Lobe des Pilzkörpers des adulten Gehirns
vINB	ventrolateraler Neuroblast
VLP	ventrolaterales Protocerebrum des adulten Gehirns
VMC	ventromediales Cerebrum des adulten Gehirns
vNB	ventraler Neuroblast
w	<i>white</i>
W	Waschschritte (GST-Fusionsproteinexpression und -aufreinigung)
WT/wt	Wildtyp
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- $\beta$ -D-galactopyranosid
y	<i>yellow</i>
Z	Hbn-Expressionsdomäne im zentralen Bereich des embryonalen Gehirns
ZG	Zentralgehirn

## 7 Publikationen

### 2020

**Hildebrandt K**, Bach N, Kolb D, Walldorf U. The homeodomain transcription factor Orthopedia is involved in development of the *Drosophila* hindgut. *Hereditas*. 2020;157(1):46. Published 2020 Nov 19.

### 2021

**Hildebrandt K**, Kübel S, Minet M, Fürst N, Klöppel C, Steinmetz E, Walldorf U. Enhancer analysis of the *Drosophila* zinc finger transcription factor Earmuff by gene targeting. *Hereditas*. 2021 Nov 4;158(1):41.

Klöppel C, **Hildebrandt K**, Kolb D, Fürst N, Bley I, Karlowatz RJ, Walldorf U. Functional analysis of enhancer elements regulating the expression of the *Drosophila* homeodomain transcription factor DRx by gene targeting. *Hereditas*. 2021 Nov 5;158(1):42. (geteilte Erstautorenschaft)

### 2022

**Hildebrandt K**, Kolb D, Klöppel C, Kaspar P, Wittling F, Hartwig O, Federspiel J, Findji I, Walldorf U. Regulatory modules mediating the complex neural expression patterns of the *homeobrain* gene during *Drosophila* brain development. *Hereditas*. 2022 Jan 5;159(1):2.

**Hildebrandt K**, Klöppel C, Gogel J, Hartenstein V, Walldorf U. Orthopedia expression during *Drosophila melanogaster* nervous system development and its regulation by microRNA-252. *Dev Biol*. 2022 Sep 27:S0012-1606(22)00177-4.

## 8 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denjenigen bedanken, die mich während meiner Promotionszeit unterstützt und motiviert haben.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Uwe Walldorf, der mich bereits als Bachelorstudentin in seine Arbeitsgruppe aufgenommen hat und mir nach der Bachelor- und Masterarbeit auch die Promotion in diesem interessanten Fachgebiet ermöglicht hat. Danke für die lehrreiche und schöne Zeit, die ständige Gesprächs- und Diskussionsbereitschaft, das gute Arbeitsklima und die große Unterstützung beim Anfertigen unserer Publikationen.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Martin Simon für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens.

Vielen Dank an alle meine Kolleginnen aus der Arbeitsgruppe, die mich auf meinem Weg begleitet haben. Eva, Tina, Nathalie, Caroline, Jenny, Susanne, Doris, Renate und alle Bachelorstudentinnen: Es war mir eine Freude, mit euch zusammenzuarbeiten. Insbesondere möchte ich mich bei Nora bedanken, die mir eine riesige Unterstützung im Labor war und zu einer guten Freundin geworden ist.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Peter Lipp und seiner Arbeitsgruppe für die freundliche Bereitstellung des Konfokalmikroskops und die Einführung in die qPCR-Thematik und Frau Dr. Nicole Ludwig aus dem Fachbereich Humangenetik für die große Hilfe bei der Durchführung der qPCR-Experimente und die Bereitstellung der dafür benötigten Geräte.

Vielen Dank an Herrn Dr. Bruno Bello für die Hilfe bei der Beschreibung der Otp-Expressionsbereiche im larvalen Gehirn und an Herrn Prof. Dr. Volker Hartenstein für die genaue Benennung der Otp-positiven Lineages sowie die große Unterstützung bei der Anfertigung unserer Publikation.

Ich danke meiner Familie und meinem Freund Markus für ihre Unterstützung in allen Lebenslagen.

Zuletzt möchte ich meinem Laborkaninchen Schneeweißchen für die Herstellung des Otp-PE-Antikörpers danken und meinen unzähligen geflügelten Mitarbeitern, ohne die die Durchführung dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre.