

**Genregulatorische und funktionelle Analysen
des differentiell exprimierten *rolling pebbles* Transkriptes *rols6*
zeigen, dass das Rols6 Protein für die vollständige
Differenzierung der Malpighischen Gefäße in
Drosophila melanogaster
notwendig ist.**

Dissertation

zur
Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

dem
Fachbereich Biologie
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Michael Pütz
aus Grevenbroich/ Kapellen

Marburg/Lahn 2004

Vom Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg als Dissertation am
___ 20.09.2004 ___ angenommen.

Erstgutachter: Prof. Dr. Renate Renkawitz-Pohl

Zweitgutachter: Prof. Dr. Monika Hassel

Tag der mündlichen Prüfung am ___ 05.11.2004 ___

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung	1
2. Einleitung	2
2.1 Das Gen <i>rolling pebbles</i> im Kontext der Myogenese von <i>Drosophila melanogaster</i>	2
2.1.1 Identifizierung des Gens <i>rolling pebbles</i>	2
2.1.2 Die gewebespezifischen Expressionsmuster der Rols Transkripte <i>rols7</i> und <i>rols6</i>	4
2.1.3 Vorhergesagte Proteinstrukturen und -domänen geben Hinweise auf die Funktion von Rols	5
2.2 Die Myoblastenfusion der <i>Drosophila</i> Bewegungsmuskulatur und beteiligte Faktoren	6
2.3 Das Exkretionssystem von <i>Drosophila melanogaster</i> : die Malpighischen Gefäße	9
2.3.1 Anlage und allgemeine Entwicklung der Malpighischen Gefäße	9
2.3.2 Die Architektur der Malpighischen Gefäße	10
2.4 Rolling pebbles im Kontext der beschriebenen und putativen Interaktionen der myogenen Faktoren	12
2.5 Problemstellung	14
3. Material	15
3.1 Geräte	15
3.2 Chemikalien und andere Materialien	15
3.3 Enzyme	16
3.4 Molekularbiologische Reagenzien und Reagenziensätze	16
3.5 Antikörper und Seren	16
3.6 Bakterienstämme (<i>Escherichia coli</i>)	17
3.7 Plasmide	17
3.8 Synthetische Oligonukleotide	17
3.9 Sequenzierungen	18
3.10 Stammhaltung und Zucht von <i>Drosophila melanogaster</i>	18
Balancerstämme	18
Defizienzen	19
P-Element-Insertionen und Mutanten	19
Sonstige	19
4. Methoden	20
I. Arbeiten mit <i>Drosophila melanogaster</i> und histologische Methoden	20
4.1 Fliegenzucht und Stammhaltung von <i>Drosophila</i>	20
4.2 Sammeln von Fliegenembryonen	20
4.3 P-Element Keimbahntransformation von <i>Drosophila</i>	21
a) Vorbereitung der Embryonen	21

	b) Mikroinjektion	21
	c) Selektion der transgenen Fliegenlinien	22
4.4	Behandlung und Vorbereitung von Fliegenembryonen für Antikörperfärbung und <i>in situ</i> -Hybridisierung	22
	a) Entchorionisierung und Formaldehyd-Fixierung von Embryonen	22
	b) Heißfixierung von Embryonen	23
4.5	Antikörperfärbung an fixierten <i>Drosophila</i> Embryonen	23
4.5.1	Antikörperfärbung nach der „Avidin-Biotin-Complex“ Methode	23
4.5.2	Antikörperfärbung mit fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Antikörpern	24
4.6	<i>In situ</i> -Hybridisierung an fixierten <i>Drosophila</i> -Embryonen mit DIG-markierten DNA-Sonden	25
4.7	Herstellung von Dauerpräparaten	26
4.7.1	Einbetten in Epon	26
4.7.2	Einbetten in Fluoromount G	26
4.8	Histochemischer X-Gal Aktivitätsnachweis an larvalen Geweben	26
	II. Präparation und Analyse von DNA	27
4.9	Herstellung chemisch kompetenter Bakterien	27
4.10	Transformation chemisch kompetenter Bakterien	28
4.11	Präparation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	28
4.11.1	Mini-Präparation von Plasmid-DNA (alkalische Lyse)	28
4.11.2	Midi-Präparation von Plasmid-DNA	29
4.12	Präparation von genomischer DNA aus <i>Drosophila</i>	29
4.13	Gelelektrophorese von DNA in Agarosegelen	30
4.14	Aufreinigung von DNA-Fragmenten	30
4.14.1.1	DNA-Isolierung aus Agarosegelen (GFX™ Säulenaufreinigung)	30
4.14.1.2	DNA-Isolierung aus Agarosegelen (Genomed, Jetsorb Extraktion)	31
4.14.2.1	DNA-Isolierung aus Lösungen	31
4.14.3	Elutip-d-DNA Aufreinigung	31
4.15	Bestimmung der Nukleinsäure-Konzentration	32
	III. Enzymatische Manipulation von Nukleinsäuren	32
4.16	Enzymatische Spaltung von DNA mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen	32
4.17	Polymerasekettenreaktion (PCR)	33
4.18	Modifikation von DNA-Fragment-Enden	34
4.18.1	Dephosphorylierung von 5´-Phosphat-Enden	34
4.18.2	Auffüllen von 5´ überhängenden Enden	34
4.18.3	Kinasierung von 5´-Hydroxyenden nicht phosphorylierter DNA	34
4.19	Ligation von DNA-Fragmenten	35
4.20	Markierung von DNA-Molekülen	35
4.20.1	Nichtradioaktive Markierung von PCR-DNA-Sonden	35
4.20.2	Spot-Test DIG-markierter DNA-Sonden	35
	IV. Expression und Analyse von Fusionsproteinen	36
4.21	Expression von rekombinanten His-gekoppelten Fusionsproteinen	36
4.22	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	37
4.23	Western Blot und immunologischer Nachweis von Proteinen	38
		40
5. Ergebnisse		

5.1	Phänotypische Charakterisierung der defizienten Linie Df(3L)BK9	40
5.2	Phänotypische Analyse der Malpighischen Gefäße in <i>rolling pebbles</i> Mutanten	43
5.3	Der Phänotyp in den Malpighischen Gefäßen ist einem Verlust des <i>rols6</i> Transkriptes zuzuordnen	44
5.3.1	Generierung einer <i>rols6</i> spezifischen Mutation mittels P-Element-Remobilisierung	44
5.3.2	Kreuzungsgenetische Charakterisierung der homozygot letalen „JumpOut“-Linien, Komplementationstests	46
5.3.3	Das somatische Mesoderm ist defekt in den homozygot letalen „JumpOut“-Linien	48
5.3.4	Die Malpighischen Gefäße der letalen EP*-„JumpOut“-Linien werden nahezu wildtypisch ausgebildet	50
5.3.5	Phänotypische Analyse der „JumpOut“-Linie EP(3)3330*58a	52
5.3.6	Die vitale „JumpOut“-Linie EP(3)3330*5a stellt eine <i>rols6</i> spezifische Deletionsmutante dar	53
5.3.7	Charakterisierung der Deletionslinie EP(3)3330*5a	54
5.3.7.1	Mesodermale Derivate sind in EP(3)3330*5a nicht betroffen	55
5.3.7.2	EP(3)3330*5a Embryonen zeigen Entwicklungsstörungen der Malpighischen Gefäße	62
5.4	In den Malpighischen Gefäße von <i>rols</i> Mutanten sind Principal-Zellen und Stellate-Zellen detektierbar	57
5.5	Entwicklungsstörungen der Malpighischen Gefäße in <i>Myoblast city</i> mutanten Embryonen	57
5.6	Die Malpighischen Gefäße in <i>rac1/rac2</i> -Doppelmutanten sind in ihrer Entwicklung gestört	58
5.7	Ansätze zum Nachweis des Rols6 Proteins	60
5.7.1	Klonierung der Flag-Tag <i>rols6</i> cDNA	60
5.7.2	Bakterielle Expression eines <i>rols6</i> spezifischen Peptides zur Generierung eines spezifischen anti-Rols6 Antikörpers	61
5.8	Identifizierung der <i>rols6</i> spezifischen regulatorischen, genomischen Region	63
5.8.1	Das <i>rols6</i> Expressionsmuster	63
5.8.2	Generierung von <i>rols6</i> spezifischen Reportergenkonstrukten	65
5.8.3	Ein 1100 Basenpaarfragment aus der putativen <i>rols6</i> Promotor-Region spiegelt das gesamte <i>rols6</i> Expressionsmuster in Reportergenstudien wieder	66
5.8.4	Datenbank-gestützte Sequenzanalyse der putativen <i>rols6</i> Promotor-Region	68
5.8.5	Ansätze zur Charakterisierung des putativen <i>rols6</i> Promotors	69
5.9	<i>rols6</i> Expressionsanalyse in Mutanten	72
5.10	Das <i>rols6</i> Expressionsmuster in den Geweben von 3. Larven	76
6. Diskussion		78
6.1	<i>rolling pebbles</i> mutante Embryonen zeigen Defekte in der Differenzierung der Malpighischen Gefäße	79
6.2.1	EP(3)3330*5a ist eine <i>rols6</i> spezifische Deletionsmutante	80
6.2.2	Die Defekte in den Malpighischen Gefäßen von <i>rolling pebbles</i> Mutanten korrelieren mit einer Störung des <i>rols6</i> Transkriptes	81
6.3	Die aus dem EP-JumpOut Experiment erhaltenen letalen Linien können zur Charakterisierung des EMS-Allels <i>rols</i> ^{xx117} beitragen	82

6.4	Eine subzelluläre Lokalisationsanalyse von Rols6 könnte Aufschluss über eventuelle Zelladhäsionsvorgänge unter Rols-Beteiligung in den MpG geben	83
6.5	Beurteilung der Phänotypen der Malpighischen Gefäßdifferenzierung in Mutanten von potentiellen Rolling pebbles Interaktionspartnern	84
6.5.1	<i>Myoblast city</i> und <i>rac</i> mutante Embryonen zeigen ähnliche Defekte in der Malpighischen Gefäßdifferenzierung wie <i>rolling pebbles</i> Mutanten	84
6.5.2	Die mesodermalen Stellate Cells sind in <i>mbc</i> und <i>rac</i> Mutanten befähigt, zur Anlage der Malpighischen Gefäße zu migrieren	85
6.5.3	Eine Funktion von <i>Dumbfounded/ Kin of irregular-chiasm-C</i> in der Differenzierung der Malpighischen Gefäße ist nicht bekannt	85
6.6	Das <i>rolling pebbles</i> Transkript <i>rols6</i> wird differentiell unabhängig von <i>rols7</i> transkribiert	87
6.7	Beurteilung der zusätzlich zum <i>rols6</i> Expressionsmuster auftretenden Expressionen in den Promotor-Konstrukten <i>Rosh1,1</i> und <i>Rosh3</i>	88
6.8	<i>rols6</i> transkriptions-aktivierende Faktoren konnten in ersten Analysen in Mutanten von früh zell-determinieren Transkriptionsfaktoren nicht identifiziert werden	88
6.9	Rols6 im Kontext der Malpighischen Gefäßentwicklung in <i>Drosophila</i> im Vergleich zur Nierenentwicklung in Vertebraten-Modellen	91
6.10	Eine Funktion von Rols6 in Geweben von 3. Larven bleibt unbekannt	94
6.11	Ausblick auf zukünftige Untersuchungen	94
7. Abkürzungen		96
8. Abbildungsverzeichnis		97
9. Literaturverzeichnis		99

1. Zusammenfassung

Die Kommunikation zwischen zwei Zellpopulationen, Zell-Migration und -Adhäsion sind in der Entwicklung der Malpighischen Gefäße (MpG) wie auch in der Muskelentwicklung von *Drosophila melanogaster* während der Myoblastenfusion essentielle biologische Vorgänge. An diesen Prozessen sind verschiedene Faktoren, z.B. Mitglieder der Immunglobulin Super Familie (IgSF), SH3-domänen Proteine, wie z.B. Myoblast city (Mbc), und auch Multidomänenproteine wie Rolling pebbles (Rols) beteiligt. Das Gen *rolling pebbles* kodiert für zwei differentiell exprimierte Transkripte (*rols6* und *rols7*), wobei *rols7* nur in mesodermalen Derivaten exprimiert wird und als essentiell für die Myoblastenfusion beschrieben wurde.

Funktionelle und genregulatorische Analysen des *rols6* Transkriptes sollten Aufschluss über die entwicklungsbiologische Relevanz von Rols6, insbesondere in der Entwicklung und Differenzierung der MpG, erbringen. Hierzu wurden bekannte *rols*-Allele phänotypisch analysiert, wodurch Differenzierungsdefekte der MpG aufgedeckt wurden. Durch eine spezifisch gegen *rols6* gerichtete P-Element Mutagenese wurde eine Deletionslinie generiert. Anhand dieser Linie konnten die beobachteten Entwicklungsstörungen in den MpG einem Verlust der Funktion des Rols6 Proteins zugeordnet werden, wobei mesodermale Derivate in dieser Linie wildtypisch gebildet werden.

Der essentielle regulative genomische Bereich für dieses Transkript konnte identifiziert werden. Dazu wurde eine Vielzahl von Reportergenkonstrukten generiert und deren Reporterexpression in transgenen Linien analysiert. Dadurch konnten essentiell regulativ aktive Bereiche und Enhancer für die MpG und das Endoderm in einem 1,1 kb großen Fragment, stromaufwärts vom *rols6* 5'UTR identifiziert werden. *rols6* Transkriptionsregulatoren sind auch weiterhin unbekannt. Ausgeschlossen werden können aber frühe determinierende Faktoren wie Krüppel, Decapentaplegic, die GATA-Faktoren Serpent und Grain und auch der *Drosophila* GAGA-Faktor.

Durch die in dieser Arbeit durchgeführten funktionellen Analysen konnte erstmalig eine Funktion von Rols6 an der Zellumstrukturierung während der Differenzierung der MpG in *Drosophila* beschrieben werden. Die phänotypische Analyse von Mutanten der aus der Myogenese bekannten, potentiellen Rols Interaktionspartner Mbc und Rac weisen vergleichbare Defekte in der Differenzierung der MpG auf. Die erbrachten Daten weisen darauf hin, dass Rols6, Mbc und Rac gemeinsam in einer Wirkungskette beteiligt sind. Schließlich konnte durch die spezifisch gegen *rols6* gerichtete Mutagenese gezeigt werden, dass der Rols Isotyp 6 eine biologische Funktion während der Differenzierung der MpG übernimmt, während Rols7 in der Myoblastenfusion funktionell ist, wobei die Expressionen der beiden *rols* Transkripte über gewebespezifische Promotoren reguliert werden.

2. EINLEITUNG:

Einer der zentralen Mechanismen in der Myogenese, sowohl bei Vertebraten als auch bei *Drosophila*, ist der Vorgang der Zellfusion, bei dem durch Verschmelzen von mesodermalen Zellen sukzessive ein synzytialer Muskelstrang gebildet wird. Die larvale Körperwandmuskulatur von *Drosophila melanogaster* wird während der Embryogenese gebildet und besteht im letzten Embryonalstadium aus 30 individuellen Muskeln pro Hemisegment (Bate, 1993). Da diese Ordnung segmental einem strengen Muster unterliegt, können Entwicklungsstörungen und Defekte in mutanten Embryonen mit Hilfe geeigneter Marker über den phänotypischen Vergleich mit der Wildtypsituation identifiziert werden. Im Modellorganismus *Drosophila melanogaster* konnten bisher grundlegende Vorgänge einer solchen Myoblastenfusion beschrieben werden. Auch wurden einige der daran beteiligten essentiellen Faktoren identifiziert (Übersichtsartikel: Dworak and Sink, 2002).

2.1 Das Gen *rolling pebbles* im Kontext der Myogenese von *Drosophila melanogaster*

2.1.1 Identifizierung des Gens *rolling pebbles*

Aus einer Kollektion von Mutanten wurden mittels Antikörperfärbung gegen β 3-Tubulin Fliegenlinien mit defekter embryonaler somatischer Muskulatur identifiziert. Eine der identifizierten Mutanten war eine chromosomale Deletion (U54650, Defizienzbezeichnung *Df(3L)BK9*; Bruchpunkte: 68E2-3; 69A1). Ihr Phänotyp zeichnet sich dadurch aus, dass die komplette somatische Muskulatur in einem frühen Stadium ihrer Entwicklung stehen geblieben zu sein scheint. Die Bildung der somatischen Muskulatur erfolgt nur ansatzweise und in späten Embryonalstadien sind nur viele unfusionierte Myoblasten zu sehen. Um molekulare Daten über das für den Fusionsdefekt verantwortliche Gen zu gewinnen und Informationen über die genomische Organisation, die Proteinstruktur und eventuell funktionelle Proteindomänen zu erhalten, musste ein Zugang zum Genom erhalten werden. Dies wurde mittels „Plasmid-rescue“ Experimenten an der P-Element-Insertionslinie P1729 bewerkstelligt. Diese Linie zeigt einen nahezu identischen Fusionsphänotyp wie die Defizienz *Df(3L)BK9*, ist embryonal letal und allelisch zu dieser Defizienz. Mittels des „Plasmid-rescue“ Verfahrens konnten die genomischen Sequenzen angrenzend zur P-Element Insertionsstelle identifiziert werden, mit welchen im folgenden in einem „cDNA-Bank-Screen“ zwei cDNAs isoliert wurden, die in ihrer Länge und im jeweiligen 5'-Bereich differierten. Die längere cDNA umfasst 6,3 kb (LDcDNA I), die kürzere cDNA 5,8 kb (LDcDNA II) (siehe Abbildung 2.1; Rau et al.,

2001). Nach einem Sequenzvergleich zwischen den beiden cDNAs und dem genomischen Bereich ergab sich, dass beide Transkripte über 6 gemeinsame Exons im 3'-Bereich, und jeweils über 2 transkriptspezifische Exons im 5'-Bereich verfügen. Der Translationsstart konnte für jedes Transkript im jeweiligen zweiten spezifischen Exon bestimmt werden (Rau et al., 2001). Auf Grund seines Phänotyps wurde das Gen *rolling pebbles* (*rols*) genannt (Rau et al., 2001; Menon and Chia, 2001). Etwa zeitgleich klonierte eine texanischen Arbeitsgruppe dieses Gen und nannte es *antisocial* (*ants*) (Chen and Olson, 2001).

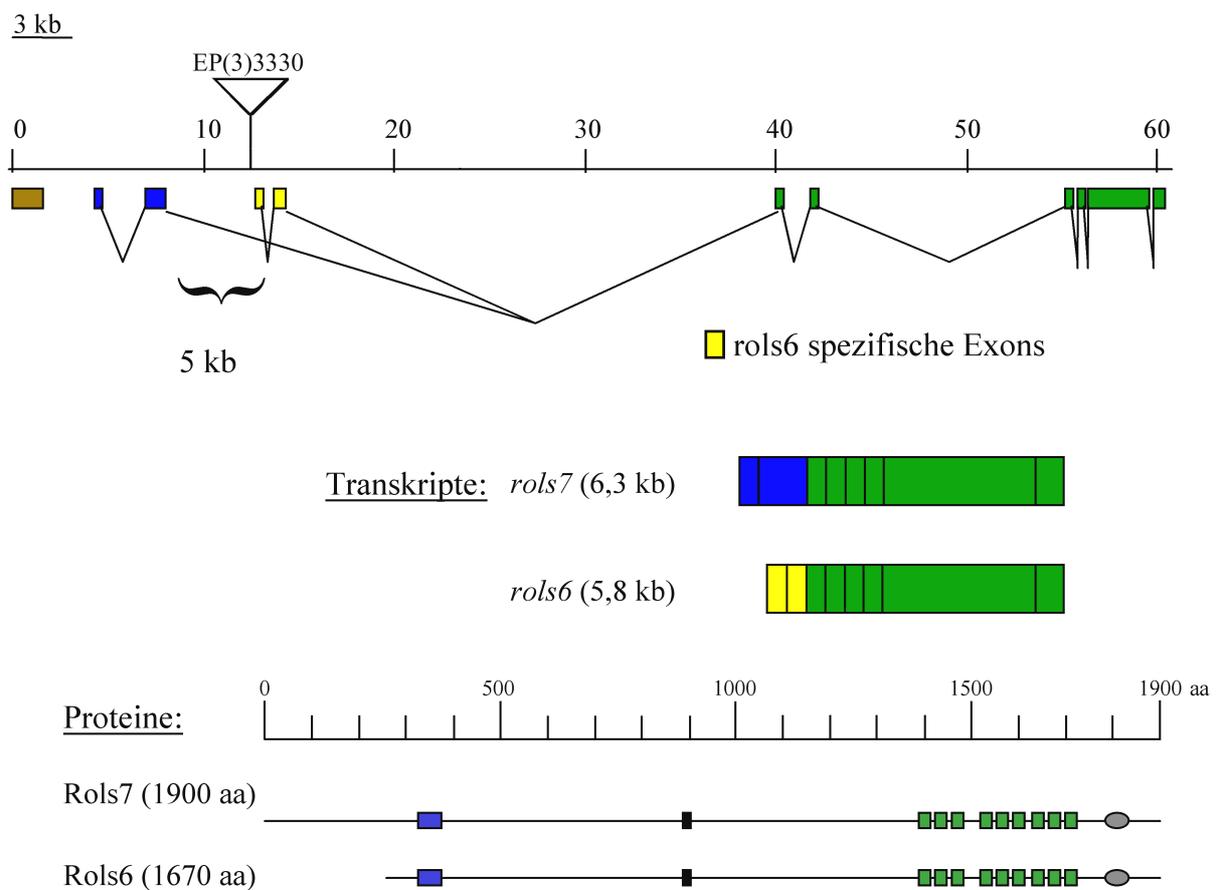


Abbildung 2.1 Schematische Darstellung des *rolling pebbles* Genortes

Das Gen erstreckt sich über eine genomische Größe von etwa 60 kb. Die daraus resultierenden Transkripte sind 6,3 kb (*rols7*) und 5,8 kb (*rols6*) groß. Gemeinsame Exons sind grün, spezifische Exons sind blau (*rols7*) bzw. gelb (*rols6*) markiert. Die geschwungene Klammer im 1. gemeinsamen Intron kennzeichnet die genomische Region, in der der putative Promotorbereich des kurzen Transkriptes zu vermuten ist. Alle vorhergesagten Proteindomänen sind in beiden Isoformen gleichsam vorhanden: RING-Finger (blau), P-Loop (schwarz), Ankyrin-repeats (grün), TPR-repeats (grau).

2.1.2 Die gewebespezifischen Expressionsmuster der *rols* Transkripte *rols7* und *rols6*

Um das *rolling pebbles* Expressionsmuster zu beschreiben, wurde zunächst die β -Galaktosidase Expression zweier „Enhancer-Trap“-Linien untersucht. Eine Linie trägt die oben angesprochene Transposoninsertion P1729. Das Transposon liegt hier im ersten großen Intron des *rols* Gens, welches beiden Transkripten gemein ist. Das Transposon einer zweiten Insertionslinie P1027 befindet sich ca. 120 bp vor dem Transkriptionsstart des kürzeren Transkriptes *rols6*. P1027 verhält sich zur *rols* Defizienz und zu P1729 allelisch und weist die gleichen mesodermalen Defekte auf. In den *lacZ*-Färbungen der „Enhancer-Trap“-Linien wurden unterschiedliche Muster gefunden, welche darauf hinweisen, dass *rolling pebbles* nicht ausschließlich im Mesoderm, sondern auch in anderen Geweben exprimiert wird. Die *lacZ*-Expression des Reportergens in P1729 konnte überwiegend im Kopfbereich, im Proventrikulus und Oesophagus, sowie im End- und Mitteldarm und in den Apodemen beschrieben werden. In P1027 wurde Reporterogenaktivität im anterioren und posterioren Darmprimordium junger Embryonen, im Endoderm und im Bereich des Kopfes sowie des Pharynx nachgewiesen. Ebenfalls werden in Stadium 11 embryonale Amnioserosazellen mittels *lacZ*-Expression markiert (Rau, Dissertation, 2001).

Die in den P-Element-Insertionslinien beschriebenen Reporterogen-Expressionen lassen auf eine spezifische Verteilung der beiden *rols* Transkripte in unterschiedlichen Geweben schließen. *In situ*-Hybridisierungen mit transkriptspezifischen Sonden konnten spezifische Transkriptverteilungen im Verlauf der Embryogenese beschreiben (Rau et al., 2001). Das längere Transkript *rols7* kann ab Stadium 9/10 im gesamten Mesoderm und von Stadium 10 bis Stadium 13/14 im somatischen Mesoderm nachgewiesen werden. Im viszeralen Mesoderm ist *rols7* nur kurze Zeit im Stadium 11/12 zu detektieren. *rols7* wird in einem segmentalen Muster exprimiert und ist auf die Muskelvorläuferzellen beschränkt. Die Expression kann nicht mehr in späteren Stadien detektiert werden, in denen die Myoblastenfusionen der somatischen Muskulatur abgeschlossen sind (Rau et al., 2001). *rols6* Expression kann im verlängerten Keimstreifstadium im anterioren und posterioren Darmprimordium nachgewiesen werden, welche aufeinander zuwachsen, um den Mitteldarm zu bilden. Im selben Stadium findet man an der Grenze vom posterioren Darmprimordium zum entstehenden Enddarm die Anlagen für die Malpighischen Gefäße. In diesen Anlagen ist *rols6* in starkem Maße exprimiert. Diese Expressionsdomänen (Endoderm, Malpighische Gefäße) und eine zusätzliche Domäne im Pharynxbereich bleiben bis in späte Embryonalstadien durch die Nachweisbarkeit des *rols6* Transkriptes gekennzeichnet.

2.1.3 Vorhergesagte Proteinstrukturen und -domänen geben Hinweise auf die Funktion von Rols

Aufgrund der Daten über die verschiedenen Längen der *rolling pebbles* cDNAs sind verschieden große Proteine zu erwarten (siehe Abbildung 1). Rols7 ist demnach ein Protein von 1900 Aminosäuren mit 309 N-terminalen spezifischen Aminosäuren. Das kürzere Transkript codiert für ein 1670 Aminosäuren umfassendes Protein Rols6, welches sich N-terminal durch 79 spezifische Aminosäuren von der längeren Form unterscheidet. Mit Hilfe der EMBL-Datenbank (Smart-tool; Schultz et al., 1988; Schultz et al., 2000) wurden diverse funktionelle Proteindomänen im gemeinsamen Bereich beider Proteine vorhergesagt, die auf eine Funktion von Rols in Protein-Protein Interaktionen vermuten lassen. Im N-terminalen Bereich wurde eine hoch konservierte und spezialisierte Zinkfinger-Domäne, RING-Finger-Domäne genannt, vorhergesagt. RING-Finger-Proteine wirken in verschiedensten zellulären Prozessen, wie z.B. Apoptose, Onkogenese und viraler Replikation. Sie übernehmen auch weitere Aufgaben, z.B. bei der Transkription, der Signaltransduktion oder beim Transport von RNA und Organellen (Saurin et al., 1996). Im Gegensatz zu den klassischen Zinkfinger-Motiven sind sie sowohl nukleär als auch zytoplasmatisch lokalisiert (Borden and Freemont, 1996; Saurin et al., 1996). Das RING-Finger-Motiv scheint aber generell Protein-Protein-Interaktion zu vermitteln und wird im Zusammenhang mit der Bildung von großen Molekül-Komplexen genannt. Ein solch großer Proteinkomplex ist z.B. an der Degradation von Proteinen beteiligt, welche durch die Ubiquitinierung eines Substrates unter Beteiligung mehrerer Enzyme vonstatten geht. Die Übertragung von Ubiquitin auf das Substrat wird der RING-Finger tragenden E3 Ligase zugeschrieben, welche durch spezifische Proteinbindung des „E2 conjugating enzymes“ einen degradierenden Proteinkomplex an das Substrat heranzuführt (zur Übersicht siehe Borden, 2000; Joazeiro et al., 1999; Joazeiro and Weissman, 2000; Zheng et al., 2000).

Im C-Terminus des Rolling pebbles Proteins wurden zudem neun Ankyrin-„repeats“ und zwei bis drei TPR-„repeats“ vorhergesagt.

Ankyrin-„repeats“ gehören ebenfalls zu den Strukturmotiven, denen funktionell eine starke Protein-Protein-Wechselwirkung zugeschrieben wird. Diese repetitiven Motive werden häufig in Proteinen gefunden, die diverse Funktionen z.B. in der Transkriptionsinitiation, der Regulation des Zellzyklus dem Ionentransport, der Aufrechterhaltung der Integrität des Zytoskelettes und der Zell-Zell-Kommunikation erfüllen (Bork, 1993). Bekannt wurden sie als „Linker“ zwischen membranständigen Proteinen und dem Spektrin des Zytoskelett (zur Übersicht siehe Rubtsov und Lopina, 2000). Diese Wechselwirkung wurde in den bisher beschriebenen Ankyrin-„repeat“ beinhaltenden Proteinen über einen N-terminalen Ankyrinanteil vermittelt.

Als bekanntestes Mitglied dieser Proteinfamilie ist der Notch-Rezeptor zu nennen (Artavanis-Tsakonas et al., 1999; Lai 2004).

„Tetratricopeptid repeats“ (TPR) sind ein sehr weit verbreitetes Proteinstrukturmotiv und vermitteln in den verschiedensten Organismen (vom Bakterium bis zum Menschen) die Bildung von Multiproteinkomplexen. Proteine mit solchen Motiven sind an den unterschiedlichsten biologischen Prozessen beteiligt, wie z.B. der Regulation des Zellzyklus, Transkriptionskontrolle und mitochondrialem Proteintransport. Auch bei der Proteinfaltung und in der Neurogenese spielen TPR-repeat Proteine eine Rolle (Blatch und Lässle, 1999; Goebel und Yanagida, 1991; zur Übersicht siehe D'Andrea und Regan, 2003).

Interaktionen des Rols Proteins mit verschiedenen Faktoren, die ebenfalls essentielle Rollen während der Myogenese spielen, konnten bisher ansatzweise nachgewiesen werden (Menon and Chia, 2001; Chen and Olson, 2001). Allerdings wurde bisher nicht ausreichend geklärt, inwieweit die vorhergesagten, funktionellen Domänen des Rols Proteins an der Interaktion beteiligt sind.

2.2 Die Myoblastenfusion der *Drosophila* Bewegungsmuskulatur und beteiligte Faktoren

Essentiell für eine regulär ablaufende Zellfusion, die zu einem synzytialen Muskel führt, ist das Zusammenspiel zweier Zelltypen. Schon frühe Untersuchungen zur Fusion von Zellen in der Myogenese von *Drosophila melanogaster* führten zu dem Ergebnis, dass so genannte „Founder-Zellen/ Gründerzellen mit „fusionskompetenten Myoblasten“ (Fcm's) verschmelzen (Bate, 1990). Beide Zelltypen werden aus mesodermalen Derivaten, in denen hohe Twist-Expression vorherrscht, rekrutiert. Mittels lateraler Inhibition via *Notch* (*N*) Signaltransduktion werden „Progenitor-Zellen“ selektiert. Aus der anschließenden Teilung der Progenitoren entstehen Founder-Zellen/ Gründerzellen, jede charakteristisch für eine zukünftige Muskelfaser, während die umliegenden Zellen als „fusionskompetente Myoblasten“ (Fcm's) für die späteren Fusionen bereitstehen (Carmena et al, 1995). Detaillierte Kenntnisse über die Prozesse, die während der Fusion zweier Myoblasten ablaufen, wurden durch die Arbeiten von Doberstein et al., 1997 gewonnen. Mittels elektronenmikroskopischer Aufnahmen von embryonalen Muskelzellen konnte auf subzellulärer Ebene beschrieben werden, wie sich in den Regionen, in denen Myoblasten in Kontakt zueinander stehen, auf beiden Seiten der Zellmembranen Vesikel mit elektronendichtem Inhalt paarig zueinander anordnen und den so genannten „Präfusionskomplex“ bilden. Dieser Komplex verdichtet sich zu einem „plaque“, in dessen direkter Nachbarschaft anschließend die Membranen aufgebrochen und abgebaut werden. Durch das Vorhandensein von Vesikeln in der Nähe der

aufgebrochenen Membranstellen wird vermutet, dass das Membranmaterial mittels vesikulären Transports abgebaut wird.

Neben der Klärung der an der Myoblastenfusion beteiligten Prozesse war das Auffinden von Faktoren, die in den beschriebenen Vorgängen Schlüsselpositionen einnehmen, von großem Interesse. Viele der heute bekannten Faktoren wurden aufgrund des Phänotyps in entsprechenden Mutanten entdeckt, der sich durch eine nur spärlich bis gar nicht ausgebildete Bewegungsmuskulatur auszeichnet. Statt der gestreckten Muskelfasern waren hier nur die für myoblastenfusionsdefekte Mutanten charakteristischen rudimentären Muskelstränge und überwiegend unfusionierte Myoblasten zu beobachten. Einigen der so gefundenen mutanten Phänotypen konnten die betroffenen Gene zugeordnet werden, die in Tabelle 1 zusammengefasst sind (nach Dworak and Sink, 2002).

Tabelle 1:

<i>Drosophila</i> Protein	Proteinfamilie/ Charakteristika	Lokalisation	Vertebraten Homolog
Stick and stones (Sns)	Immunglobulin Superfamilie, transmembran	Fusionskompetente Myoblasten	Nephrin
Dumfounded/ Kin of Irregular-chiasm-C (Duf/Kirre-C)	Immunglobulin Superfamilie, transmembran	Founder-Zellen	Dm-Grasp/Ben/Sc1
Irregular-chiasm-C/ Roughest (Irre-C/Rst)	Immunglobulin Superfamilie, transmembran	Founder-Zellen und fusionskompetente Myoblasten	Dm-Grasp/Ben/Sc1
Hibris (Hbs)	Immunglobulin Superfamilie, transmembran	Fusionskompetente Myoblasten	Nephrin
Rolling Pebbles (Rols)/ Antisocial (Ants)	Multidomänen-Protein; Adapter-Protein, zytoplasmatisch	Founder-Zellen	Mants
D-Titin	Immunglobulin ähnliche Domänen, PEVK Domänen, zytoplasmatisch	Founder-Zellen und fusionskompetente Myoblasten	Titin
Myoblast City (Mbc)	SH3 Domäne, zytoplasmatisch	Founder-Zellen und fusionskompetente Myoblasten	DOCK180
D-Crk	SH2 und SH3 Domänen	Mesoderm	Crk-II und CrkL
Rac1/Rac2	GTPasen	Ubiquitär	Rac
Blown fuse (Blow)	PH-Domäne, zytoplasmatisch	Founder-Zellen und fusionskompetente Myoblasten	Unbekannt

Anhand ihrer Expressionsmuster konnten sie den an der Myoblastenfusion beteiligten Zelltypen zugeordnet werden. Einige dieser Mutanten wurden ebenso auf subzellulärer Ebene untersucht und ihr Fusionsdefekt im Vergleich zum regulären Ablauf der Myoblastenfusion nach Doberstein präzisiert. Ebenso konnten auch Interaktionen einiger der bekannten Faktoren beschrieben werden (zur Übersicht siehe Dworak and Sink, 2002).

Rolling Pebbles (Rols/Ants) ist ein wesentlicher Bestandteil dieser Fusionsmaschinerie. Der Muskelphänotyp, in Abbildung 2.2 dargestellt mittels Antikörperfärbung gegen β 3-Tubulin, verdeutlicht die Auswirkungen von Mutationen im *rolling pebbles* Gen auf die somatische Muskulatur anhand der Defizienz Df(3L)BK9. Ebenso schwerwiegend sind die Auswirkungen in den spezifischen *rols* EMS Allelen (Chen and Olson, 2001; Menon and Chia, 2001; Rau et al., 2001)

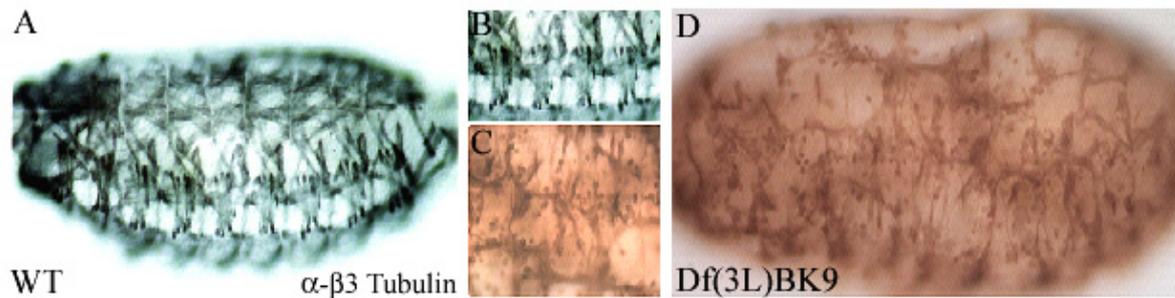


Abbildung 2.2: Muskelfusionsstörungen in *rolling pebbles* mutanten Embryonen

Die Bewegungsmuskulatur von Embryonen im Stadium 16 wurde visualisiert mittels Antikörperfärbung gegen β 3-Tubulin. Alle Embryonen sind anterior nach links ausgerichtet. Die *rols* defiziente Linie Df(3L)BK9 (C-D) weist deutliche Störungen in der lateralen Muskulatur im Vergleich zum Wildtyp (A-B) auf. Charakteristisch erscheinen in solchen fusionsmutanten Embryonen überwiegend nicht fusionierte Myoblasten anstelle der synzytialen Muskelstränge.

Weitere Daten zum *rols* Phänotyp erlaubten, das Modell der Myoblastenfusion, wie es von Doberstein et al. (1997) beschrieben wurde, zu modifizieren. In *rols*-mutanten Embryonen finden sich neben einer Vielzahl unfusionierter Myoblasten auch 2 bis 3 kernige Zellen. Diese sind zum Teil gestreckt und erwecken den optischen Eindruck von „Mini“-Muskeln (Chen and Olson, 2001; Rau et al., 2001). Daraus ergab sich, dass *rolling pebbles* mutante Embryonen durchaus in der Lage sind, erste Fusionsschritte zu vollziehen. Ultrastrukturelle Untersuchungen ergaben zudem, dass in diesen Mutanten die Zell-Zell-Erkennung und, zu einem gewissen Anteil, auch die Zelladhäsion von statten gehen kann. Es werden allerdings keine „Präfusionskomplexe“ gebildet (Rau et al., 2001). Diese Beobachtungen führten zu einem Zwei-Stufen-Modell für die Myoblastenfusion, wobei die ersten Fusionen die Muskelzellen des „Precursor“-Stadiums bilden, eben diese 2 bis 3 kernigen Zellen, die in *rols* Mutanten als „Mini“-Muskeln beschrieben wurden. Alle nachfolgenden Fusionen innerhalb dieses Gewebes führen dann zu den zukünftigen Muskelfasern, was in *rols* Mutanten nicht mehr der Fall ist.

2.3 Das Exkretionssystem von *Drosophila melanogaster*: die Malpighischen Gefäße

2.3.1 Anlage und allgemeine Entwicklung der Malpighischen Gefäße

Schon im Embryonalstadium des voll verlängerten Keimstreifes wird die Rolling pebbles Isoform 6 (Rols6) in den Anlagen des anterioren und des posterioren Mitteldarms exprimiert. Zieht sich der Keimstreif zurück, wird eine weitere Expressionsdomäne in einem Primordium unmittelbar zwischen der posterioren Darmanlage und der Anlage des Enddarmes sichtbar. In diesem Bereich wird aus einer ektodermalen Zellpopulation ein Gewebe gebildet, welches später die Funktion des Exkretionsorganes übernimmt, die Malpighischen Gefäße. Während der Keimstreifverkürzung ab Stadium 11 proliferieren die Zellen dieser Anlage und es entstehen vier Knospen, die durch weitere Mitosen aller beteiligten Zellen verlängert werden, wodurch sich je zwei anterior und zwei posterior gerichtete Gefäße bilden. Die mitotischen Teilungen können in den anterioren Gefäßen länger beobachtet werden als in den posterioren, was zu einer größeren Zellzahl in diesen Gefäßen führt (Janning et al., 1986). Nach Abschluss der mitotischen Teilungen in Stadium 13 werden die Malpighischen Gefäße nur noch durch Zellreorganisation und Volumenwachstum verlängert. Ab dem Stadium 15 wird dann der stereotypische Verlauf der schlanken Gefäße durch den Embryo sichtbar (Skaer, 1993; Campos-Ortega and Hartenstein, 1985). Die Gefäße erstrecken sich in einer regelmäßigen Zellformation zu beiden Seiten des Darmes (Abbildung 2.3B) bis in die vorderen Abdominalsegmente. Im Stadium 16 erreichen sie in der Regel eine Position in Höhe des 1. Darmabschnittes in Abdominalsegment 2/3 (Abbildung 2.3C).

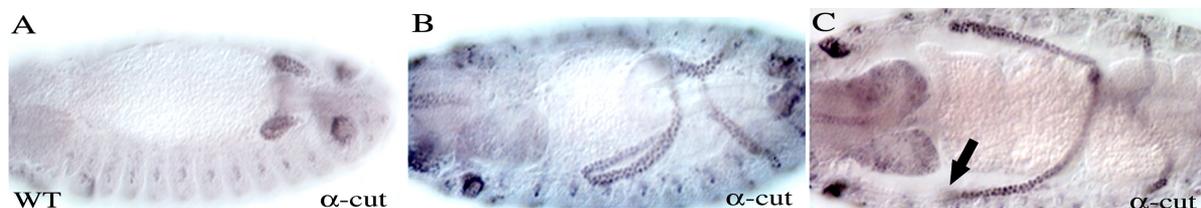


Abbildung 2.3: Entwicklung und Verlauf der Malpighischen Gefäße während der *Drosophila* Embryogenese

Anti-Cut Antikörperfärbung an Wildtyp Embryonen zur Darstellung der Malpighischen Gefäße. A) Während der Keimstreifverkürzung werden schon in Stadium 12/13 die zu kurzen paarigen Gefäßen elongierten Knospen sichtbar. B) Die Gefäße werden mittels Zellreorganisation elongiert und erreichen im Stadium 15 die anterioren Abdominalsegmente, bis sie schließlich ihre Endposition in Höhe des ersten Darmabschnittes in Stadium 16 erreicht haben (C) (Details siehe Abschnitt 5.1).

2.3.2 Die Architektur der Malpighischen Gefäße

Die klassische Lehrbuchdarstellung der Malpighischen Gefäße unterteilt die anterioren Gefäße im Wesentlichen in ein verdicktes Initialsegment, ein Hauptsegment und ein transitionales Segment, welches diese beiden Segmente verbindet. Für die posterioren Gefäße wurde nur ein Hauptsegment postuliert. Beide Gefäße münden über einen Ureter in den Enddarm. In einer Studie, in der mittels Gal4-vermittelter β -Galaktosidase Expression 700 P{Gal4} Enhancer-Trap Linien auf Reporterexpression in den Malpighischen Gefäßen getestet wurden, konnten weitere Subdomänen der klassischen Darstellung des Organs zugefügt werden (siehe Abbildung 2.4; Sözen et al., 1997). Dadurch wurde unter anderem gezeigt, dass auch die posterioren Gefäße in ein Initialsegment, ein Transitionalsegment und ein Hauptsegment unterteilt werden können. Auch führen die Gefäße über einen, dem Hauptsegment angegliederten, unteren Gefäßabschnitt in den Ureter, der ebenso in einen oberen und einen unteren Teilabschnitt gegliedert ist.

Die Malpighischen Gefäße setzen sich aus zwei verschiedenen Zelltypen zusammen, den Typ I Zellen, auch „Principal“-Zellen (PCs) genannt, und den „sekundären“ oder Typ II Zellen, so genannten „Stellate“-Zellen (SCs). Während die PCs für den allgemeinen Aufbau des Organs verantwortlich sind und den zahlenmäßigen Hauptanteil des Gewebes ausmachen, sind die SCs nicht über das gesamte Gefäß verteilt, sondern besetzen in definierter Anzahl nur Teilabschnitte. So wurden z.B. in den Initialsegmenten der anterioren Gefäße in der Regel jeweils sieben, in den Transitionalsegmenten sechs, und in den Hauptsegmenten ca. zwanzig SCs gezählt. Die PCs machen etwa das 3 1/2fache der SCs in diesen Organabschnitten aus. In den unteren Abschnitten der Gefäße sind hingegen keine SCs vertreten (siehe Abbildung 2.4; Sözen et al., 1997).

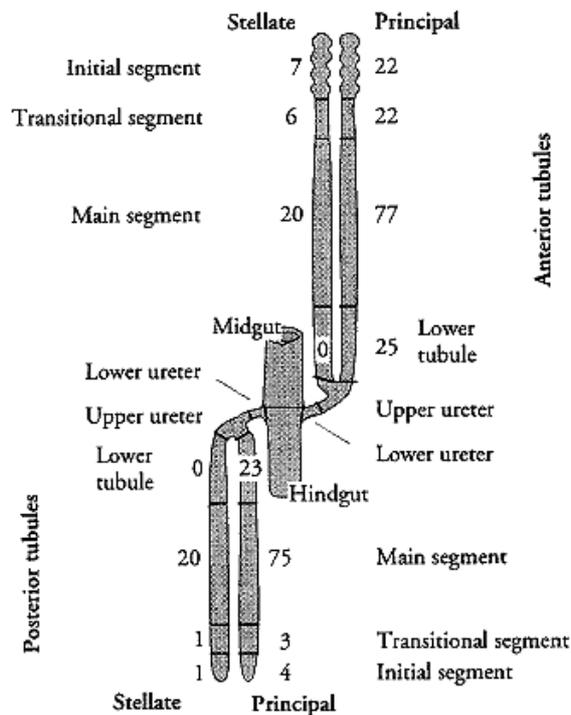


Abbildung. 2.4: Darstellung der Malpighischen Gefäße (nach Sözen et al., 1997)

Gezeigt werden die anterioren und posterioren Gefäße mit den jeweiligen Teilabschnitten. Für jeden Teilabschnitt wird die Anzahl der Typ I Zellen (Principal-Zellen; PCs) vergleichend der Anzahl der Typ II Zellen (Stellate-Zellen; SCs) gegenübergestellt.

Diese Beobachtung spiegelt gleichermaßen die physiologischen Funktionen beider Zelltypen in diesen Organabschnitten als funktionelle Einheiten bei der Sekretion in den Gefäßen wieder. Über die SCs wird der Wasserfluss und der Anionentransport (z.B. Chlorid-Ionen Transport) überwiegend im Hauptsegment, weniger im Transitional- und Initialsegment reguliert. Den PCs wird aufgrund nachgewiesener aktiver Kationentransporter die Regulierung von Wasserstoff-, Natrium- und Kalium-Ionen zugeschrieben (Dow et al., 1997; O'Donnel et al., 1996; O'Donnel et al., 1998; Denholm et al., 2003; zur Übersicht siehe Cagan, 2003). Da keine SCs in den unteren Bereichen des Gefäßes beim Übergang in den Ureter gefunden werden konnten, ist anzunehmen, dass sich die physiologische Aufgabe dieser Zellen auf die oben genannten Organabschnitte beschränkt. Ob die Principal-Zellen in allen Organabschnitten der gleichen physiologischen Aufgabe nachgehen, ist nicht bekannt.

Die Malpighischen Gefäße auf diese zwei Zelltypen, und diese auf die beschriebenen Funktionen zu reduzieren, könnte sich allerdings in Zukunft als unzureichend herausstellen. Aus oben angesprochenem Enhancer-Trap Screen wurde ersichtlich, dass es in beiden Populationen Zellgruppen gibt, die sich bezüglich ihres Repertoires an Transkriptionsfaktoren von dem ihrer Nachbarn unterscheiden, obwohl Zellform oder -struktur nicht unterscheidbar sind. Auch wurden in P{Gal4} Linien, welche

eindeutig SCs markierten, in den Initialsegmenten und Transitionalsegmenten zusätzlich „schlitzförmige“ Zellen gefunden, deren Existenz, Zellpopulationszugehörigkeit und Funktion bisher noch nicht weiter beschrieben wurden (Sözen et al., 1997). Diese Unterschiede könnten darauf beruhen, dass die gleichen Zelltypen diese Charakteristika zur Ausübung verschiedener Funktionen bei ihrer sekretorischen Aufgabe in den unterschiedlichen Organabschnitten ausgebildet haben.

2.4 Rolling pebbles im Kontext der beschriebenen und putativen Interaktionen der myogenen Faktoren

Um Rolling pebbles funktionell in den Kontext der Wechselwirkungen der aus der Myogenese bekannten Faktoren einzuordnen, ist es essentiell, mögliche Interaktionen der Faktoren untereinander zu untersuchen. Eine solche Interaktion konnte im Falle von Rolling pebbles für nur drei der bekannten Faktoren beschrieben werden. In Co-Immunoprecipitations-Experimenten zeigten Chen und Olson (2001) *in vitro* die Möglichkeit einer Protein-Protein-Interaktion zwischen Rols und Dumbfounded (Duf; Ruiz-Gomez et al., 2000). Beide Proteine werden in den Muskelfounder-Zellen exprimiert, wobei Duf als Mitglied der Immunglobulin Superfamilie (IgSF) membranständig lokalisiert ist. Auch für Myoblast city (Mbc) (Erickson et al., 1997) und Rols wurde eine physikalische Interaktion beschrieben (Chen and Olson, 2001). Trotz dieser Daten bleibt die Funktion des Multidomänen-Proteins Rolling pebbles allerdings bisher unklar.

Die für Rols vorhergesagten Proteindomänen lassen auf diverse Protein-Protein-Wechselwirkungen schließen, die unter anderem dazu führen, dass Rols von einer ubiquitären zytoplasmatischen Verteilung in Membrannähe zweier in Fusion begriffener Myoblasten lokalisiert wird. Wenig später soll auch an diesen Stellen der Membranabbau geschehen (Menon and Chia, 2001). Aufgrund seiner Proteindomänen, seiner Lokalisation innerhalb der fusionierenden Muskelzellen, des beschriebenen Phänotyps und im Hinblick auf die Interaktionen mit zwei wesentlichen Faktoren innerhalb dieses Entwicklungsprozesses, wird eine Funktion von Rolling Pebbles als Adapterprotein im Zytoskeletumbau diskutiert. Dem Rols Interaktionspartner Myoblast city (Vertebraten-Homolog: DOCK180) wird aufgrund der Kenntnisse aus Vertebratenmodellen und aus Zellkulturexperimenten eine wesentliche Rolle in der Zytoskelettorganisation und in Migrationsprozessen zugeschrieben (Brugnera et al., 2002; Cote et al., 2002; Gumienny et al., 2001; Reddien and Horvitz, 2000), während der Founderzell-spezifische Faktor Duf aufgrund seiner Zugehörigkeit zur Immunglobulin Superfamilie (IgSF) wesentlicher Bestandteil für die Kommunikation zwischen Founder-Zellen und fusionskompetenten Myoblasten in *Drosophila* zu sein scheint. Erste Hinweise zu dieser Annahme

ergaben sich aus dem Verhalten der unfusionierten Myoblastenpopulationen in Fusionsmutanten. In *rols* Mutanten konnte beschrieben werden, dass die unfusionierten Myoblasten Filopodien gezielt ausstrecken, um ihre Fusionspartner, die Founder-Zellen, zu erreichen (Menon und Chia, 2001). Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass sich auch in *duf* Mutanten die Myoblasten strecken und versuchen ihre Fusionspartner zu erreichen. Allerdings geschieht das nicht mit der gezielten Orientierung, wie in *rols* Mutanten. Die Filopodienausrichtung in *duf* mutanten Embryonen geschieht willkürlich (Menon and Chia, 2001). Diese Beobachtungen gaben weiteren Aufschluss über das Zusammenspiel der an der Myoblastenfusion beteiligten Faktoren und die Herkunft der Signale, welche nötig sind, um beide Zelltypen zueinander zu führen, wobei auf Founder-Zell-Seite Duf eines dieser essentiellen Signalmoleküle zu sein scheint.

Die Kommunikation der beiden Zelltypen bezieht auch eine mögliche Interaktion der beiden IgSF Proteine Dumbfounded und Stick and stones (Sns) (Bour et al., 2000) ein, welche noch nicht hinreichend geklärt wurde (zur Übersicht siehe Dworak and Sink, 2002). Das IgSF-Protein Sns weist eine sehr hohe Strukturhomologie zu Nephrin auf, welches aus anderen Organismen wie *C. elegans*, Maus, Ratte und auch aus menschlichen Zellen im Besonderen im Rahmen von Nierenerkrankungen gut bekannt ist. In *Drosophila* ist das Nephrin Homolog Hibris (Hbs) bekannt, welches strukturell hohe Ähnlichkeit zu Sns aufweist, und fast über den gesamten Zeitraum der Myoblastenfusion mit Sns coexprimiert wird (Artero et al., 2001; Bour et al., 2000; Dworak et al., 2001).

Im Falle des nicht-mesodermalen und nicht-fusionierenden Gewebes der Malpighischen Gefäße stellt sich eine der Myogenese gewissermaßen ähnliche Situation dar. Auch hier beteiligen sich zwei Zellpopulationen an der Organisation eines Gewebes. Diese zwei Zellpopulationen zeichnen sich durch die Expression einiger Faktoren aus, welche schon in der Myogenese als essentiell beteiligt beschrieben wurden (*Rols*, *Mbc*, *Hbs*), wobei sie Prozesse, wie Zellerkennung, Zelladhäsion, Migration und Zytoskelettorganisation, bzw. -reorganisation und -umbau organisieren und bewerkstelligen sollen, die sowohl in der Myogenese, wie auch in der Entwicklung der Malpighischen Gefäße grundlegende Mechanismen darstellen.

2.5 Problemstellung

Die differentielle Transkriptverteilung der zwei *rolling pebbles* Transkripte wurde anhand spezifischer Sonden, die jeweils gegen den spezifischen Anteil der cDNAs gerichtet waren, in *in situ* Hybridisierungs-Experimenten beschrieben (Rau et al, 2001). Im Falle des kurzen *rols* Transkriptes (*rols6*) lagen bisher keinerlei Daten über die regulativen genomischen Regionen vor, welche für die Expression des Transkriptes in den beschriebenen Geweben (Pharynx, Endoderm und Malpighische Gefäße) essentiell sind. Ebenso konnte bisher kein Translationsprodukt *in vivo* beschrieben werden, da mittels eines Peptidantikörpers, der gegen den gemeinsamen C-terminalen Bereich beider Proteine (Rols6 und Rols7) gerichtet ist, nur die mesodermale Proteinverteilung eindeutig verifiziert und detektiert werden konnte. Es gelang bisher nicht, auch das kürzere Protein mit diesem Antikörper zu detektieren. Auch waren die Funktionalität des zu erwartenden Proteins und die Auswirkungen einer Mutation, die zu einer verkürzten Form des Proteins oder zu einer Nullsituation führen würde, auf die Entwicklung und Funktionstüchtigkeit der betroffenen Gewebe während der *Drosophila* Embryogenese nicht bekannt.

Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist, den für die Expression des Transkriptes *rols6* essentiellen genomischen Promoterbereich mittels Promoterkonstrukt-Studien zu ermitteln und die Regulationseinheiten für die gewebespezifische Verteilung des Transkriptes zu beschreiben.

Des Weiteren sollte geprüft werden, welche phänotypischen Auswirkungen ein Verlust von *rols6* auf die betroffenen Gewebe hat. Den molekularen Zugang zu einem solchen Projekt gestattete eine P-Element-Insertionslinie 64 bp stromaufwärts des Transkriptionsstartes von *rols6*, wodurch es möglich war, mittels Remobilisation des P-Elementes Deletionen im zuvor beschriebenen Promoterbereich des Gens zu generieren.

Durch die Ansätze zur Regulation und der Suche nach Regulator- und potentiellen Aktivatorbindestellen im Promoterbereich, durch Reportergen-Expressionsstudien und die phänotypische Charakterisierung mittels P-Element-Mutagenese generierter *rols6* spezifischer Mutanten, sollte der Nachweis eines funktionellen, real existierenden Proteins Rols6, im besonderen im renalen Exkretionssystem von *Drosophila melanogaster*, erbracht werden. Dabei sollten auch die Hinweise auf die Funktion des Proteins und potentielle genetische Interaktionen im nicht-mesodermalen Gewebe untersucht werden, die sich aus der beschriebenen Interaktion für Rols7 und Myoblast city in der Myogenese ergaben.

3. Material

3.1 Geräte

Digitalkamera	Polaroid
Fotomikroskop	Axiophot, Zeiss
Kapillarziehgerät	Vertical Pipette Puller 720, Kopf
Konfokales Laser Scan Mikroskop	Leica TCS SP2
Kühlzentrifuge	Heraeus Megafuge 1.0 R
Magnetrührer	Variomag Mono, H+P Labortechnik, Oberschleißheim
Mikroinjektionsapparatur	5242 Hemle ZK 401, Eppendorf, Hamburg
Mikromanipulator	Leitz
PCR-Maschine	Personal Cyclor, Biometra
Photometer	Ultrospec 3000, Pharmacia, Freiburg
Schüttler	WT-12, Biometra, Göttingen
Stereomikroskop	Stemi SV 6, Zeiss
Thermoblock	Driblock DB.2A, Techne, Cambridge
Tischzentrifuge	Heraeus, Biofuge
UV-crosslinker	UV-Stratalinker 2400, Stratagene

3.2 Chemikalien und andere Materialien

Acrylamid	Serva, Heidelberg
Agarose	Invitrogen/Gibco, Karlsruhe
Ampicillin	Appligene, Heidelberg
APS	Merck, Darmstadt
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
DAB	Sigma, Taufkirchen
Elutip-d-Säulen	Schleicher & Schüll, Dassel
Ethidiumbromid	Sigma, Taufkirchen
Formamid	Roth, Karlsruhe
Hybond N	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Hybond P	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
NBT	Roche, Mannheim
TEMED	Sigma, Taufkirchen
Triton X 100	Roth, Karlsruhe
Tween 20	Roth, Karlsruhe
Voltalef-Öl	Lehmann, Voss & Co, Hamburg
X-Gal	Roth, Karlsruhe

Weitere, nicht aufgeführte, Chemikalien und Nährmedien wurden von folgenden Firmen bezogen: Fluka (Taufkirchen), Invitrogen/Gibco (Karlsruhe), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) und Sigma (Taufkirchen).

3.3 Enzyme

Alkalische Phosphatase (CIP)	Roche, Mannheim
Klenow Enzym	Boehringer, Mannheim
Restriktionsendonukleasen	Roche, Mannheim Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
RNase A	Roche, Mannheim
T4-DNA-Ligase	Roche, Mannheim
<i>Taq</i> DNA-Polymerase	Qiagen, Hilden Sigma, Taufkirchen

3.4 Molekularbiologische Reagenzien und Reagenziensätze

DIG DNA Labeling and Detection Kit	Roche, Mannheim
GFX PCR, DNA and Gel Band Purification Kit	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Jetsorb	GENOMED, Bad Oeynhausen
Jetstar Plasmid Kit 2.,0	GENOMED, Bad Oeynhausen
Mass Ruler DNA-Ladder, Mix	MBI fermentas, St. Leon-Roth
TOPO TA Cloning Kit	Invitrogen, Karlsruhe
Vectastain Elite ABC Standart Kit	Vector Laboratories, Burlingame, USA

3.5 Antikörper und Seren

anti- β -Galaktosidase-Antikörper (polyklonal aus Kaninchen)	Promega, Heidelberg
anti- β -Galactosidase-Antikörper (polyklonal aus Maus)	Promega, Heidelberg
anti- β 3-Tubulin-Antikörper (polyklonal aus Kaninchen)	affinitätsgereinigtes Serum, A. Holz, Gießen; Leiss et al. 1988
anti-Cut-Antikörper (monoklonal aus Maus)	Developmental Studies Hybridoma Bank (DSHB), Iowa, USA
anti-Digoxigenin-AP, Fab-Fragmente	Roche, Mannheim
anti-Fasciclin II (monoklonal aus Maus)	Developmental Studies Hybridoma Bank (DSHB), Iowa, USA
anti-Kaninchen-Antikörper, Cy 2 gekoppelt (aus Ziege)	Dianova, Hamburg

anti-Kaninchen-Antikörper, biotinyliert (aus Ziege)	Vector Laboratories, Burlingame, USA
anti-Maus-Antikörper, biotinyliert (aus Ziege)	Vector Laboratories, Burlingame, USA
anti-Maus-Antikörper, Cy 3 gekoppelt (aus Ziege)	Dianova, Hamburg
anti-pentaHis (aus Maus)	Qiagen
anti-Teashirt (polyklonal aus Kaninchen)	Stephen Cohen, EMBL, Heidelberg
Pferdeserum	Vector Laboratories, Burlingame, USA
Ziegenserum	Vector Laboratories, Burlingame, USA

3.6 Bakterienstämme (*Escherichia coli*)

Für die Transformation mit rekombinanten Plasmiden wurde folgender *E-coli*-Stamm verwendet:

DH5 α *supE44, Δ lacU169(ϕ 80lacZ Δ M15), hsdR17, recA1, endA1, gyrA96, thi-1, relA1*

Für die bakterielle Expression von Histidin-gekoppelten Fusionsproteinen mit dem pBAD/*HisA*-System (Invitrogen) wurde folgende *E-coli*-Stämme verwendet:

LMG194 F- Δ lacX74 gal E thi rpsL Δ phoA (Pvu II) Δ ara714 leu::Tn10
TOP 10 F⁻ mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) ϕ 80lacZ Δ M15 Δ lacX74 deoR racA1
araD139 Δ (araA-leu)7679 gal/U gal/K rpsL endA1 nupG

3.7 Plasmide

pBAD/ <i>HisA</i>	Expressionsvektor für <i>His</i> -tagged Fusionsproteine in <i>E-coli</i>
pBluescript II KS+	Klonierungsvektor, Stratagene, Heidelberg
pChab Δ Sal	Transformationsvektor für <i>Drosophila melanogaster</i> , Thummel et al., 1988
pCR II-TOPO	Klonierungsvektor, Invitrogene, Karlsruhe
pH-Pelican	Transformationsvektor für <i>Drosophila melanogaster</i> , Barolo et al., 2000
p π 25.7wc	Helferplasmid, transposasekodierend

3.8 Synthetische Oligonukleotide

Folgende synthetische Oligonukleotide wurden als sequenzspezifische Primer für PCR-Versuche oder zur Sequenzierung eingesetzt. Artifiziiell eingefügte

Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen sind fett hervorgehoben. Synthetisiert wurden die Oligonukleotide von der Firma MWG-Biotech, Ebersberg.

BgIII-vorATG-st	5'- AGCT AGATCT GTGTATATACCGTATACCAGTGCCG -3'
Ex1-rols6	5'- CGCGAATCGGAAAACGCATTCTACG -3'
LD II SP	5'- ACTGCCAGATCGACGACCGGTTG -3'
LD II SP2	5'- GGCACAAACAGCGCTAAGGA -3'
rols6Ex2-BgIII	5'- AGCT AGATCT CTGCAACTATTTCCACTGCC -3'
rols6-pBAD-3'	5'- ACTG GAATTC GCCAGATCGACGACCGGTTG -3'
rols6-pBAD-5'	5'- ACTG GAGCTC TTCCCACTAACCAACCGCTC -3'
ROSH P I	5'- ACTG GAATTC CTCGCCAAGATACGAGCCAATC -3'
ROSH P I+610	5'- GTTGAATTCAATGTAAAACAGTGATATAAG -3'
ROSH P I-280	5'- ACTG GAATTC CCCTGCTGAATAGTGTTTCATGG -3'
ROSH P I-410	5'- GACAACGCGATAAGGGACAGTTCATC -3'
ROSH P I-759	5'- ACTG ACTAGT CTGCCTAAGGGGTGTAGATTTG -3'
ROSH P I-835	5'- ACGACAGCGAAGCGTGAATGAATTTCC -3'
ROSH P II	5'- GACT ACTAGT GCGGTACGCTTGCGCGAGC -3'
ROSH P(e)	5'- AGTTGCGGCCGCTCAATTTATTCAGAC -3'
vorATG-st	5'- GTGTATATACCGTATACCAGTGCCG -3'
weit vor Ex1-st	5'- GAGTGATAGTGATAGTGGAAGT -3'
Flag5	5'- AGCTTC GAATTC GATTATAAGGATGATGATGATAAGCTA -3'
Flag3	5'- AGCTTAGGTTATCATCATCATCCTTATAATC GAATTC GA -3'

3.9 Sequenzierungen

Sequenzierungen wurden von der Firma Seqlab GmbH, Göttingen durchgeführt.

3.10 Stammhaltung und Zucht von *Drosophila melanogaster*

In der vorliegenden Arbeit wurden folgende Fliegenstämme verwendet. Angegeben werden sowohl die Kurzbezeichnungen, als auch die genotypischen Bezeichnungen, der Nomenklatur nach Lindsley und Zimm (1992) folgend. Weitere Informationen zu den Stämmen können im *Bloomington Drosophila Stock Center* (Indiana University, Bloomington, Indiana, USA) unter www.flystocks.bio.indiana.edu abgerufen werden.

Balancerstämme

CSTM	<i>w*</i> ; <i>CyO/Sp</i> ; <i>Sb/Ubx</i> Multimarkerstamm zur kreuzungsgenetische Lokalisation von P-Elementen, (Holz, A., Gießen)
------	--

w; Dr/TDLZ, Sb	w*; Dr/TM3, Sb-deformed LacZ Blau-Balancerstamm mit Marker für Chromosom 3
w; lf/CyO	w*; Kr ^{Jf-1} /CyO-hgLacZ Blau-Balancerstamm mit Markern für Chromosom 2, (Affolter M., Basel)

Defizienzen

U54650 (BL-2991)	Df(3L)BK9 ru[1] red[1] cv-c[1] Sb[sbd-1] e[1]/TM3, Sb[1] Bruchpunkte: 68E2-3; 69A1-2 (Leicht und Bonner, 1988)
------------------	--

P-Element-Insertionen, Mutanten

BL-11073 (<i>dve</i> -Mutante)	cn[1] P{ry[+t7.2]=PZ}dve[01738]/CyO; ry[506]
BL-11745 (<i>punt</i> -Mutante)	ry[506] P{ry[+t7.2]=PZ}put[10460]/TM3, ry[RK] Sb[1] Ser[1]
BL-12088 (<i>trl</i> -Mutante)	w[1118]; P{w[+mC]=lacW}Trl[s2325]/TM3, Sb[1]
BL-1601 (<i>kriippel</i> -Mutante)	cn[1] bw[1] sp[1] Kr[2]/SM1
BL-2485 (<i>srp</i> -Mutante)	ru[1] h[1] th[1] st[1] cu[1] srp[3] sr[1] e[s] ca[1]/TM3, Sb[1] Ser[1]
BL-3103 (<i>grain</i> -Mutante)	ru[1] h[1] th[1] st[1] grn[7L] cu[1] sr[1] e[s] ca[1]/TM3, Sb[1] Ser[1]
BL-3494 (<i>kriippel</i> -Mutante)	cn[1] bw[1] Kr[1]/SM6a, bw[k1]
EP(3)3330	P[EP]-Elementinsertion auf Chromosom 3, 68 F (Rorth, 1996)
rols ^{xx117} (<i>rols</i> -Mutante)	w; rols ^{xx117} /TM3, ftz-LacZ; EMS induziertes <i>rols</i> Allel (zur Verfügung gestellt von A. Michelson)
BI-1671 (<i>mbc</i> -Mutante)	w/w;red ¹ e ¹ mbc ^{c1} /TM3, Sb ¹ Ser ¹

Sonstige

white	w ¹ , Transformationsstamm, Arbeitsgruppe Renkawitz-Pohl
-------	---

4. Methoden

I. Arbeiten mit *Drosophila melanogaster* und histologische Methoden

4.1 Fliegenzucht und Stammhaltung von *Drosophila*

Zuchtmedium:	90 g Agar agar 1 kg Maismehl 180 g Trockenhefe 1 kg Malzextrakt 230 g Zuckerrübensirup 120 ml 20 % Nipagin in 70 % Ethanol Ad 12 L H ₂ O
--------------	---

Die Fliegenzucht erfolgte in Plastikröhren, welche zu circa einem Viertel mit Zuchtmedium gefüllt waren. Das Zuchtmedium diente als Nahrungsquelle für die sich darin entwickelnden Larven. Zusätzlich eingestreute Trockenhefe diente als Stimulationsmittel zur Eiablage für die adulten Weibchen. Verschluss wurden die Röhren mit Ceaprenstopfen. Gehalten wurden die Fliegen in Klimakammern bei 18 °C bzw. 24 °C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 70 % in Abhängigkeit von der gewünschten Generationszeit von 10-21 Tagen. Umgesetzt auf frische Zuchtröhrchen wurden die Stämme in einem Rhythmus von 7 bzw. 14 Tagen.

4.2 Sammeln von Fliegenembryonen

Apfelsaft-Agar:	13,5 g Agar agar 6,25 g Zucker 1 g Nipagin 125 ml Apfelsaft Ad 500 ml H ₂ O
-----------------	--

Zur Eiablage wurden die Fliegen in genügender Menge in kleinen, etwa 1-1,5 cm hoch mit Apfelsaft-Agar befüllten Zuchtflaschen gehalten. Je nach gewünschter Entwicklungszeit der Embryonen wurden die Fliegen zur Neuablage auf frische Flaschen umgesetzt.

4.3 P-Element Keimbahntransformation von *Drosophila*

(Rubin & Spradling, 1982; Spradling & Rubin, 1982)

a) Vorbereitung der Embryonen

Die für die Injektionsprozedur vorgesehenen Embryonen wurden von „white“-Fliegen in Intervallen von 15-20 Minuten in einem 18 °C klimatisierten Raum gewonnen. Die Eier wurden in 0,7 %iger NaCl-Lösung gewaschen, anschließend in einer Klorix-Lösung (1:1 mit H₂O) entchorionisiert und wiederum mit 0,7 % NaCl gewaschen. Auf einem Apfelsaftagar-Block wurden die Embryonen dann mit Hilfe einer Präpariernadel in einer Reihe so ausgerichtet, dass der anteriore Pol zur Blockkante wies. Anschließend wurden die aufgereihten Embryonen durch Auflegen eines mit Klebstoff (in 10 ml Heptan gelöster Klebstoff von 10 cm Tesa-Packband) bestrichenen Deckglases unter leichtem Druck fixiert. Die Embryonen lagen nun mit dem posterioren Pol zur Deckglaskante orientiert. Das Deckglas mit den Embryonen wurde je nach Luftfeuchtigkeit des klimatisierten Raumes für 5-10 Minuten in einem Exikator über Kieselgel getrocknet, um den Innendruck der Embryonen zu verringern. Um ein Austrocknen der Embryonen zu verhindern wurde sie mit Voltalef-Öl überschichtet.

b) Mikroinjektion

10 x Injektionspuffer

1 mM NaHPO₄ (pH 7,4)
50 mM KCl

Die zu injizierende DNA wurde über Elutip-d Säulen aufgereinigt (siehe 4.14.3) und 10 µg DNA in einem Injektionsansatz mit 1/10 Volumenanteilen 10 x Injektionspuffer und dem Helferplasmid pπ25.7wc (0,5 µg/µl) in einem Gesamtvolumen von 20 µl aufgenommen. Anschließend wurde dieser Ansatz für 30 min. bei 13000 UpM und 4 °C zentrifugiert und eine Borosilikat-Glaskapillare (Ø 1,2 mm), welche in einem Kapillargerät manuell gezogen wurde, mit 1 µl des Injektionsansatzes befüllt. Nachdem das Deckglas auf dem Mikroskopteller befestigt war, wurde die Nadel in die Mikromanipulationsapparatur eingespannt und durch leichtes Anstoßen an das Deckglas aufgebrochen. Nach Einführen der Nadel in den posterioren Teil der Embryonen wurde unter Druck der Injektionsansatz in den Embryo eingespült. Die Embryonen, bei denen eine erfolgreiche Transformation erfolgen sollte, durften sich noch nicht im Blastodermstadium befinden, da in diesem Stadium die Polzellen schon gebildet sind.

Nach der Injektion wurden die Deckgläser auf einen Apfelsaftagar-Block gelegt und in einer mit Apfelsaft-Agar gefüllten Petrischale über einem Wasserbecken platziert. Nach 24 Stunden Entwicklungszeit bei 25 °C schlüpfen die Larven, welche mit einer

Präpariernadel abgesammelt und auf mit Zuchtmedium gefüllte Fliegenflaschen transferiert wurden. Bis zum Schlupf der adulten Fliegen wurden die Flaschen bei 25 °C inkubiert und, falls notwendig, tröpfchenweise gewässert.

c) Selektion der transgenen Fliegenlinien

(Klemez et al, 1987)

Als Indikator für eine erfolgreiche Injektion und nachfolgende Integration des Transgens ins Fliegengenom, diente eine Veränderung der Augenfarbe in den Folgegenerationen der aus b) geschlüpften Fliegen. Dies wurde anhand von virginellen Einzelkreuzungen der potentiell transformierten Fliegen gegen den Stamm, in den die Injektion erfolgte, ersichtlich, weil das injizierte P-Element ein *white*⁺ Gen als Marker trug. Die aus diesen Kreuzungen hervorgehenden, orange- bis rotäugigen Fliegen konnten jeweils als individueller transgener Stamm etabliert werden.

4.4 Behandlung und Vorbereitung von Fliegenembryonen für Antikörperfärbung und *in situ*-Hybridisierung

Embryonen, die nach der gewünschten Entwicklungszeit gesammelt wurden (siehe 4.2) wurden für Antikörperfärbungen und *in situ*-Hybridisierungen gleichermaßen vorbehandelt. Die Wahl der Fixierung richtete sich nach den Ansprüchen des einzusetzenden Antikörpers.

a) Entchorionisierung und Formaldehyd-Fixierung von Embryonen

NaCl-Triton-Lösung (TNX)	0,7 % (+ 0,02 % Triton X-100)
PBS	130 mM NaCl 7 mM Na ₂ HPO ₄ 3 mM NaH ₂ PO ₄ , pH 7,4
PBT	0,1 % Tween 20 in PBS
F-PBS	4 % Paraformaldehyd in PBS

Die Embryonen wurden mit NaCl-Triton-Lösung (TNX) von den Ablagegefäßen abgesammelt, in feinmaschige Netze überführt und gewaschen. Anschließend wurden sie in einer Klorix-Lösung (1:1 mit H₂O) so lange gespült, bis das Chorion sich aufgelöst hatte. Nach der Dechorionisierung wurde die Klorix-Lösung durch mehrmaliges Waschen mit TNX entfernt. Die entchorionisierten Embryonen wurden in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und in 500 µl F-PBS und 500 µl Heptan

für 20-30 min. fixiert. Die Fixierung erfolgte bei leichter Bewegung auf einem Schüttler an der F-PBS-Heptan Phasengrenze. Anschließend wurden beide Phasen abgenommen und zur Entfernung der Restanteile von F-PBS zweimalig mit 500 µl Heptan gewaschen. Nach Zugabe eines Heptan-Methanol Gemisches (1:1) wurden die Embryonen für circa. 1 min. kräftig geschüttelt. Dadurch wurde die Vitellinmembran entfernt. Devitellinisierte Embryonen sanken dann zum Gefäßboden. Der Überstand und die nicht absinkenden Embryonen wurden abgenommen und die fixierten Embryonen dreimalig mit 1 ml Methanol gewaschen. Längerfristige Lagerung der so behandelten Embryonen erfolgte in Methanol bei 4 °C.

b) Heißfixierung von Embryonen

Entchorionisierte Embryonen wurden aus der TNX-Waschlösung für 15 Sekunden in 5 ml kochend heißes PBT überführt. Anschließend wurden sie mit eiskaltem PBT (30-40 ml) übergossen und auf Eis gelagert. Die Devitellinisierung erfolgte anschließend wie in a) beschrieben.

4.5 Antikörperfärbung an fixierten *Drosophila*-Embryonen

4.5.1 Antikörperfärbung nach der „Avidin-Biotin-Complex“ Methode

(Vectastain, ABC Kit Elite PK-100 Standart; Lawrence & Johnston, 1989)

Die Antikörperfärbung unter Verwendung der ABC-Methode (Avidin-Biotin-Complex; Vectastain) basiert auf dem Prinzip, dass zunächst ein unmarkierter Antikörper spezifisch an ein Antigen gebunden wird. Dieser wird nach Inkubation mit einem biotinylierten Zweitantikörper erkannt und gebunden. Durch die zusätzliche Anlagerung eines Komplexes aus Avidin und biotinylierter Meerrettichperoxidase an die Biotinanteile des Zweitantikörpers kann die Peroxidase die Reduktion von Wasserstoffperoxid katalysieren, wodurch eine Oxidation des Chromogens 3,3'-Diaminobenzidin-Tetrachlorid (DAB) ermöglicht wird. Diese Reaktion führt zu einem sichtbaren braunen Farbumschlag, der durch Zugabe von Nickelchlorid (NiCl₂) verstärkt werden kann und in einer schwärzlichen Färbung resultiert.

Die in Methanol gelagerten fixierten Embryonen wurden zur Rehydrierung in PBT überführt und 20 min. durch mehrmaliges Wechseln des PBTs unter leichtem Schwenken gewaschen. Anschließend erfolgte die Erstantikörperinkubation in einem Volumen von 300-500 µl der erforderlichen Antikörperverdünnung bei 4 °C unter leichtem Schwenken über Nacht. Nach genügender Inkubationszeit wurde die Erstantikörperlösung abgenommen und die Embryonen unter mehrmaligen Wechseln in PBT 40-60 min. bei RT gewaschen. Nach Entfernen des PBTs erfolgte

eine einstündige Inkubation der Embryonen in 0,2 % Ziegen- bzw. Pferdeserum in 0,5 ml PBT (je nach Herkunft des Zweitantikörpers). Dadurch sollten unspezifische Bindungen des Zweitantikörpers abgeschwächt werden. Während dieses Schrittes wurde der Zweitantikörper (1:20 in PBT) an Wildtyp-Embryonen präadsorbiert. Die anschließende Zweitantikörperinkubation erfolgte in der gewünschten Endverdünnung (1:500 in PBT) unter leichtem Schwenken bei RT für 2 Stunden. Nach diesem Inkubationsschritt wurden die Embryonen vier 10minütigen Waschschritten in PBT unterzogen. Währenddessen wurde der Komplex aus Avidin (10 µl Lösung A) und biotinylierter Meerrettichperoxidase (10 µl Lösung B) in 500 µl PBT pro Färbung angesetzt und 30 min. bei RT vorinkubiert. Anschließend wurde dieser Farbkomplex auf die Embryonen gegeben und wirkte 1 Stunde bei RT unter leichtem Schwenken auf diese ein. Nach Verwerfen des A-B Komplexes wurden die Embryonen unter mehrmaligen Wechseln des PBTs für ca. 30 min. gewaschen. Um die Färbereaktion durchzuführen, wurden die Embryonen in silikonisierte Blockschälchen überführt. Anschließend wurden zu einem Volumen von 500 µl PBT pro Färbung 5 µl NiCl₂ (1% w/v) und 10 µl DAB (10 mg/ml) zu den Embryonen gegeben. Gestartet wurde die Färbereaktion mit 10 µl H₂O₂ (0,3 % v/v). Die Färbung wurde unter dem Binokular kontrolliert und bei genügender Intensität durch mehrmaliges Waschen mit PBT gestoppt. Zur Herstellung von Dauerpräparaten wurden die gefärbten Embryonen über eine Alkoholreihe (40 %, 70 %, abs. EtOH) dehydriert und nach mehrmaligen Waschen in absolutem Ethanol bei 4 °C gelagert und anschließend in Epon eingebettet (siehe 4.7.1).

4.5.2 Antikörperfärbung mit fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Antikörpern

Die in Methanol gelagerten fixierten Embryonen wurden, wie in 4.5.1 beschrieben, behandelt. Sie wurden rehydriert, in PBT gewaschen, mit dem entsprechenden Erstantikörper(n) über Nacht inkubiert und anschließend bis zu 1 Stunde in PBT gewaschen. Ebenso wurde die Inkubation mit den entsprechenden Seren durchgeführt. Nach dem einstündigen Behandeln mit Serum wurde den Embryonen der/die entsprechenden Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Zweitantikörper zugegeben (anti-Kaninchen- Cy² (1:20) und anti-Maus- Cy³ (1:100) Antikörper). Die Inkubation der Embryonen mit diesen Antikörpern erfolgte für 2 Stunden bei RT im Dunkeln. Ebenso wurden die sich anschließenden Waschschriffe (1 Stunde bei RT in PBT) im Dunkeln durchgeführt. Nach ausreichendem Waschen wurden die Embryonen abgedunkelt in PBT bei 4 °C gelagert oder direkt in Fluoromount G eingebettet (siehe 4.7.2).

4.6 *In situ* Hybridisierung an fixierten *Drosophila*-Embryonen mit DIG-markierten DNA-Sonden

(O'Neil & Bier, 1994, modifiziert)

20 x SSC	3 M NaCl 0,3 M Na ₃ Citrat (pH 7,0)
Hybridisierungslösung (HS)	50 % (v/v) Formamid 25 % (v/v) 20 x SSC (pH 7,0) 0,1 % (v/v) Heparin (50 mg/ml) 0,01 % (v/v) Tween 20
Färbepuffer	100 mM NaCl 100 mM Tris/HCl (pH 9,5) 50 mM MgCl ₂ 1 mM Levamisol 0,01 % (v/v) Tween 20

Für *in situ*-Hybridisierungen wurden Embryonen eingesetzt, welche, wie in 4.4 a) beschrieben, vorbehandelt und in Methanol gelagert wurden. Zur Rehydrierung wurden sie in PBT überführt und für 20 min. gewaschen. Anschließend wurde eine etwa 20minütige Nachfixierung in 4 % Paraformaldehyd in PBS (F-PBS) durchgeführt. Daran schlossen sich 3-4 Waschschrte a` 10 min. in PBT an. Die nachfixierten Embryonen wurden dann für die Hybridisierung mit der DIG-markierten Sonde wie folgt sukzessive äquiliert. Es wurde 10 min. in 1 ml einer 1:1 Lösung aus PBT und Hybridisierungslösung (HS), anschließend für 10 min. in 1 ml HS bei RT inkubiert. Daran schloss sich eine Phase der Prähybridisierung in 100 µl vorgewärmter HS bei 45 °C im Heizblock an. Diese wurde mindestens 2 Stunden, in der Regel aber über Nacht, durchgeführt. Sollte der Hybridisierungsvorgang gestartet werden, wurde eine 1:10 Verdünnung der Sonde für ca. 3 Minuten aufgekocht, auf Eis gelagert und 1-5 µl der Sonde (je nach Qualität der Markierung, siehe Spot Test, 4.20.2) in 100 µl Hybridisierungslösung auf die Embryonen gegeben. Der Hybridisierungsvorgang dauerte bis zu 48 Stunden, mindestens aber 24 Stunden, bei 45 °C im Heizblock. War der Hybridisierungsvorgang abgeschlossen, wurden die Embryonen bei 45 °C erst für 30 min. in HS, dann in zwei 20minütigen Äquilibrierungsschritten (60 % HS/40 % PBT; 20 % HS/80 % PBT) wieder in PBT überführt und bei RT für 30 min. in PBT gewaschen. Währenddessen wurde der DIG-detektierende Antikörper (anti-DIG-AP, Fab-Fragmente; Roche) auf Wildtyp-Embryonen präadsorbiert (1:100 in PBT). Die folgende Antikörperinkubation wurde bei RT für mindestens 1 Stunde unter leichtem Schwenken durchgeführt. Dabei wurde der Antikörper in einer Endverdünnung von 1:2000 auf die Embryonen gegeben. Nach der Antikörperinkubation erfolgten vier 15minütige Waschschrte in PBT, anschließend wurden die Embryonen für 30 min. in 1 ml Färbepuffer geschwenkt. Die DIG-Signal Detektion erfolgte in 1 ml Färbepuffer unter Zugabe von

4,5 µl NBT und 3,5 µl X-Phosphat in silikonisierten Blockschälchen. Die Ansätze wurden abgedunkelt, die Intensität der Färbung regelmäßig unter dem Binokular überprüft und die Färbung bei ausreichender Intensität durch mehrmaliges Waschen mit PBT gestoppt. Zur Herstellung von Dauerpräparaten wurden die Embryonen über eine aufsteigende Alkoholreihe entwässert, in absolutem Ethanol bei 4 °C gelagert und anschließend in Epon eingebettet.

4.7 Herstellung von Dauerpräparaten

4.7.1 Einbetten in Epon

Epon	51,5 % (w/v) Epon 812 28 % (w/v) Epon Härter DDSA 19 % (w/v) Epon Härter MNA 1,5 % (w/v) Eponbeschleuniger DMP 30
------	--

Zur Anfertigung von Dauerpräparaten erfolgte die Einbettung von Embryonen aus Antikörperfärbungen und *in situ*-Hybridisierungen in Epon. Dazu wurden die Embryonen direkt aus absolutem Ethanol auf einen Tropfen Epon getropft. Nach luftblasenfreiem Auflegen eines Deckglases wurden die Präparate zur Aushärtung des Epons für mehrere Tage bei 60 °C gelagert.

4.7.2 Einbetten in Fluoromount G

Mit fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Antikörpern behandelte Embryonen wurden in wässriger Lösung gelagert (siehe 4.5.2). Diese Embryonen wurden direkt auf einen Tropfen des speziell für Fluoreszenzfärbungen entwickelten Einbettungsmedium Fluoromount-G™ der Firma Southern Biotechnology Associates, Inc, (Birmingham, USA) auf einem Objektträger transferiert. Die Präparate wurden anschließend abgedunkelt bei 4 °C gelagert.

4.8 Histochemischer X-Gal Aktivitätsnachweis an larvalen Geweben

Fixierlösung	0,1 M NaPO ₄ (pH 7,4) 0,7 % (v/v) Glutardialdehyd
X-Gal-Färbelösung	10 mM NaPO ₄ (pH 7,4) 150 mM NaCl 1 mM MgCl ₂ 3,1 mM K ₃ [Fe(CN) ₆] 3,1 mM K ₄ [Fe(CN) ₆] 0,3 % (v/v) Triton X-100
X-Gal	100 mg X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-beta-D-galactosid) in 1,25 ml Dimethylformamid (DMF)

Für den Nachweis von β -Galaktosidase Aktivität in larvalen Geweben wurden in PBS gewaschene Larven des 3. Stadium (3^{rd} instar larvae) für einige Sekunden in $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ heißes Wasser getaucht und so abgetötet. Die so behandelten Larven strecken sich im Moment der Wasserberührung und können so leichter präpariert werden. Anschließend wurden sie in einem Tropfen PBS auf einem Objektträger oder in einem mit PBS gefüllten Blockschälchen so präpariert, dass im Folgenden alle Gewebe gut umspült werden konnten. Die so behandelten Larven wurden in 1-2 ml Fixierlösung transferiert und für ca. 20 min. bei RT fixiert. Nach der Fixierung wurden sie mit PBS mehrfach gewaschen und in 1 ml Färbelösung unter Zugabe von $25\text{ }\mu\text{l}$ einer 8 %igen X-Gal-Lösung (in DMF) transferiert. Die Färbereaktion wurde unter Lichtabschluss und bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ so lange durchgeführt, bis die Färbung ausreichend intensiv bewertet wurde. Durch mehrfaches Waschen in PBS wurde die Reaktion gestoppt und die Larven bzw. die gefärbten Gewebe auf Objektträgern in 50 % Glycerin überführt, eingedeckelt und bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

II. Präparation und Analyse von DNA

4.9 Herstellung chemisch kompetenter Bakterien

(Sambrook et al., 1989)

SOB-Medium	2 % (w/v) Bactotrypton 0,5 % (w/v) Hefeextrakt 10 mM NaCl 2,5 mM KCl 10 mM MgCl_2 10 mM MgSO_4
RF1	10 mM RbCl 50 mM MnCl_2 30 mM KCL 10 mM CaCl_2 15 % (v/v) Glycerin
RF2	10 mM MOPS (pH 6,8) 10 mM RbCl 75 mM CaCl_2 15 % (v/v) Glycerin

Zur Herstellung von Rubidiumchlorid-dauerkompetenten Zellen wurden 250 ml SOB-Medium mit 2,5 ml einer frischen *E. coli*-Kultur angeimpft und bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert, bis die Kultur eine OD_{600} von 0,5-0,6 aufwies. Nach einer Ruhephase der Zellen von etwa 15 Minuten auf Eis wurden die Zellen abzentrifugiert (4000 UpM, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, 10 min.), in 80 ml kaltem RF1-Puffer resuspendiert und 15 min. auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden anschließend erneut bei 4000 UpM und $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ für 10 min. zentrifugiert, in 20

ml RF2-Puffer aufgenommen und die Suspension für 15 min. auf Eis kalt gehalten. Gelagert wurden die Zellen in N₂-schockgefrosteten 200 µl Aliquots bei -80 °C.

4.10 Transformation chemisch kompetenter Bakterien

(Sambrook et al., 1989)

200 µl der dauerkompetenten Zellen (aus 4.9) wurden pro Transformationsansatz auf Eis aufgetaut. Zu den aufgetauten Zellen wurden 1-10 µl der entsprechenden Plasmid-DNA-Lösung gegeben und der Ansatz für weitere 20 min. auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock bei 42 °C von 60-90 sek. Dauer wurden die Zellen sofort wieder für 5-10 min. auf Eis gelagert. Nach Zugabe von 800 µl vorgewärmtem LB-Medium wurden die Zellen zur Ausbildung der Antibiotikaresistenz für 1 Stunde bei 37 °C im Brutschrank unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz bei 3000 UpM für 2 min. zentrifugiert, die Zellen durch leichtes Schwenken in 100-200 µl frischem, vorgewärmtem LB-Medium resuspendiert und der gesamte Ansatz entsprechenden LB-Selektionsplatten (Ampicillin 100 µg/ml, IPTG, X-Gal) ausplattiert. Die anschließende Inkubation erfolgte bei 37. °C über Nacht im Brutschrank.

4.11 Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli*

4.11.1 Mini-Präparation von Plasmid-DNA (alkalische Lyse)

(Birnboim & Doly, 1979)

S1-Puffer	50 mM Tris/HCl (pH 8,0) 10 mM EDTA 100 µg RNase A/ml
S2-Puffer	200 mM NaOH 1 % (w/v) SDS
S3-Puffer	2,6 M KAc/Essigsäure (pH 5,2)

Eine einzelne Bakterienkolonie wurde in 3 ml LB-Medium (unter Zugabe des dementsprechenden Antibiotikums) über Nacht bei 37 °C unter Schütteln kultiviert. 1 ml dieser Kultur wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß transferiert, die Zellen bei 13000 UpM für 20 Sekunden pelettiert und in 100 µl S1-Lösung resuspendiert. Nach Zugabe von 200 µl Lösung S2 wurde die Suspension gut gemischt für 4 Minuten bei RT inkubiert, während dieser Zeit wurden die Zellen aufgebrochen. Nach der Zell-Lyse wurden zur Fällung der Proteinanteile 150 µl S3-Lösung zugegeben und durch Zentrifugieren (13000 UpM, 10 min.) sowohl Zellreste, Proteinanteile als auch chromosomale DNA von der Plasmid-DNA getrennt. Der Überstand wurde in ein

neues Reaktionsgefäß überführt und zur Fällung der Plasmid-DNA 0,8 Volumenanteile Isopropanol zugegeben. Die DNA wurde durch 30minütige Zentrifugation (13000 UpM, 4 °C) pelletiert, 2 bis 3 mal mit 70 % Ethanol gewaschen, getrocknet und in 30 µl A. dest. aufgenommen.

4.11.2 Midi-Präparation von Plasmid-DNA

(Genomed Jetstar, nach Angaben des Herstellers)

Um größere Mengen an Plasmid-DNA aus Bakterienkulturen zu isolieren wurden 40 ml einer 50 ml Übernachtskultur in ein 50 ml Falconröhrchen überführt und bei 4000 UpM für 10 min. zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurden die Zellen in 4 ml Resuspensionspuffer (E1) aufgenommen und nach Zugabe von 4 ml E2-Puffer lysiert. Nach einer Inkubationszeit von 5 min. wurde die Suspension durch 4 ml E3 neutralisiert und die Zellreste und die chromosomale DNA nach 10minütiger Zentrifugation bei 6000 UpM pelletiert. Der Plasmid-DNA beinhaltende Überstand wurde anschließend auf eine, mit E4-Puffer äquilibrierte, Anionenaustauschsäule gegeben. Nach dem Durchfluss wurde die Säule zweimal mit Waschpuffer E5 gewaschen und die Plasmid-DNA von der Säulenmatrix durch Zugabe von 5 ml Elutionspuffer E6 eluiert. Anschließend wurde die Plasmid-DNA mit Isopropanol gefällt und im gewünschten Volumen A. dest. aufgenommen.

4.12 Präparation von genomischer DNA aus *Drosophila*

(Pirotta, 1986; Steller & Pirotta, 1986)

Extraktionspuffer	100 mM Tris/HCl (pH 9,0) 100 mM EDTA 1 % (w/v) SDS
-------------------	--

Zur Isolierung von genomischer DNA aus adulten Fliegen wurden ca. 100 ätherisierte Fliegen in einem Glaspotter in 1 ml Extraktionspuffer homogenisiert. Das Homogenisat wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und bei 65 °C im Wasserbad für 20 min. inkubiert. Nach Zugabe von 150 µl 8 M Kaliumacetat wurde der Ansatz für 30 min. auf Eis inkubiert und anschließend bei 13000 UpM und 4°C für 15 min. zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß transferiert und die genomische DNA mit 0,5 Volumenanteilen Isopropanol gefällt. Nach zweimaligem Waschen mit 70 % EtOH wurde die DNA luftgetrocknet und in 100 µl A. dest. gelöst.

4.13 Gelelektrophorese von DNA in Agarosegelen

10 x Auftragspuffer (Sambrook et al., 1989)	0,5 % (w/v) Xylencyanol 0,5 % (w/v) Bromphenolblau 40 % (v/v) Glycerin in TAE oder TBE
10 x TBE	0,9 M Tris/HCl (pH 7,9) 0,9 M Borsäure 20 mM EDTA
1 x TAE	200 mM Tris-Acetat (pH 7,7) 10 mM EDTA

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten in einer Größe zwischen 100 bp bis zu 20 kb dient die Agarose-Gelelektrophorese. Sowohl analytisch, als auch präparativ wurde sie mit Horizontalgelen von 6 cm x 9 cm, bzw. 8 cm x 12 cm Größe durchgeführt. Je nach erforderlichem Trennbereich betrug der Agaroseanteil zwischen 0,8-2 % (w/v) in TBE- oder TAE-Puffer, dem zusätzlich Ethidiumbromid (0,5 µg/µl) zugesetzt wurde. Als Laufpuffer dienten ebenfalls entweder TBE oder TAE (1 x Puffer). Vor dem Auftragen wurde den Proben 1/10 Volumenanteil 10 x Auftragspuffer beigemischt. Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte in einem Spannungsfeld von 60-100 V Gleichspannung. Anschließend wurde die DNA aufgrund der interkalierenden Substanz Ethidiumbromid mittels UV-Belichtung analysiert und dokumentiert.

4.14 Aufreinigung von DNA-Fragmenten

4.14.1.1 DNA-Isolierung aus Agarosegelen

(GFX™ PCR, DNA and Gel Band Purification Kit, Amersham Pharmacia Biotech)

Unter UV-Licht wurde das gewünschte DNA-Fragment aus dem Gel mit einer Skalpellklinge ausgeschnitten, in ein Reaktionsgefäß überführt und gewogen. Pro 10 mg Gel wurden 10 µl „capture buffer“ zugegeben und bei 60 °C 15-20 Minuten inkubiert, um die Agarose zu lösen. Der Ansatz wurde anschließend auf eine GFX-Säule gegeben und direkt bei 3500 UpM für 3 min. zentrifugiert. Die abzentrifugierte Flüssigkeit im Reaktionsgefäß wurde verworfen und die an die Säulenmatrix gebundene DNA mit 500 µl „wash-buffer“ gewaschen (13000 UpM, 30 s). Die Säule wurde dann auf ein neues Reaktionsgefäß gesetzt und die gebundene DNA mit 10-50 µl A. dest. eluiert (13000 UpM, 1 min.).

4.14.1.2 DNA-Isolierung aus Agarosegelen

(Genomed, Jetsorb DNA Extraction from Agarose Gels; nach Angaben des Herstellers)

Wie unter 4.14.1.1 wurde das gewünschte DNA-Fragment aus dem Gel ausgeschnitten und gewogen. Pro 100 mg Gel wurden 300 µl Puffer A1 und 10 µl JETSORB Suspension mitsamt dem Gel in ein Reaktionsgefäß gegeben, der Ansatz kräftig vermischt und für 15-20 min. bei 50 °C inkubiert. Während der Inkubationszeit wurde der Reaktionsansatz in 3 min. Abständen erneut vermischt. Nach Zentrifugation (13000 UpM, 30 s) wurde der Überstand verworfen. Das Präzipitat wurde anschließend mit 300 µl Puffer A1 gewaschen und wiederum mit 3000 UpM für 30 Sekunden zentrifugiert. Der Waschpuffer wurde dann entfernt und das Pellet nach gleichem Vorbild mit Puffer A2 gewaschen. Anschließend wurde das Pellet luftgetrocknet und in 20 µl A. dest. resuspendiert und bei 50 °C für 5 min. inkubiert. Während dieser Inkubationszeit wurde der Ansatz einmalig kurz geschüttelt. Nach erneutem Zentrifugieren wurde die im Überstand enthaltene DNA in ein frisches Reaktionsgefäß überführt.

4.14.2.1 DNA-Isolierung aus Lösungen

(GFX™ PCR, DNA and Gel Band Purification Kit, Amersham Pharmacia Biotech)

In A. dest. gelöste DNA-Fragmente wurden mit 500 µl „capture-buffer“ auf eine auf einem Sammelreaktionsgefäß platzierte Glasfasermatrix-Säule gegeben. Nach 1minütiger Inkubationszeit bei RT wurde die Flüssigkeit bei 3500 UpM für 1 min. abzentrifugiert. Die aufgefangene Flüssigkeit wurde verworfen und die an der Säulenmatrix gebundene DNA mit 500 µl „wash-buffer“ bei 13000 UpM für 30 Sekunden gewaschen. Die Säule wurde anschließend auf einem neuen Reaktionsgefäß platziert und die DNA mit 10-50 µl A. dest. bei 13000 UpM für 1 min. eluiert.

4.14.3 Elutip-d-DNA Aufreinigung

(Schleicher & Schüll, nach Angaben des Herstellers)

High-salt Lösung	1 M NaCl 20 mM Tris/HCl (pH 7,4) 1 mM EDTA
Low-salt Lösung	0,2 M NaCl 20 mM Tris/HCl (pH 7,4) 1 M EDTA
NaAc	3 M (pH 4,0)

Plasmid-DNA, welche zur Mikroinjektion vorgesehen war, wurde vor Herstellung des Injektionsansatzes über Elutip-d-Säulen aufgereinigt. Dabei wurde die Spitze der Säule möglichst nahe am Säulenrand abgeschnitten, eine 5 ml Spritze mit 1 ml High-salt Lösung gefüllt und die Säule luftblasenfrei auf der Spritze platziert. Nachdem die Lösung langsam (1 Tropfen pro 10 Sekunden) durch die Säule gelaufen war wurde diese Prozedur mit 5 ml Low-salt Lösung wiederholt. Anschließend wurde eine 1 ml Spritze mit Low-salt Lösung gefüllt, die zu reinigende DNA in diese Lösung geben und, mit der selben Geschwindigkeit wie oben beschrieben, durch die luftblasenfrei aufgesetzte Säule gedrückt. Anschließend wurde die an der Säulenmatrix gebundene DNA mit 1 ml Low-salt Lösung gewaschen. Eluiert wurde die nun gereinigte DNA mit 500 ml High-salt Lösung in ein frisches Reaktionsgefäß.

Nach dem Elutionsschritt wurde die Plasmid-DNA mit 2,5 Volumenanteilen eiskaltem absolutem EtOH und 1/10 Volumenanteilen NaAc (3 M, pH 4,0) gefällt (13000 UpM, 30 min., 4 °C), zweimalig in eiskaltem EtOH (70 %) gewaschen, luftgetrocknet und in 30 µl A. dest. aufgenommen.

4.15 Bestimmung der Nukleinsäure-Konzentration

Nukleinsäuren können aufgrund ihrer maximalen Absorption bei einer Wellenlänge von $\lambda = 260$ nm photometrisch quantifiziert werden. Aus der Absorption (optische Dichte: OD) lässt sich folgendermaßen die Nukleinsäure-Konzentration in $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ bei einer Quarzküvetten Dicke von 1 cm berechnen:

Doppelsträngige DNA	$\text{OD}_{260} \times 50 \times \text{Verdünnungsfaktor}$
Einzelsträngige DNA	$\text{OD}_{260} \times 33 \times \text{Verdünnungsfaktor}$
RNA	$\text{OD}_{260} \times 37 \times \text{Verdünnungsfaktor}$

III. Enzymatische Manipulation von Nukleinsäuren

4.16 Enzymatische Spaltung von DNA mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen

Um die erforderliche Enzymmenge zu errechnen, welche nötig ist, um die eingesetzte Ziel-DNA vollständig enzymatisch zu spalten, wird folgende Berechnung angestellt:

$$\text{Benötigte Enzymmenge (Units}/\mu\text{g DNA)} = \frac{48,5 \text{ kb (bp Lambda)} \times \text{Anzahl der Schnittstellen in der Ziel-DNA}}{\text{Größe der Ziel-DNA (bp)} \times \text{Anzahl der Schnittstellen in } \lambda\text{-DNA}}$$

Diese Formel basiert auf der Definition der Enzymeinheit Unit (U) für Restriktionsendonukleasen. Definiert ist die Unit als die Enzymmenge, welche 1 µg λ-DNA innerhalb einer Stunde vollständig schneidet. In Abhängigkeit von den gewählten Enzymen wurden die jeweiligen Reaktionstemperaturen und Puffersysteme nach Angaben der Hersteller gewählt. Die Inkubationszeiten erstrecken sich in der Regel über 1-2 Stunden.

4.17 Polymerasekettenreaktion (PCR)

(Saiki et al., 1988; Qiagen, Stratagene nach Angaben des Herstellers)

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) ermöglicht die spezifische Amplifikation von DNA-Abschnitten. Essentiell ist die Kenntnis der flankierenden Sequenzen des DNA Abschnittes, an denen eine spezifische Bindung komplementärer Oligonukleotide (Primer) erfolgen kann. Unter Verwendung der thermostabilen *Taq*-DNA-Polymerase (aus dem Bakterium *Thermus aquaticus*) kann nach Anlagerung (annealing) dieser Oligonukleotide die sukzessive Elongation der Primer erfolgen. Einem der Matrize anzupassenden, zyklischen Programm folgend, kann somit der gewünschte DNA-Bereich exponentiell amplifiziert werden.

Ein Reaktionsansatz setzte sich aus folgenden Komponenten zusammen:

x µl Matrizen-DNA (50-100 ng)
1 µl Primer A (25 pmol/µl)
1 µl Primer B (25 pmol/µl)
1-2 µl dNTP-Mix (10 mM/dNTP)
5 µl 10 x PCR-Puffer
10 µl Q-Solution (Qiagen)
0,5 µl *Taq*-DNA-Polymerase (5 U/µl)
ad 50 µl Gesamtvolumen in H₂O

Das Grundprogramm einer PCR umfasst in der Regel folgende Teilschritte:

1. Schritt: Denaturierung	95 °C	5 min.
2. Schritt: Denaturierung	95 °C	1 min.
3. Schritt: Primer Hybridisierung (annealing)	40-60 °C	1 min.
4. Schritt: Synthesereaktion	72 °C	0,5 – 3 min.
5. Schritt: abschließende Synthesereaktion	72 °C	10 min.

Die Temperatur in Schritt 3. muss individuell der Beschaffenheit der Oligonukleotide angepasst werden, ebenso wie die Elongationszeit in Schritt 4 der Länge des zu amplifizierenden DNA-Bereiches. Um eine Vervielfältigung des gewünschten DNA-Abschnitts zu erzielen, startet, nach Beendigung einer Synthesereaktion (Schritt 4),

der Zyklus erneut mit der Denaturierung der DNA-Doppelstränge (Schritt 2). Diese zyklische Wiederholung erfolgte in der Regel 30 bis 32 mal.

4.18 Modifikation von DNA-Fragment-Enden

4.18.1 Dephosphorylierung von 5'-Phosphat-Enden

Wird Plasmid-DNA mittels einer Restriktionsendonuklease linearisiert, so entstehen zwei kompatible Enden. Um eine spontane Religation des Plasmids zu unterbinden, wurden die entstandenen 5'-Phosphatreste abgespalten. Diese enzymatische Reaktion wurde mittels einer alkalischen Phosphatase (isoliert aus Kälberdarm, calf intestine alkaline phosphatase: CIP; Roche) durchgeführt. Dazu wurden max. 5 µg Plasmid-DNA mit 1 Unit CIP und 1/10 Volumenanteilen 10 x CIP-Reaktionspuffer in einem Reaktionsvolumen von 20 µl für 30 min. bei 37 °C inkubiert. Im Anschluss wurde der Reaktionsansatz mit 2,5 Volumenanteilen eiskaltem absolutem EtOH unter Zugabe von 1/10 Volumenanteilen 3 M Natriumacetat versetzt und die dephosphorylierte Plasmid-DNA gefällt (13000 UpM, 30 min., 4 °C). Anschließend wurde zweimalig mit eiskaltem EtOH (70 %) gewaschen, die DNA luftgetrocknet und im gewünschten Volumen (10-50 µl) A. dest. aufgenommen.

4.18.2 Auffüllen von 5' überhängenden Enden

(Sambrook et al., 1989)

In der Regel generieren Restriktionsendonukleasen nach dem Restriktionsschnitt 5'-überhängende Einzelstränge. Sollen aber DNA-Fragmente über „glatte“ Enden ligiert werden, müssen diese Überhänge zum Doppelstrang aufgefüllt werden. Diese Reaktion wurde mittels der Polymerisationsreaktion durch das Klenow-Fragment (großes Fragment der DNA-Polymerase I aus *E. coli*) erreicht. Dazu wurden pro 1 µg DNA mind. 2 mM dNTPs 1 Unit Klenow-Enzym (Roche) und 1 x Puffer B (Boehringer) in einem Reaktionsvolumen von 20 µl in ein Reaktionsgefäß gegeben. Die Auffüllreaktion erfolgte bei 37 °C für 30 Minuten. Anschließend wurde die DNA einer Ethanolfällung unterzogen und im gewünschten Volumen A. dest. aufgenommen.

4.18.3 Kinasierung von 5'-Hydroxyenden nicht phosphorylierter DNA

Synthetisch hergestellte Oligonukleotide besitzen ein nicht phosphoryliertes 5'-Hydroxyende. Mit Hilfe der T4-Polynukleotidkinase kann eine Kinasierung dieser Oligonukleotide erfolgen. Hierbei dient ATP als Phosphatgruppendedonor. Jeweils 100

pMol der komplementären Oligonukleotide wurden in einem Gesamtvolumen von 100 µl A. dest. für 20 Sekunden aufgekocht und anschließend bei RT über Nacht abgekühlt. Dies förderte eine Anlagerung der komplementären Stränge. Durchgeführt wurde die Kinasereaktion am darauf folgenden Tag bei 37 °C für 30 Minuten unter Zugabe von 5 mM ATP, 1 x PNK Reaktionspuffer und 10-20 Units PNK im Wasserbad. Anschließend wurde der Ansatz einer Ethanolfällung unterzogen, die Oligonukleotide in 30 µl A. dest. gelöst und -20 °C gelagert.

4.19 Ligation von DNA-Fragmenten

Für eine Ligation zweier DNA-Fragmente sind kompatible Enden erforderlich. Dementsprechend wurden diese Fragmente im Vorfeld behandelt (siehe 4.16 und 4.18). In der Regel wurden 20-150 ng Vektor-DNA und ein drei- bis fünffacher Überschuss des zu klonierenden Fragmentes im Reaktionsansatz eingesetzt. Unter Zugabe von 1/10 Volumenanteilen 10 x Ligationspuffer und 1 Unit T4 DNA-Ligase in einem Reaktionsvolumen von 10-20 µl wurden die Fragmente ü. N. bei 16 °C ligiert.

4.20 Markierung von DNA-Molekülen

4.20.1 Nichtradioaktive Markierung von PCR-DNA-Sonden

Die bei einer *in situ*-Hybridisierung eingesetzten Sonden wurden unter Verwendung der Polymerasekettenreaktion hergestellt und markiert. Bei der Herstellung einer Antisense-Einzelstrang-Sonde wurde nur der „antisense“ Primer in 2facher Konzentration eingesetzt und die Zyklenzahl verdoppelt. Um eine gleichzeitige Markierung der amplifizierten Stücke zu erreichen, wurde ein „dNTP-labeling-Mix“ der Firma Roche statt der herkömmlichen dNTPs zum Reaktionsansatz gegeben. Das PCR-Endprodukt wurde anschließend über eine GFX-Säule gereinigt (s. 4.14.2.1).

4.20.2 Spot-Test DIG-markierter DNA-Sonden

10 x DIG1-Puffer	1 M Tris/HCl (pH 7,5) 1,5 M NaCl
DIG2-Puffer	DIG1 + 0,5 % (w/v) Blockingreagenz
DIG3-Puffer	0,1 M Tris/HCl (pH 9,5) 0,1 M NaCl 50 mM MgCl ₂

DIG-markierte DNA-Sonden wurden vor ihrem Einsatz in *in situ*-Hybridisierungen auf die Qualität ihrer Markierung getestet. Dazu wurde eine Verdünnungsreihe von 1:10 bis 1:10000 aus dem Markierungsansatz hergestellt. 1 µl jeder Verdünnungsstufe wurde dann auf eine Nylonmembran (Hybond N, Amersham) getropft und durch UV-Bestrahlung kovalent gebunden. Die Membran wurde anschließend für 1 Minute in 1 x DIG1 äquilibriert und dann für 30 Minuten in DIG2-Puffer präinkubiert. Nach diesem Inkubationsschritt wurde der Puffer verworfen und durch eine anti-DIG-AP-Antikörperlösung (1:5000 in DIG2) ersetzt. Die Antikörperinkubation wurde bei RT für 30 Minuten unter leichtem Schwenken durchgeführt. Nach zwei 15minütigen Waschschritten in DIG1-Puffer wurde die Membran für 2 min. in DIG3 äquilibriert. Die Färbereaktion wurde dann in 5 ml Färbelösung (4,5 µl NBT + 3,5 µl X-Phosphat/ml DIG3) unter Lichtabschluss durchgeführt. Konnte nach ca. 3 Minuten ein Signal des 1:10000 Spots detektiert werden, war die Sonde von ausreichender Qualität und wurde bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert.

IV. Expression und Analyse von Fusionsproteinen

4.21 Expression von rekombinanten His-gekoppelten Fusionsproteinen

(Invitrogen, pBAD/His A System, nach Angaben des Herstellers)

Die zu exprimierende DNA wurde mittels Polymerasekettenreaktion amplifiziert und im Leserahmen (in frame) in den Expressionsvektor pBAD/His A (Invitrogen) kloniert. Mit Hilfe dieses Vektors ist es möglich, ein N-terminal mit 6 Histidinen gekoppeltes Fusionsprotein in *E. coli* durch L-Arabinose vermittelte Induktion zu exprimieren. Nach Klonierung des entsprechenden DNA-Abschnittes in den Vektor wurden *E. coli* TOP10 Zellen (Invitrogen) mit dem Konstrukt transformiert und der Leserahmen durch Sequenzierung überprüft. Anschließend wurde das Konstrukt in den *E. coli* Stamm LMG194 (Invitrogen) eingebracht, in dem die Expression des rekombinanten Proteins durchgeführt werden sollte. Zur Herstellung eines Expressionsprofils wurde eine Kolonie in 3 ml LB-Medium (+ Ampicillin) inokuliert und ü. N. kultiviert (OD₆₀₀ 1-2). Darauf folgend wurden jeweils 0,1 ml dieser Übernachtskultur zu sechs 50 ml LB-Medium (+ Ampicillin) enthaltenden Kolben gegeben und die Kulturen bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 bei 37 °C geschüttelt. Anschließend wurde von den Kulturen jeweils 1 ml abgenommen, die Zellen bei 6000 UpM pelletiert und bei -20 °C eingefroren. Für die Erstellung des Expressionsprofils bedeutet diese eingefrorene Charge den Zeitpunkt 0. Währenddessen wurde eine serielle 1:10 Verdünnungsreihe einer 20 %igen L-Arabinose Lösung vorbereitet (20 % bis 0,002 %), welche dann als Induktor der Expression wie unten aufgeführt zu den Kulturen zugegeben wurde.

Kultur	Volumen (ml)	L-Arabinose Verd.	Endkonzentration
1	0,5	0,002 %	0,00002 %
2	0,5	0,02 %	0,0002 %
3	0,5	0,2 %	0,002 %
4	0,5	2 %	0,02 %
5	0,5	20 %	0,2 %
6	0	0	0

Nach der Zugabe des Induktors wurden die Kulturen für 4 Stunde bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde erneut 1 ml Kultur abgenommen, abzentrifugiert und eingefroren. Dieser Zeitpunkt wird im Expressionsprofil die Einheit 1 darstellen. Alle gefroren gelagerten Zellen wurden zur Vorbereitung für die Expressionsanalyse in 100 µl 1 x SDS-Probenpuffer resuspendiert, für 5 min. aufgekocht und anzentrifugiert. Zur Bestimmung des Expressionsoptimums wurden die denaturierten Proteine mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) aufgetrennt.

4.22 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

(Laemmli, 1970)

Acrylamidlösung (Protogel, Biozym)	30 % (w/v) Acrylamid 0,8 % (w/v) Bisacrylamid
10 x SDS-Laufpuffer	1,9 M Glycin 0,25 M Tris 1 % (w/v) SDS
2 x SDS-Probenpuffer	50 mM Tris/HCl, pH 6,8 20 % (v/v) Glycerin 4 % (w/v) SDS 4 % (v/v) β-Mercaptoethanol 0,2 % (w/v) Bromphenolblau
Tris/HCl-SDS-Puffer	1 M Tris/HCl (pH 8,8 bzw. 6,8) 0,4 % (w/v) SDS
Färbelösung	40 % (v/v) Methanol 10 % (v/v) Essigsäure 1 % (w/v) Coomassie Brilliant Blau
Entfärbelösung	40 % (v/v) Methanol 10 % (v/v) Essigsäure

In der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese werden Proteine auf Grund ihres Molekulargewichtes in Anwesenheit des denaturierenden, anionischen Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS) in Richtung Anode aufgetrennt. Dieses System besteht aus zwei Gelkomponenten: einem Trenngel, dessen Acrylamidkonzentration dem aufzutrennenden Molekulargewichtsbereich angepasst wird, und einem Sammelgel,

welches auf das auspolymerisierte Trenngel geschichtet wird. Die Auftrennung von Proteinen in der Größenordnung zwischen 20-70 kD erfolgte in einem 12 % Acrylamidgel (12 % Acrylamidlösung in 1 x Tris-SDS-Puffer, pH 8,8) und einem 5 % Sammelgel (5 % Acrylamidlösung in 1 x Tris-SDS-Puffer, pH 6,8). Beide Gele setzten sich aus folgenden Komponenten zusammen:

	Trenngel (12 %)	Sammelgel (5 %)
Acrylamidlösung	4,5 µl.	650 µl
Tris/HCl-SDS-Puffer	pH 8,8: 2,28 ml	pH 6,8: 1,25 ml
A. dest.	3,95 ml	3,75 ml
10 % APS	75 µl	50 µl
TEMED	7,5 µl	5 µl

10-40 µl der denaturierten Proben wurden nach Fertigstellung des Gels aufgetragen. Die Gelelektrophorese erfolgte in der vertikalen Gelelektrophoreseapparatur in 1 x SDS-Laufpuffer bei 120-150 V für 1-3 Stunden. Anschließend wurde das Gel für eine Stunde in Coomassie-Färbelösung bei RT inkubiert, um die aufgetrennten Proteine direkt im Gel sichtbar zu machen. Durch mehrfaches Waschen bei RT in Entfärbelösung wurde dann die überschüssige Farbe entfernt.

4.23 Western Blot und immunologischer Nachweis von Proteinen

(Towbin et al., 1979; Ogata et al., 1983; Kyshe-Anderson, 1984, Qiagen, Amersham, nach Angaben des Herstellers)

1 x Transferpuffer

25 mM Tris/HCl (pH 8,3)
192 mM Glycerin
10 % (v/v) Methanol

Im Anschluss an die SDS-PAGE folgte der Transfer der im Gel aufgetrennten Proteine auf eine Nitrocellulose-Membran (Hybond P, Amersham). Dazu wurde die Membran auf die Größe des Gels zugeschnitten, kurz in Methanol angefeuchtet und schließlich in Transferpuffer äquilibriert. Gleichzeitig wurde das Gel ebenfalls in Transferpuffer gewaschen. Anschließend wurde der Transfer wie folgt durchgeführt: 2x4 Blatt Whatman Papier, auf die Größe der Membran zugeschnitten, wurden in PBS angefeuchtet. Auf 4 Lagen Whatman wurde dann die Membran aufgelegt und kantengenau das Gel auf ihr platziert. Anschließend wurde für die spätere Analyse der Proteinmarker und die Positionen der Geltaschen mit Bleistift am Rande der Membran markiert. Auf das Gel wurden wiederum 4 Lagen PBS-getränktes Whatman Papier gelegt und mit einer Glaspipette durch Glattstreichen des Papiers die Luftblasen entfernt. Dieser Aufbau wurde zwischen Anoden- und Kathoden-Graphitelektroden platziert und der Transfer bei 0,8 mA pro cm² Membranfläche bis zu 2 Stunden durchgeführt.

Nach dem Transfer wurde die Membran in 5 % (w/v) Milchpulver in 1 x PBS gewaschen und für mind. 1 Stunde (od. ü. N. bei 4 °C) inkubiert. Anschließend wurde die Membran bei 4 °C ü. N. unter leichtem Schwenken mit dem Erstantikörper (anti-pentaHis, Qiagen, 1:10000 in PBS + 1 % (w/v) Milchpulver) inkubiert. Nach der Erstantikörperbehandlung schlossen sich drei 10-15minütige Waschschriffe in 1 x PBS an, bevor die Membran mit dem Zweitantikörper (anti-Maus, peroxidasegekoppelt, 1:5000 in 1 x PBS) für 1-2 Stunden bei RT behandelt wurde. Anschließend wurde die Antikörperlösung verworfen und die Membran dreimal für 15 Minuten in 1 x PBS gewaschen.

Der Nachweis exprimierter Fusionsproteine mittels gebundener Zweitantikörper erfolgte unter Verwendung des ECL-Kits (ECL Western blotting detection reagents, Amersham). Dabei wurde die Oberseite der Membran mit jeweils 0,5 ml der beiden Lösungen A und B des ECL-Kits auf einem aufgeschnittenen Autoklavierbeutel gänzlich benetzt. Anschließend wurde die Membran durch Verschweißen des Beutels luftdicht abgeschlossen. Die Dokumentation der entstehenden Chemolumineszenz erfolgte mittels Autoradiographie.

5. Ergebnisse

Die larvale Bewegungsmuskulatur von *Drosophila melanogaster* wird während der Embryogenese gebildet und zeichnet sich im späten Embryonalstadium 16 (13 bis 16 Stunden nach Eiablage) durch einen segmentalen, stereotypischen Aufbau aus. Die Myotuben entwickeln sich durch Fusion zweier mesodermaler Zellpopulationen (Founder-Zellen/ Gründerzellen und fusionskompetente Myoblasten (Fcm's) zu vielkernigen Muskelsträngen (Bate, 1990; Bate, 1993). Eine Deletion auf dem III. Chromosom in der Region 68E2-3 bis 69A1 (Linienbezeichnung Df(3L)BK9) resultiert in homozygoten Embryonen zu schweren Defekten im Aufbau der somatischen Muskulatur. Die Ursachen hierfür wurden in der nicht mehr regulär ablaufenden Myoblastenfusion gefunden. Die zu diesem Phänotyp führende, in Df(3L)BK9 deletierte Transkriptionseinheit, wurde aufgrund ihres Phänotyps (zahlreiche unfusionierte Myoblasten) *rolling pebbles (rols)* (Menon and Chia, 2001; Rau et al., 2001)/ *antisocial (ants)* (Chen and Olson, 2001) genannt. Von diesem Genort leiten sich zwei unterschiedlich lange Transkripte (*rols6* und *rols7*) ab, welche einer differentiellen Gewebe-Expression folgen. Das in der Muskelfusion der Bewegungsmuskulatur eine entscheidende Rolle spielende längere Transkript *rols7* kann ab Stadium 9/10 im somatischen und viszeralem Mesoderm detektiert werden. Die Expression im viszeralem Mesoderm ist aber nur von sehr kurzer Dauer (bis Stadium 12), während das Transkript im somatischen Mesoderm in Embryonen im Stadium 16 nachweisbar bleibt. Die Expressionsdomänen des kurzen Transkriptes *rols6* hingegen wurden ab dem frühen Embryonalstadium 9/10 im Endoderm, im Pharynxbereich und in den Anlagen der Malpighischen Gefäßen (MpG) beschrieben (Rau et al., 2001).

Aufgrund der starken Expression des *rols6* Transkriptes in diesen nicht-mesodermalen Derivaten, war es von Interesse, die phänotypischen Auswirkungen von Mutationen in diesem Transkript aufzudecken.

5.1 Phänotypische Charakterisierung der defizienten Linie Df(3L)BK9

Die bisher beschriebenen Defekte in Df(3L)BK9 beschränkten sich überwiegend auf mesodermale Derivate. Ein Hinweis über eventuell zusätzliche Phänotypen könnte aber aufgrund selten auftretender Darmdefekte gegeben sein, wobei bei solchen Embryonen der Dotter nicht korrekt umschlossen wird und der Darminhalt sich in die Bauchhöhle ergießt (Rau, A., Dissertation, 2001). Aufgrund der Kenntnis über die *rols6* Expressionsdomänen wurden das Endoderm und die Malpighischen Gefäße mit geeigneten Markern hinsichtlich eventueller Aberrationen in Morphologie und Entwicklung in der Defizienz Df(3L)BK9 untersucht. Mit Hilfe der Antikörper gegen

Fasciclin II (Fas II) und den Transkriptionsfaktor Cut (ct) können in allen Embryonalstadien die Zellen der Malpighischen Gefäße (MpG) visualisiert werden. Die Zellen des Endoderms wurden mittels eines gegen das Hindsight (Hnt) Protein gerichteten Antikörpers markiert. Durch diesen Ansatz konnte die phänotypische Charakterisierung dieser Defizienz auf Störungen in nicht-mesodermalen Geweben erweitert werden.

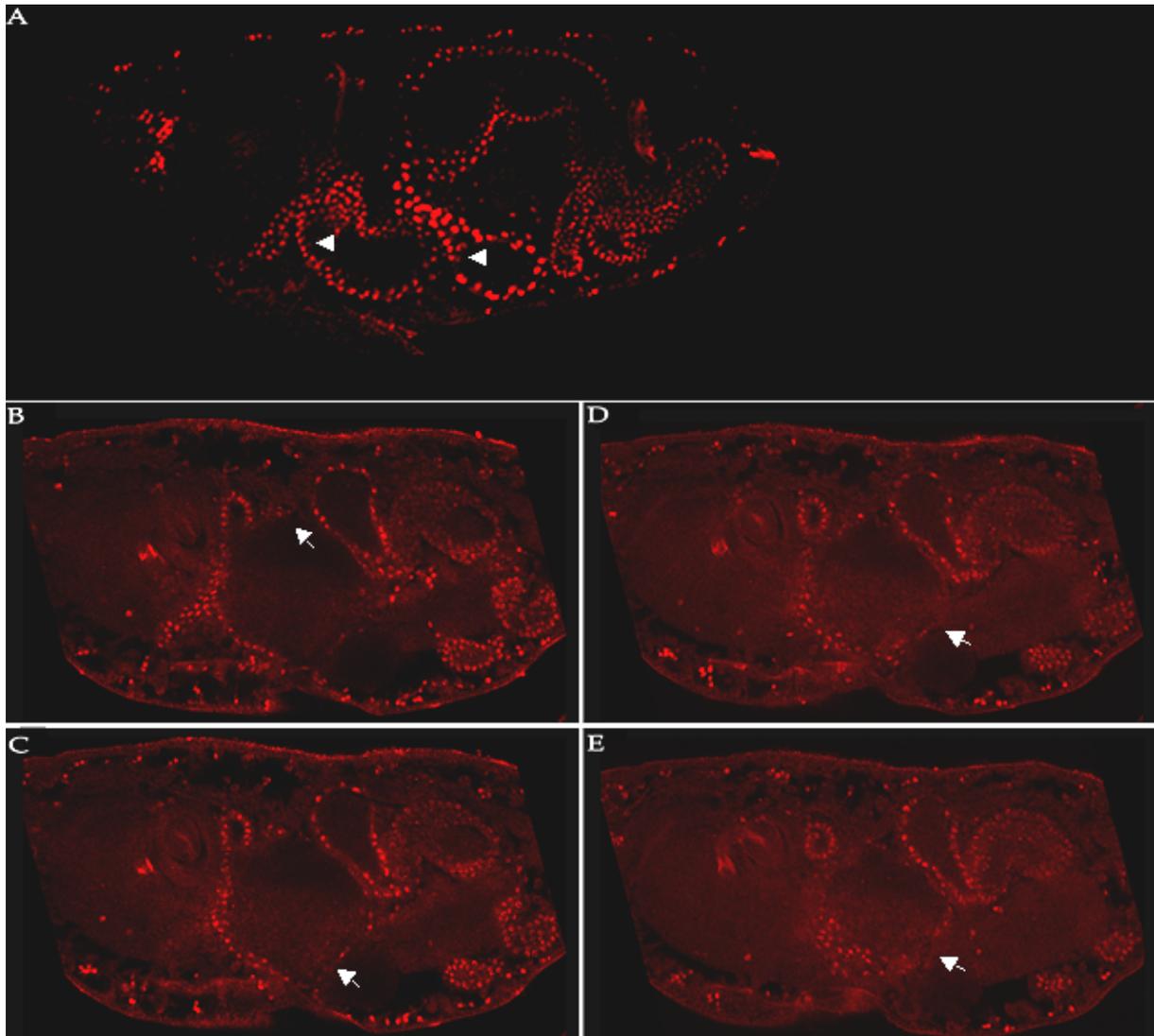


Abbildung 5.1: Das Endoderm ist in *rolling pebbles* defizienten Embryonen im Mitteldarmbereich teilweise unterbrochen. A-E: anti Hindsight (Hnt) Antikörperfärbungen an Stadium 16 Embryonen. A) Darstellung eines WT Embryos. Die nukleäre Hnt-Expression (Pfeilspitzen in A) erlaubt das Endoderm anhand der Darmkonstriktionen zu verfolgen. B-E) Optische Schnitte durch einen Df(3)BK9 Embryo zeigen Darmabschnitte, in denen das Endoderm erkennbare Lücken aufweist (Pfeile in B-E).

Im Endoderm *rols* defizienter Embryonen konnte ein schwacher Phänotyp, der sich auf den Mitteldarmbereich einschränken ließ, beobachtet werden. Wie in Abbildung 5.1 anhand von optischen Schnitten dargestellt ist, scheint das endodermale Epithel im Vergleich zum Wildtyp (Abbildung 5.1 A) teilweise unterbrochen zu sein. Während die Zellen des Endodermepithels und die Darmkonstriktionen der Wildtyp Embryonen

anhand des Cut-Proteins eindeutig zu verfolgen sind, erscheint das Endoderm der mutanten Embryonen besonders im Mitteldarmbereich nicht geschlossen zu sein, was auf eventuell fehlende Zellen oder fehlende Zellkontakte zurückzuführen sein könnte (Abbildung 5.1 B-E).

Im Falle der Malpighischen Gefäße wurde mittels anti-Cut Antikörperfärbung ein eindeutiger Phänotyp vorgefunden. In *rolling pebbles* defizienten Embryonen sind im Stadium 11 die charakteristischen Knospen des sich entwickelnden Gewebes sichtbar. Ausgehend von den Knospen werden ab Stadium 12 die Gefäße elongiert und zeigen zunächst keine auffälligen Abnormalitäten (Abbildung 5.2 D). Im Stadium 15 wird aber deutlich, dass die Gefäße nicht in die Abdominalsegmente 2/3 wachsen, welche sie, dem wildtypischen Verlauf folgend, in diesem Stadium bereits erreicht haben sollten. Sie erscheinen in der Aufsicht noch in kompakter, deutlich irregulärer Form, so dass die Gefäße teilweise verdickt erscheinen (vgl. Abbildung 5.2 B und E). In Stadium 16 Embryonen sind diese Zell-Gruppierungen überwiegend aufgelöst. Die Gefäße erscheinen aber trotz Elongation desorientiert. Sie wachsen nicht wildtypisch anteriorwärts, sondern in posteriore Abdominalbereiche und erreichen selten ihre anterior gelegene Endposition im Bereich des ersten Darmabschnittes (vgl. Abbildung 5.2 C und F). In diesen wenigen mutanten Embryonen, in denen ein anteriores Gefäß annähernd diese Position erreicht, wächst das Schwestergefäß zum posterioren Körperbereich zurück und bildet Schlaufen oder lassoähnliche Strukturen aus.

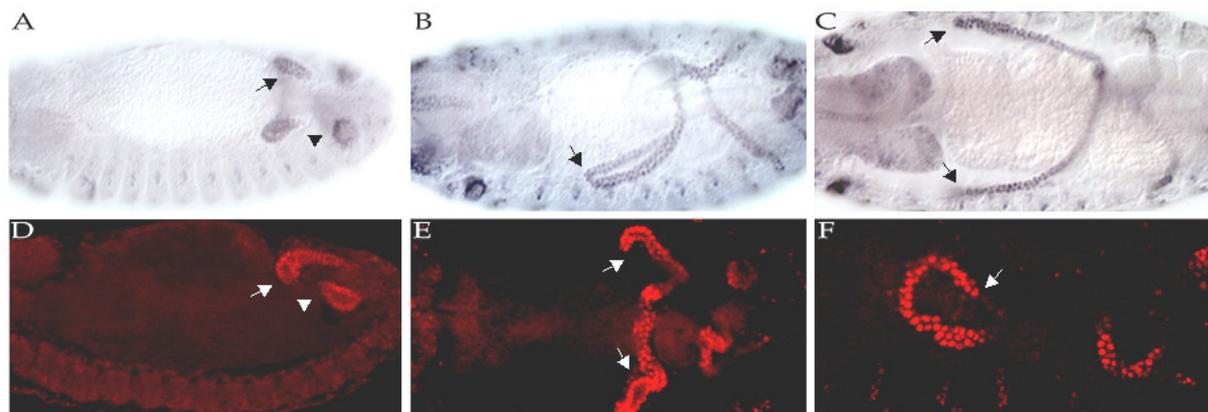


Abbildung 5.2: Die Malpighischen Gefäße der *rolling pebbles* Defizienz Df(3)BK9 sind missgebildet. Dargestellt sind Embryonen verschiedenen Alters. A) und D): Stadium 13. B) und E) Stadium 15. C) und F) Stadium 16. A-C verdeutlichen den wildtypischen Verlauf der Malpighischen Gefäße, dargestellt mittels anti-Cut Antikörperfärbung. In D-F ist der Verlauf der Gefäße in der Defizienz Df(3)BK9 gezeigt. Die Pfeile weisen auf die anterioren Malpighischen Gefäße hin. Die Pfeilköpfe in A und D markieren exemplarisch die posterioren Gefäße. F) zeigt keinen ganzen Embryo, sondern fokussiert den Gefäßverlauf im posterioren Abdomen.

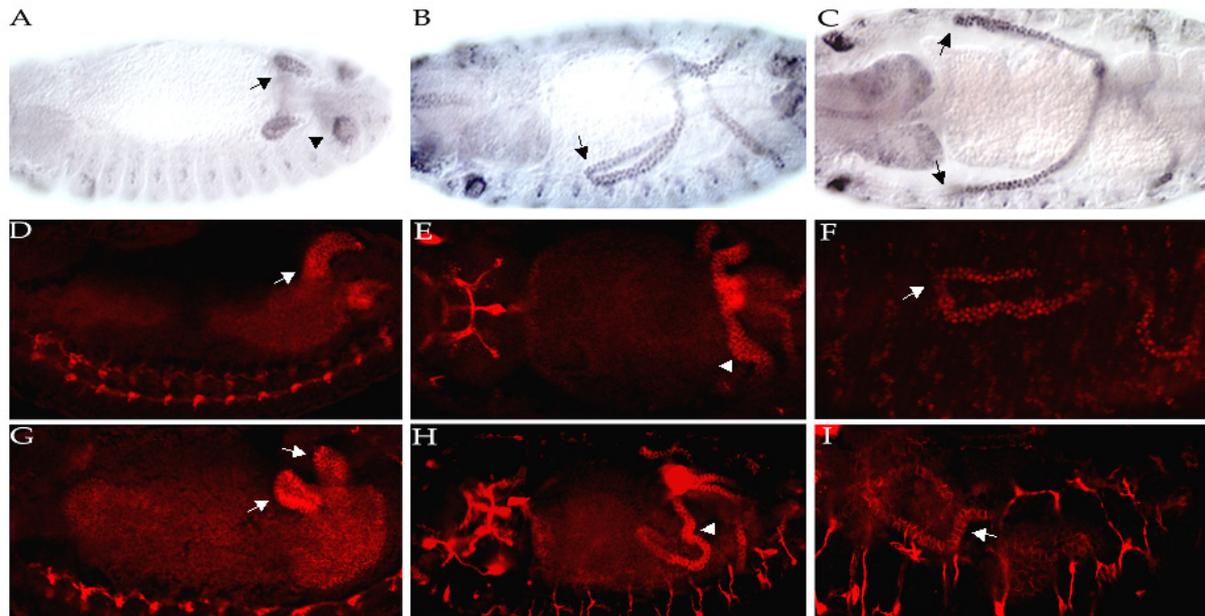
Eine phänotypische Analyse der Pharynxregion, in welcher *rols6* ebenfalls exprimiert ist, wurde mangels geeigneter Marker nicht durchgeführt.

5.2 Phänotypische Analyse der Malpighischen Gefäße in *rolling pebbles* Mutanten

Aufgrund der in 5.1 beschriebenen Phänotypen in der Defizienz Df(3L)BK9 wurden spezifische *rols* Mutanten unter dem gleichen Aspekt untersucht. Die Analysen konzentrierten sich im Folgenden auf die Differenzierung der Malpighischen Gefäße, da die endodermalen Störungen in *rols* mutanten Embryonen nicht als konsistent und repräsentativ betrachtet werden konnten.

Mittels immunhistologischen Nachweisen mit Antikörpern gegen Cut und Fasciclin II (FasII) wurden ein EMS-mutagenisiertes Allel (*rols^{xx117}*) (Gisselbrecht et al., 1996; Rau et al., 2001) und eine P-Element-Insertionslinie (P[EP]3330; Synonym: EP(3)3330; Rorth, 1996), die sich allelisch zum *rolling pebbles* Genort verhalten, untersucht. Beide mutanten Allele weisen den für *rols* charakteristischen Muskelfusionsphänotyp auf. Die Analyse der MpG in diesen Allelen ergaben Übereinstimmungen mit den Daten aus der Analyse der MpG in der Defizienz. In beiden Fällen werden die Anlagen der Gefäße ausgebildet und elongieren. Ebenso wie in der Defizienz manifestiert sich der mutante Phänotyp erst in den späten Stadien. Ab Stadium 15 wird deutlich, dass wiederum die anterioren Gefäße nicht korrekt elongieren, wobei Abschnitte der Gefäße durch die gebildeten Zellgruppierungen verdickt erscheinen (Pfeilspitzen in Abbildung 5.3 E und H). Generell erreichen die anterioren Gefäße nur sehr selten ihre endgültige Position in den anterioren Abdominalsegmenten 2/3, verbleiben in den mittleren Abdominalsegmenten 5-7 und bilden dabei lassoähnliche oder schlaufenförmige Strukturen aus. Diese Befunde sind in Abbildung 5.3 im Vergleich zum Wildtyp dargestellt.

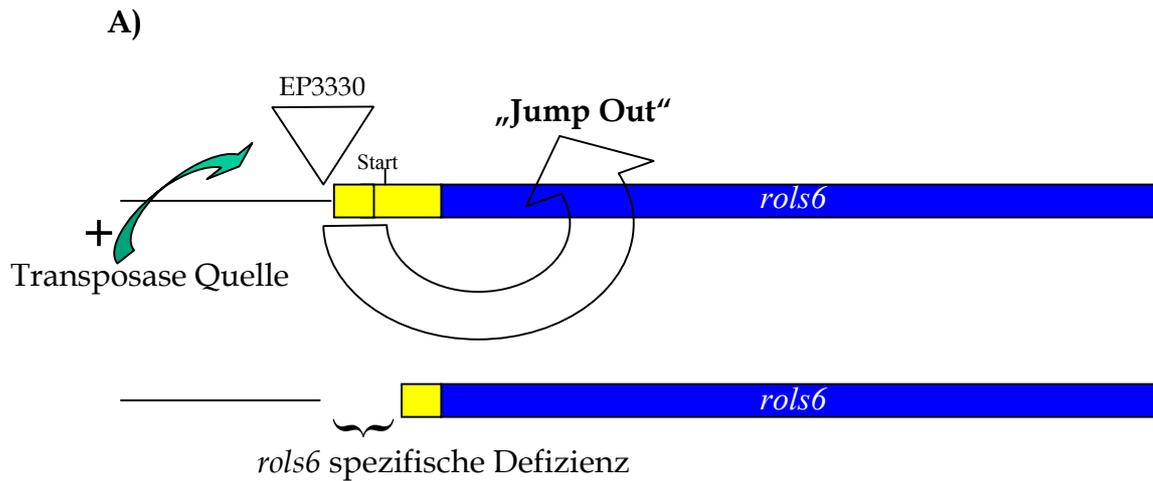
Abbildung 5.3: Darstellung des Phänotyps der Malpighischen Gefäße von *rols* Allelen. Die Malpighischen Gefäße wurden mittels anti-Cut (A-D; F) und anti-Fasciclin II Antikörperfärbung (D-E; G-I) visualisiert. A-D: Wildtyp Embryonen im Stadium 13 (A), 15 (B) und 16 (C) zeigen den typischen Verlauf der Entwicklung der Gefäße. D-F: EP(3)3330 Embryonen und G-I: *rols^{xx117}* Embryonen in den entsprechenden Entwicklungsstadien weisen dagegen in späteren Stadien Entwicklungsstörungen der Malpighischen Gefäße auf. Alle Pfeile weisen auf den Verlauf der anterioren Gefäße hin. Durch eine schwarze Spitze ist in A) eine posteriore Gefäßknospe gekennzeichnet. Alle weißen Pfeilspitzen bezeichnen phänotypisch charakteristische Abweichungen der Zellanordnungen, welche die Gefäße partiell verdickt erscheinen lassen (E und H).



5.3 Der Phänotyp in den Malpighischen Gefäßen ist einem Verlust des *rols6* Transkriptes zuzuordnen

5.3.1 Generierung einer *rols6* spezifischen Mutation mittels P-Element-Remobilisierung

Die Beschreibung des *rolling pebbles* Phänotyps in den Malpighischen Gefäßen erfolgte bisher in Mutanten, in denen wahrscheinlich beide *rols* Transkripte betroffen sind, was sich in den beschriebenen Muskelfusionsphänotypen äußert (siehe Abbildung 2.2). Da das längere Transkript *rols7* mesoderm-spezifisch exprimiert ist und in der Myoblastenfusion einen essentiellen Faktor darstellt (Menon and Chia, 2001; Rau et al., 2001) wurde die Möglichkeit einer Korrelation zwischen der Entwicklungsstörung der Malpighischen Gefäße und einer mutierten *rols6* Form überprüft. Experimenteller Ansatz hierzu war eine P-Element vermittelte Mutagenese, wobei ausgehend von der EP(3)3330 Linie (Rorth, 1996) das P-Element kreuzungsgenetisch remobilisiert wurde. Dieses P-Element ist 64 bp stromaufwärts der *rols6* Transkriptionsinitiationstelle im zweiten *rols7* Intron inseriert (siehe Abbildungen 2.1 und 5.4.1).

**B)**

P	EP(3)3330/TDL Z, Sb	x	Transposasequelle (f41): ry; (Δ 2-3)Sb/TM3 Ser
F1	w; Dr/TDL Z, Sb	x	EP(3)3330/(Δ 2-3) Sb (Jumpstarterkreuzung)
F2	w; Dr/TDL Z, Sb	x	EP(3)3330*/TDL Z, Sb (white; Stubble)
F3	<p>→ JumpOut Linien etablieren:</p> <p>-EP(3)3330*/TDL Z, Sb (letal) -EP(3)3330*/EP(3)3330* (vital)</p>		

Abbildung 5.4: Schematische Darstellung der Generierung einer *rols6* spezifischen Deletionsmutante und Kreuzungsschema zur Remobilisierung von EP(3)3330. A) Das zu remobilisierende EP-Element inseriert 64 bp vor dem 1. *rols6* spezifischen Exon. Mittels einer externen Transposasequelle kann das P-Element aus dem Genom entfernt werden. Bei einer unpräzisen Exzision könnte so eine Deletion entstehen, welche z.B. den 5'-UTR (Exon1) und den Translationsstart in Exon2 entfernt. Die Entfernung der P-Elementinsertionsstelle zur Translationinitiation beträgt ca. 1000 bp. B) Kreuzungsschema zur Remobilisierung des EP-Elementes. In der Filialgeneration 1 werden rotäugige Männchen, die den Marker *Stubble* (*Sb*) tragen, in Einzelkreuzungen mit virginellen Weibchen eines weissäugigen Balancerstammes gekreuzt. Aus der Nachfolgegeneration F2 werden diese Tiere einzeln selektiert, welche die rote Augenfarbe verloren haben und *Sb* tragen. Diese Tiere sind „JumpOut“-Tiere (gekennzeichnet durch EP*) und werden ab der F3 als balancierte letale oder homozygot vitale Linien etabliert (Erläuterung im Text).

Die Remobilisierung erfolgte entsprechend dem Kreuzungsschema in Abbildung 5.4.1. Hierzu wurde das P-Element tragende Chromosom über ein Chromosom gekreuzt, welches eine Transposasequelle zur Verfügung stellte (Parentalgeneration, P). In der Nachfolge-Generation F1 wurden männliche Fliegen, welche rötlich gescheckte Augen hatten und den Marker *Stubble* trugen, selektiert. Die Augenfarbe erklärt sich durch die Integration des P-Elementes im Genom, da P-Elemente zur Selektion häufig ein *white*⁺ Gen tragen. Die gescheckten Augen sind eine Eigenart der Kombination eines P-Elementes mit dem Transposase tragenden Chromosom Δ 2-3. Anders als in der Keimbahn, wird im Soma das zweite Intron des Transposasekodierenden Gens nicht gespleißt und die Transposase somit nur in der Keimbahn

funktionell verfügbar. Durch die Deletion dieses Introns im Konstrukt $\Delta 2-3$ wird in solchen Nachkommen der Parentalgeneration die Transposase auch konstitutiv im Soma bereitgestellt (Pirodda, 1986). Solche Männchen, sogenannten „Jumpstarter“, wurden mit virginellen Weibchen eines, für das III. Chromosom doppelt markierten, weissäugigen Stammes gekreuzt. Es wurden 80 „Jumpstarterkreuzungen“ in Einzelkreuzungen angesetzt. Aus dieser Kreuzung resultierte eine Vielzahl an weißäugige Nachkommen. Aufgrund des Verlustes des Augenmarkers handelte es sich bei diesen Nachkommen um Fliegen, bei denen ein P-Element-Exzisionsereignis stattgefunden hatte (im Folgenden „JumpOut“-Linien genannt). Da durch eine unpräzise Exzision eines P-Elementes Deletionen entstehen können, wurden diese Linien zunächst auf Letalität, Vitalität und ggf. auf Sterilität getestet. Insgesamt wurden 70 unabhängige „JumpOut“-Linien etabliert. 13 dieser Linien konnten als letal charakterisiert werden, 57 waren homozygot lebensfähig und fertil.

5.3.2 Kreuzungsgenetische Charakterisierung der homozygot letalen „JumpOut“-Linien, Komplementationstests

Aufgrund ihrer Letalität konnten 13 identifizierte Linien in Komplementationstests zum *rolling pebbles* Genort getestet werden. Ein Überblick der Ergebnisse aus den Komplementationskreuzungen ist in Tabelle 5.1 gegeben.

Um zu erfahren, ob sich zwei Mutationen in trans komplementieren, wurden in der Parentalgeneration die jeweils balancierten und mit dem Marker *Stubble* (*Sb*) markierten „JumpOut“-Chromosomen untereinander und mit *rols* Allelen gekreuzt. In der Filialgeneration 1 (F1) der Kreuzungen wurden die Nachkommen auf das Vorhandensein des Balancermarkers *Sb* untersucht. Waren Fliegen ohne diesen Marker lebensfähig, so komplementierten sich die Mutationen auf beiden Chromosomen und waren nicht allelisch zueinander. Schlüpfen in der F1 nur Tiere mit *Stubble*-Borsten, sollten die Mutanten allelisch sein.

Tabelle 5.1: Komplementationstest der letalen „JumpOut“-Linien untereinander.

	EP* 2 c	EP* 4 a	EP* 15b	EP* 17a	EP* 20a	EP* 20b	EP* 35a	EP* 35b	EP* 35e	EP* 58a	EP* 58d	EP* 79b	EP* 88a
Df(3L) BK9	+	+	- m.st.	-	+	+	+	- st.	- st.	+	-	-	-
EP(3) 3330	+	+	- m.st.	-	+	+	+	- st.	- st.	-	-	-	-
Rols xx117	+	+	- m.st.	-	+	+	+	- st.	- st.	-	-	-	-
EP*2c		+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-
EP*4a			-	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-
EP*15b				-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
EP*17a					-	-	-	-	-	-	-	-	-
EP*20a						+	+	-	-	+	-	-	-
EP*20b							+	-	-	+	-	-	-
EP*35a								-	-	+	-	-	-
EP*35b									-	-	-	-	-
EP*35e										-	-	-	-
EP*58a											-	-	-
EP*58d												-	-
EP*79b													+

Pluszeichen stehen für Allelie, Minuszeichen bedeuten nicht-allelisches Verhalten. Sterile Linien werden mit „st.“ gekennzeichnet. Im Falle einer männlichen Sterilität wird dies mit „m.st.“ bezeichnet. Sonstige Besonderheiten werden im Text erläutert. EP(3)3330-JumpOut Linien werden abgekürzt mit EP* bezeichnet

Es stellte sich heraus, dass 6 dieser Linien allelisch zur *rols* Defizienz und zu anderen *rols* Allelen sind und somit potentielle *rols* Allele darstellen (EP(3)3330*2c; 4a; 20a; 20b; 35a; 58a). Hierbei handelte es sich um 5 unabhängige Allele, während die Linien EP(3)3330*20a und 20b Geschwisterlinien sind, bei denen es sich um dasselbe Exzisionsereignis handeln könnte. Aufgrund der fehlenden Komplementation dieser 6 potentiellen *rols* Allele untereinander stellen sie eine Komplementationsgruppe dar. Einzig die Linie EP(3)3330*58a weicht in ihrem allelischen Verhalten von den anderen ab und könnte einer weiteren Komplementationsgruppe zugeordnet werden. Dies wird in Abschnitt 5.3.5 ausführlich besprochen.

4 homozygot letale JumpOut-Linien (EP(3)3330*17a, 58d, 79b und 88a) waren nicht allelisch zu den gestesteten *rols* Allelen. In diesen Fällen war davon auszugehen, dass es sich in Folge der P-Element Remobilisierung um neu induzierte Letalfaktoren außerhalb der *rols* Defizienz handelt. Die letalen Mutationen in diesen Linien können unterschiedlichen Komplementationsgruppen zugeordnet werden. Einzig die Linien

EP(3)3330*79b und EP(3)3330*88a tragen zumindest eine sich nicht-komplementierende Mutation und sind somit allelisch zueinander. Die weiteren letalen Mutationen EP(3)3330*17a und EP(3)3330*58d fallen in individuelle Komplementationsgruppen.

Drei Linien (15a, 35b und 35e) zeigten Fertilitätsdefizite. Wurden die mutierten Chromosomen über das *rols*-defiziente Chromosom gekreuzt, waren die Nachkommen allerdings fertil und homozygot lebensfähig, was bedeutet, dass die Sterilität durch eine Mutation außerhalb der Defizienz bedingt sein muss. Diese Linien wurden aufgrund ihres Infertilitäts-Phänotyps nicht weiter bearbeitet.

5.3.3 Das somatische Mesoderm ist defekt in den homozygot letalen „JumpOut“-Linien

Das zu remobilisierende EP-Element inseriert im 2. Intron von *rolling pebbles 7* (siehe Abbildungen 2.1 und 5.4.1). Die gewünschte Deletion sollte einen größeren Teil des zum *rols6* Transkriptes gehörenden Bereiches entfernen, aber keineswegs die kodierenden Bereiche des *rols7* Transkriptes betreffen. Die Analyse des Mesoderms mit Hilfe des β 3-Tubulin Antikörpers (Leiss et al., 1988) verdeutlichte, dass die „JumpOut“-Linien, die sich allelisch zum *rolling pebbles* Genort verhalten, einen Fusionsphänotyp aufwiesen (siehe Abbildung 5.5 A-E). In den EP*-Linien können vereinzelt dünne, aber lang gestreckte Muskelstränge beobachtet werden (Abbildung 5.5 A-E). In den Detailvergrößerungen A'-E' wird deutlich, dass es einer großen Anzahl an Myoblasten nicht möglich war, zu fusionieren. Diese unfusionierten Myoblasten formieren sich entlang der schon gebildeten dünnen Fasern (siehe Abbildung 5.5 C'-D') oder aber bleiben segmental in Gruppen in Nähe schon gebildeter Muskeln liegen (siehe 5.5 B'). Aufgrund dieser Muskelphänotypen sind diese Linien nicht als *rols6* spezifische Mutationen anzusehen, da die durch P-Element Remobilisation generierten letalen Linien ebenso das lange, mesodermspezifische Transkript *rols7* betreffen.

Diejenigen Linien, welche sich als Letalmutationen außerhalb der *rols* Defizienz und deshalb nicht mehr allelisch zum *rols* Genort herausstellten, zeigten in β 3-Tubulin Antikörperfärbungen keine Muskelfusionsstörungen. Die Körperwandmuskulatur dieser Embryonen erscheint jedoch morphologisch aberrant. (Exemplarisch dargestellt ist die Körperwandmuskulatur der Linie EP(3)3330*17a in Abbildung 5.5 F und F'). Diese Störungen wurden in den weiteren Untersuchungen nicht weiter spezifiziert.

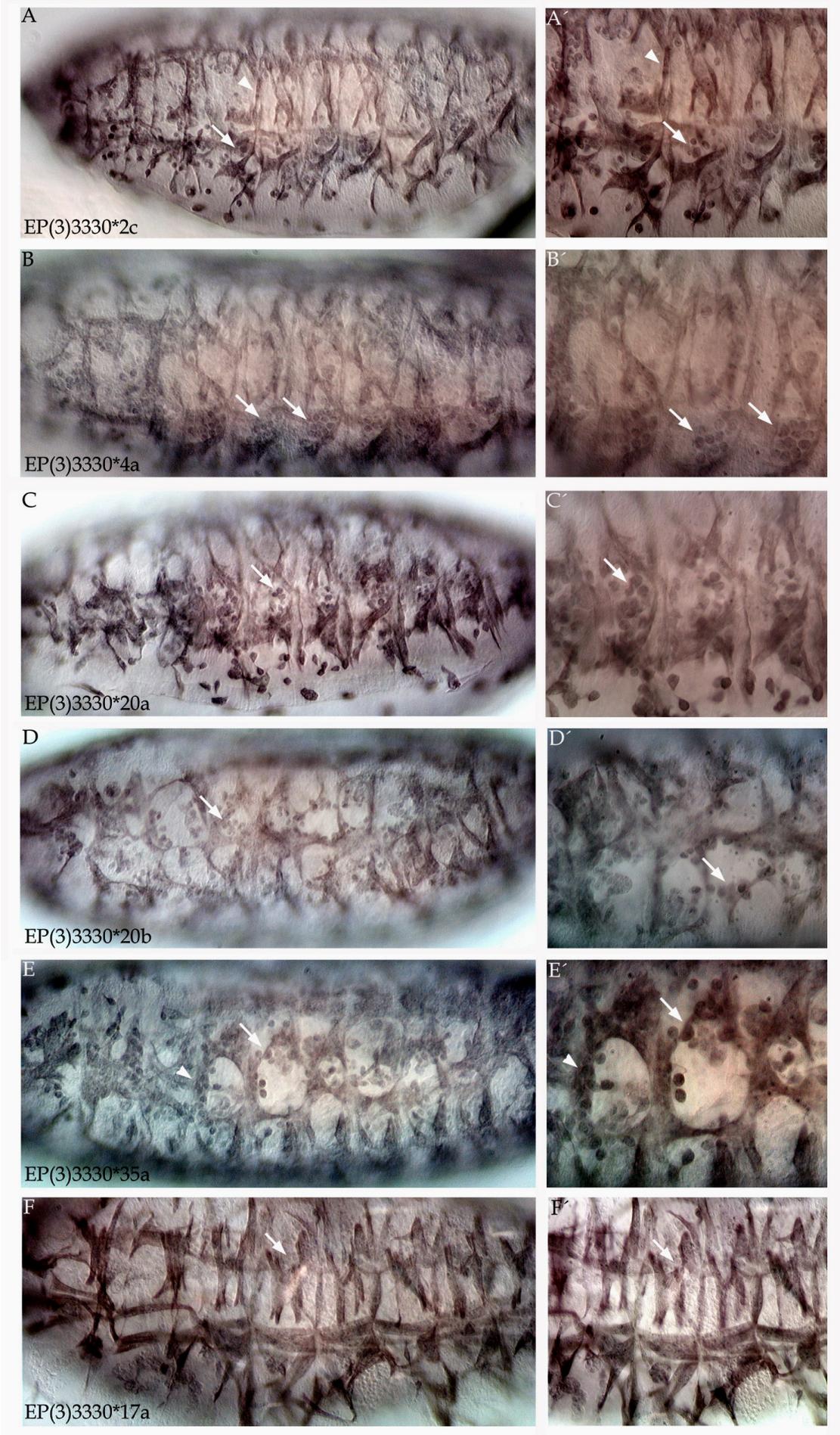


Abbildung 5.5: Die generierten, homozygot letalen „JumpOut“-Linien zeigen Defekte in der Muskelfusion der Körperwandmuskulatur. Gezeigt sind anti- β 3 Tubulin Antikörperfärbungen. Alle Embryonen befinden sich im Stadium 16. In A-F sind Übersichtsaufnahmen der somatischen Muskulatur, in A'-F' Detailvergrößerungen gezeigt. Die Körperwandmuskulatur der JumpOut-Linien EP(3)3330*2c (A), EP(3)3330*4a (B), EP(3)3330*20a (C), EP(3)3330*20b (D) und EP(3)3330*35a (E) ist defekt und weist Fusionsstörungen auf (A'-E'). Neben dichten Gruppierungen von unfusionierten Myoblasten (durch Pfeile exemplarisch markiert) sind auch lang gestreckte, dünne Muskelstränge zu sehen (Pfeilspitzen), die den elongierten Precursor-Zellen entsprechen dürften, welche für den *rols* Phänotyp charakteristisch sind. Linie EP(3)3330*17a (F) trägt eine Letalmutation außerhalb der *rols* Defizienz und weist keine Fusionsdefekte, sondern lediglich Störungen im Muster der somatischen Muskulatur auf.

5.3.4 Die Malpighischen Gefäße der homozygot letalen EP*-, „JumpOut“-Linien werden nahezu wildtypisch ausgebildet

Alle letalen, zum *rols* Locus allelischen Linien, weisen Myoblastenfusions-Defekte auf (siehe Abbildung 5.5). Um zu verifizieren, ob ein Phänotyp durch eine P-Element Insertion verursacht wird, ist es in der Regel möglich, mittels einer Remobilisierung des P-Elementes den Phänotyp zu revertieren. In diesem Fall wird das P-Element präzise aus dem Genom entfernt und der geschädigte DNA-Bereich repariert. In einigen Fällen können aber durch die Entfernung eines P-Elementes auch geschädigte, nicht präzise reparierte DNA-Bereiche zurückbleiben. Dadurch entstehen Deletionen, die homozygot zur Letalität der Embryonen führen können. Die generierten EP*-, „JumpOut“-Linien wurden bisher nicht molekular charakterisiert. Um Informationen über den Phänotyp der Malpighischen Gefäße in diesen EP*-Linien zu erhalten, wurden sie mit anti-Fasciclin II und anti-Cut Antikörpern behandelt. Aus diesen Färbungen wurde ersichtlich, dass der in den *rols* Allelen beschriebene Phänotyp der Malpighischen Gefäße in den homozygot letalen „JumpOut“-Linien revertiert wurde. Die anterioren Gefäße wachsen zwar im Stadium 15 nicht 100 %ig wildtypisch in die anterioren Abdominalsegmente (Abb. 5.6 C, E, G, J im Vergleich zu A), aber in Stadium 16 Embryonen erscheinen diese Gefäße ausreichend elongiert, weisen zudem ihre typische Morphologie auf und nehmen in etwa die wildtypische Position in der Körperhöhle ein (siehe Abb. 5.6 D, F, H, K). Nur wenige Embryonen zeigten geringe Defekte, wie exemplarisch am schlaufenförmigen Wachstum eines anterioren Gefäßes der Linie EP(3)3330*20a (Abb. 5.6 H, vergrößert in I) gezeigt ist.

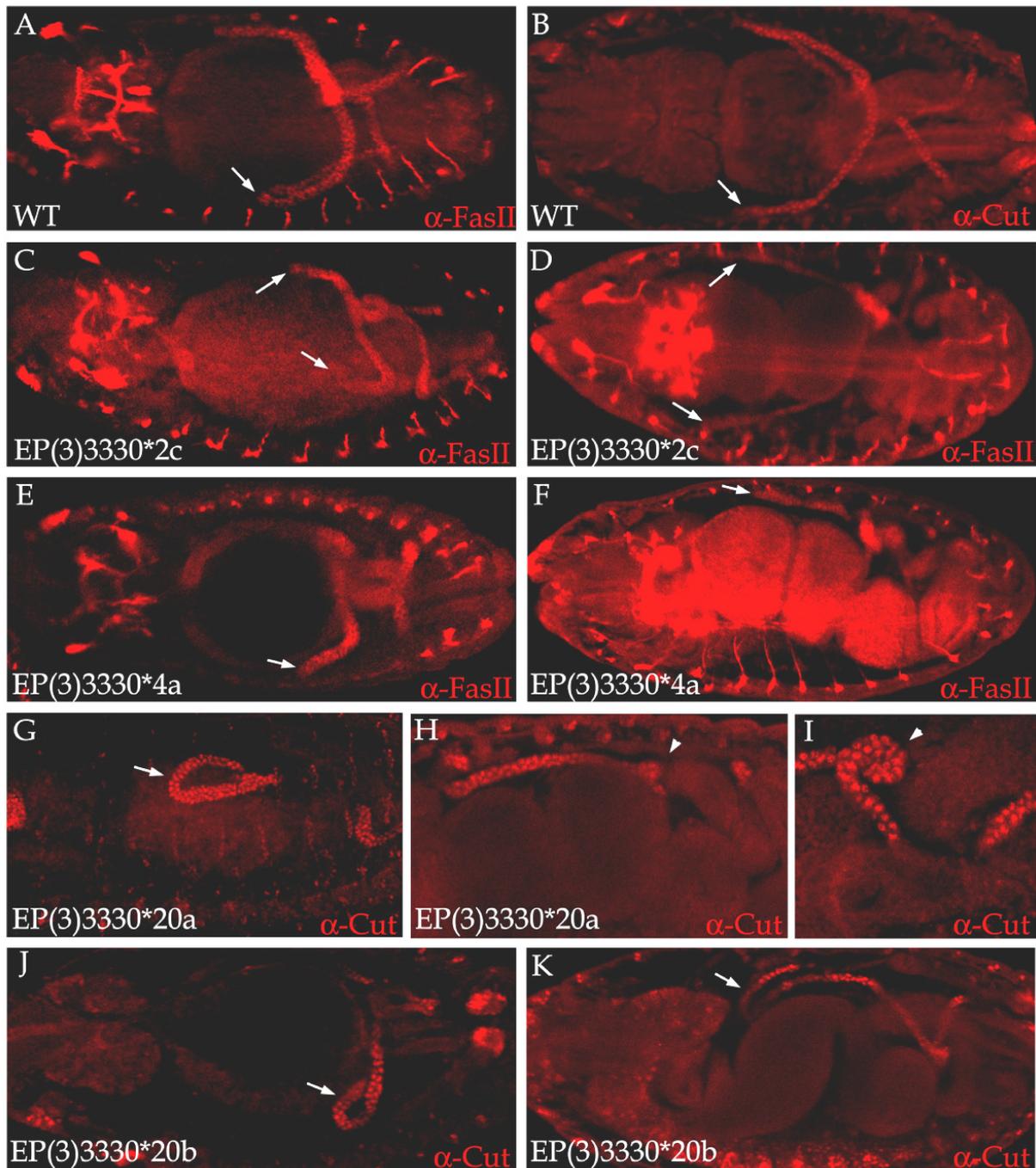


Abbildung 5.6: Die Entwicklung der Malpighischen Gefäße der homozygot letalen „JumpOut“-Linien ist nicht gestört. Dargestellt sind α -FasII und α -Cut Antikörperfärbungen zur Darstellung der Malpighischen Gefäße. A und B Wildtypembryonen im Stadium 15 (A) und 16 (B). In C-K sind die entsprechend EP*-Linien gezeigt. In C, E, G und J Stadium 15 Embryonen, in D, F, H, K Embryonen im Stadium 16. Die Malpighischen Gefäße dieser Linien weisen kaum Defekte in Zellanordnung und Orientierung auf. Die anterioren Gefäße wachsen zwar zeitlich verzögert (vgl. WT Stadium 15 mit C, E, G, J), erreichen aber im Stadium 16 die anterioren Abdominalsegmente (Pfeile). Nur wenige Embryonen zeigen geringe Defekte, wie in H, I angezeigt (Pfeilspitze in H, vergrößerte Darstellung in I).

Diese Befunde weisen darauf hin, dass der in der Ausgangslinie EP(3)3330 beschriebene Phänotyp der Malpighischen Gefäße durch die EP-Element-Insertion hervorgerufen wurde. Da in den „JumpOut“-Linien dieser Phänotyp revertiert ist, die Muskulatur aber weiterhin den Fusionsphänotyp zeigt, kann nur eine molekulare

Analyse weitere Aufschlüsse über eventuell neu induzierte Mutationen, welche das mesodermspezifische Transkript *rols7* betreffen, erbringen. Da aber die MpG in diesen Linien keine gravierenden Defekte aufweisen, scheint die Remobilisierung des P-Elementes keine größeren Schäden im Genom dieser Linien hinterlassen zu haben.

5.3.5 Phänotypische Analyse der „JumpOut“-Linie EP(3)3330*58a

Wie in Abschnitt 5.3.2 angedeutet, weicht die Linie EP(3)3330*58a in den Komplementationstests in ihrem Allelieverhalten zu den *rols* Allelen von den anderen, neu erzeugten potentiellen Allelen ab. Wie in der Tabelle 5.1 deutlich wird, fällt die Mutation dieser Linie durchaus noch in den Bereich der Defizienz. Sie ist allerdings nicht allelisch zur Ausgangslinie EP(3)3330 und zu dem EMS-Allel *rols*^{xx117}. Ebenso verhält sie sich allelisch zu allen anderen Allelen dieser Komplementationsgruppe, jedoch nicht zu den letalen Linien, welche einer Komplementationsgruppe außerhalb der *rols* Defizienz zugeordnet wurden. Auch verhält sie sich zu ihrer Geschwisterlinie EP(3)3330*58d nicht allelisch, wonach hier von zwei individuellen „JumpOut“-Ereignissen auszugehen ist (siehe Tabelle 5.3).

Dies bedeutet, dass der Letalfaktor innerhalb der *rolling pebbles* Defizienz und wegen der Allelie zu den weiteren, neu erzeugten EP*-Linien im *rolling pebbles* Genlocus zu suchen sein muss. Da er aber zum *rols*^{xx117} Allel und zum Ausgangs P-Element EP(3)3330 nicht mehr allelisch ist, wurde die Linie EP(3)3330*58a gesondert phänotypisch betrachtet. Hierbei wurde ersichtlich, dass das somatische Mesoderm in dieser Linie ebenso stark betroffen ist, wie es auch für alle anderen „JumpOut“-Linien, die allelisches Verhalten zum *rols* Genort zeigen, beschrieben werden konnte (siehe Abbildung 5.7 B). Störungen des Mitteldarms waren nicht zu erkennen (Abbildung 5.7 A) und auch der Phänotyp der MpG erschien auf den ersten Blick zur Wildtypsituation revertiert (angedeutet in Abbildung 5.7 A). Eine genauere Analyse der MpG anhand eines anti-Cut und anti-Tsh Doppelnachweises verdeutlichte, dass die anterioren Gefäße ihre Position in den ersten Abdominalsegmenten einnehmen und nahezu wildtypisch auswachsen. Im Gegensatz zu den anderen „JumpOut“-Linien (gezeigt in Abbildung 5.6) stellt sich die Morphologie der Gefäße allerdings nicht schlank und wildtypisch dar. In Stadium 16 Embryonen dieser Linie scheinen sich teilweise gebildete Zellgruppierungen nicht aufzulösen und dadurch erscheinen die Gefäße partiell verdickt und verknäult (Pfeilspitze in 5.7 C).

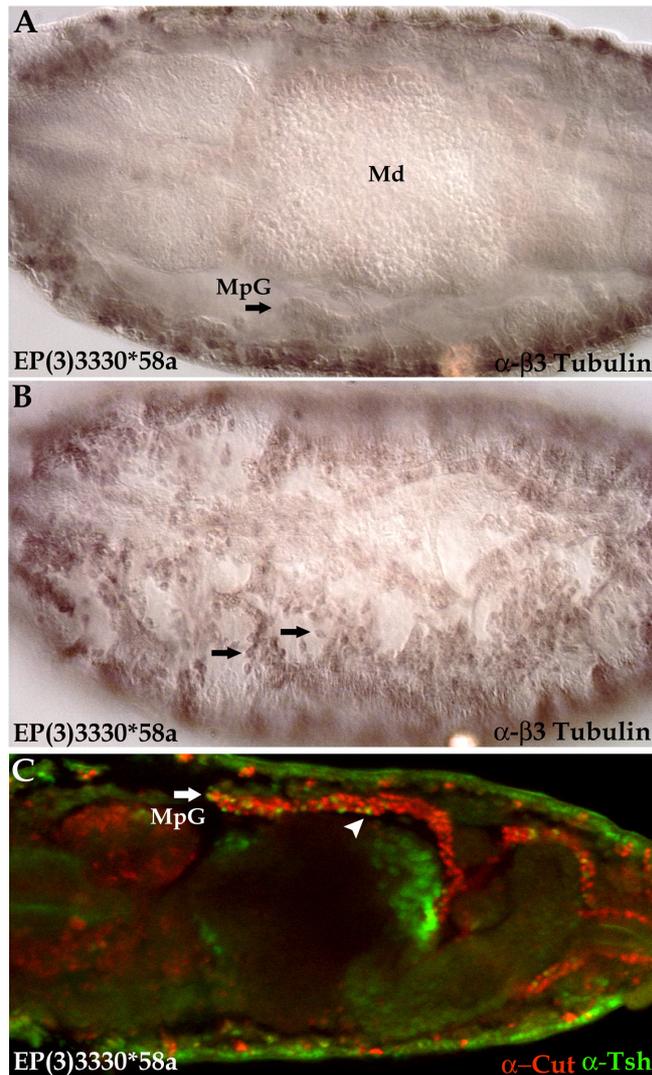


Abbildung 5.7: Die EP*-„JumpOut“-Linie EP(3)3330*58a weist neben Muskelfusions-Defekten auch einen schwachen Phänotyp der MpG auf. Dargestellt ist exemplarisch ein Embryo des Stadiums 16 in der lichtmikroskopischen Durchsicht (A) und nach Antikörperfärbung gegen β 3-Tubulin (B) bzw. gegen Cut (rot in C) und Tsh (grün in C). In A ist zu erkennen, dass der Mitteldarmbereich (Md) keine offensichtlichen Schäden aufweist. Die MpG (Pfeil in A) erreichen ihre wildtypische Endposition, allerdings scheint das Zellgefüge in geringem Maße gestört zu sein, da kleinere Zellgruppierungen nicht aufgelöst wurden (Pfeilspitze in C). B) Das somatische Mesoderm weist Fusionsdefekte auf (die Pfeile weisen auf unfusionierte Myoblasten der dorsalen Muskulatur).

Da auch diese Linie bisher nicht molekular charakterisiert wurde, kann über diese vergleichsweise schwache phänotypische Auswirkung auf das Entwicklungsverhalten der MpG kein definitives Urteil gefällt werden. Wahrscheinlich ist aber, dass diese Linie neben einer Mutation, welche das *rols7* Transkript betrifft, zusätzlich eine oder mehrere, auch das *rols6* Transkript betreffende Mutationen trägt. Wie die Komplementationsgruppe allerdings zustande gekommen ist, kann nur eine molekulare Analyse klären.

5.3.6 Die vitale „JumpOut“-Linie EP(3)3330*5a stellt eine *rols6* spezifische Deletionsmutante dar

Die phänotypische Charakterisierung der letalen „JumpOut“-Linien ergab, dass es sich bei den neu erzeugten potentiellen *rols* Allelen vermutlich nicht um *rols6* spezifische Allele handelt. Damit konzentrierten sich die folgenden Untersuchungen auf die erhaltenen vitalen Linien.

Mittels einer auf PCR basierenden Strategie wurde an genomischer DNA dieser Linien mit Oligonukleotiden, welche die P-Element-Insertionsstelle flankierten, ein DNA-Fragment amplifiziert und die Sequenzen mit wildtypischer genomischer DNA verglichen. Das mit den Primern ROSHP+610 (forw, Primer) und LDIISP (rev. Primer) amplifizierte Wildtyp-DNA-Fragment hatte eine Größe von 2800 bp. An genomischer DNA der vitalen „JumpOut“-Linie EP(3)3330*5a konnte ein ca. 1500 bp kleineres Fragment amplifiziert werden (Abbildung 5.8). Ein Sequenzvergleich ergab, dass in dieser Linie eine Deletion von 1570 bp stromaufwärts der P-Element-Insertionsstelle erzeugt worden war. Dieser Sequenzverlust erstreckt sich relativ zum Transkriptionsstart (+1) von Position -64 bis -1632, was bedeutet, dass die beiden spezifischen *rols6* Exons mitsamt Transkriptionsstart im 1. Exon und Translationsinitiationsstelle im 2. Exon nicht betroffen sind.

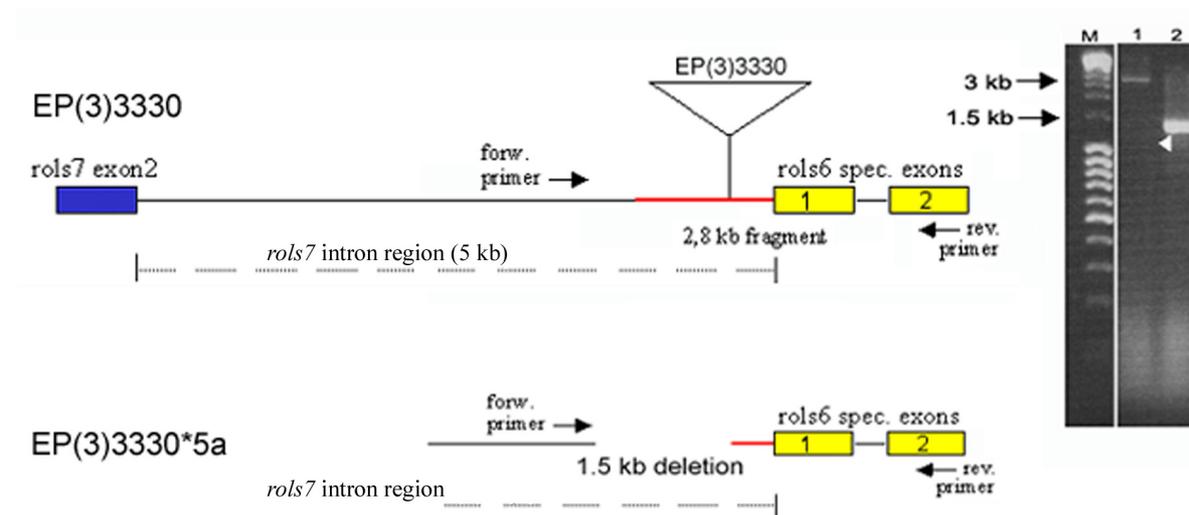


Abbildung 5.8: Schematische Darstellung der genomischen Region zwischen dem 2. spezifischen *rols7* Exon und den *rols6* spezifischen Exons. EP(3)3330 inseriert 60 bp stromaufwärts der Transkriptionsinitiationsstelle von *rols6*. Die Primer (forw.: ROSH PI+610; rev.: LDIISP 2) wurden so gewählt, dass sie einen Großteil der genomischen Region um die EP-Element-Insertionsstelle flankieren und amplifizieren in einer PCR an genomischer Wildtyp-DNA ein Fragment von 2,8 kb (Spur 1). Das Amplifikat an genomischer DNA, isoliert aus EP(3)3330*5a, läuft im Agarosegel etwa 1,5 kb niedriger, als das WT-Fragment (Spur 2), was bedeutet, dass in dieser Linie eine Deletion von ca. 1500 bp erzeugt wurde.

5.3.7 Charakterisierung der Deletionslinie EP(3)3330*5a

Um zu überprüfen, ob der für *rolling pebbles* Allele beschriebene Phänotyp in den Malpighischen Gefäßen einer mutierten *rols6* Form zuzuschreiben ist, wurde die Deletionslinie EP(3)3330*5a mittels geeigneter Marker für mesodermale Derivate (Abbildung 5.9 C) und für die Malpighischen Gefäße (Abbildung 5.10) phänotypisch untersucht.

5.3.7.1 Mesodermale Derivate sind in EP(3)3330*5a nicht betroffen

Bei der Analyse der Linie EP(3)3330*5a mittels β 3-Tubulin und Fasciclin III Antikörperfärbung (FasIII, Patel et al., 1987) zeigte sich, dass die somatische Muskulatur keinerlei Störungen aufweist (Abbildung 5.9 A-D). Das viszerale Mesoderm, dargestellt durch den FasIII Antikörper ist ebenso nicht gestört (Abbildung 5.9 E und F). Demzufolge sind in EP(3)3330*5a diese Derivate des Mesoderms nicht betroffen.

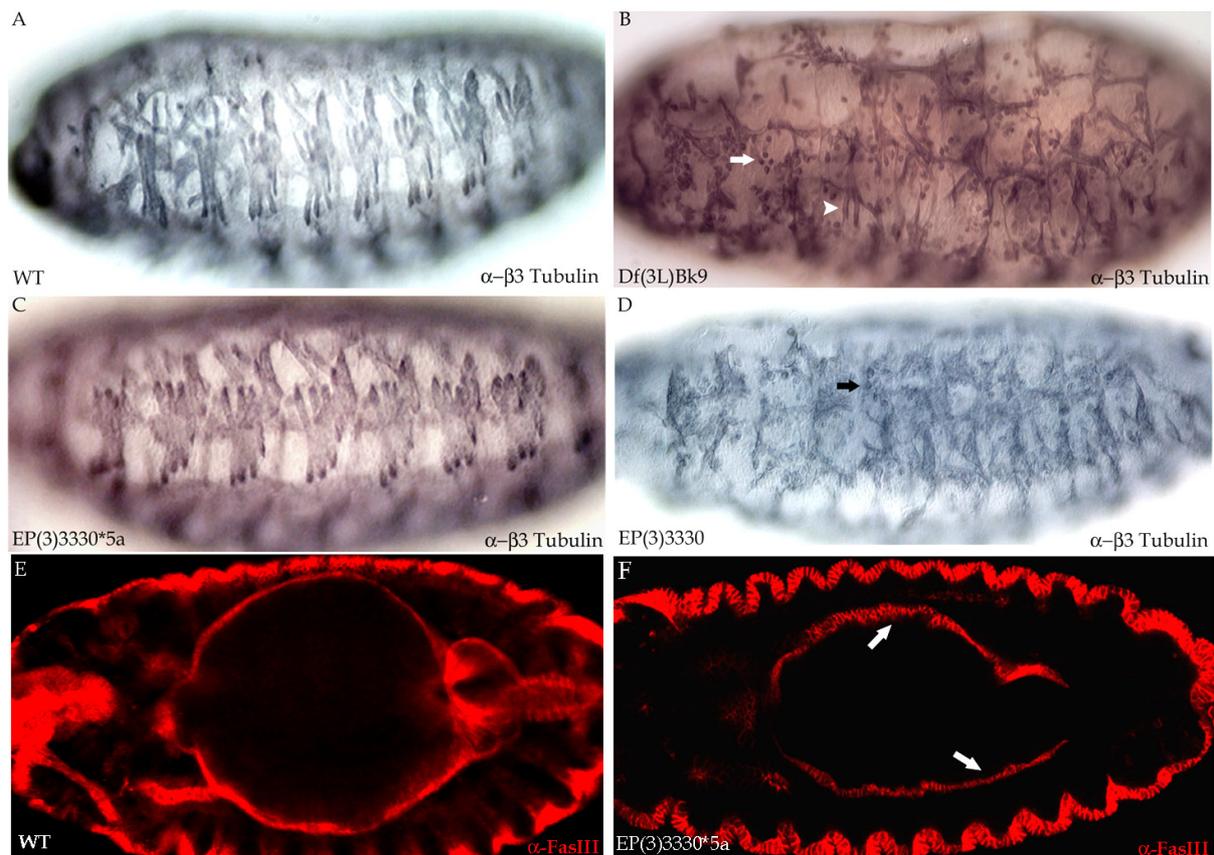


Abbildung 5.9: Die Deletionslinie EP(3)3330*5a weist keine Störungen in mesodermalen Derivaten auf. Gezeigt werden α - β 3-Tubulin Antikörperfärbungen an A) Wildtyp, B) Df(3)BK9, C) EP(3)3330*5a, D) EP(3)3330 (P-Element JumpOut Ausgangslinie) Embryonen im Stadium 16. Während die *rols* Defizienz und die Ausgangs-P-Elementlinie die beschriebenen Muskelfusionsstörungen aufweisen (B und D; Pfeile weisen auf unfusionierte Myoblasten, Pfeilkopf in B markiert zu Mini-Muskeln elongierte Precursor-Zellen), wird in EP(3)3330*5a Embryonen die Bewegungsmuskulatur störungsfrei gebildet. E und F: α -Fasciclin III Antikörperfärbungen an WT (E) und EP(3)3330*5a Embryonen im Stadium 15. Das viszerale Mesoderm wird in EP(3)3330*5a Embryonen lückenlos gebildet (Pfeile in F) und weist keinerlei Defekte auf (F).

5.3.7.2 EP(3)3330*5a Embryonen zeigen Entwicklungsstörungen der Malpighischen Gefäße

Bei der phänotypischen Betrachtung der Malpighischen Gefäße des vitalen „JumpOut“-Allels EP(3)3330*5a konnten die Befunde aus den Betrachtungen der *rol/s* Allele bestätigt werden. Auch in diesem, für das *rol/s6* Transkript putativ spezifischen Allel, konnte ein Defekt in der Morphogenese der Gefäße beschrieben werden. Die Anlagen der Gefäße und die ersten Elongationsstadien werden in gleichem Maße wie in den beschriebenen *rol/s* Allelen ausgebildet (Abbildung 5.10 B, vergleiche auch Abbildung 5.2 A). Erst in späteren Embryonalstadien manifestiert sich der Phänotyp. Auch in dieser Linie bilden sich während der Elongationsphase der MpG Zellgruppierungen, welche die anterioren Gefäße teilweise verdickt erscheinen lassen. Im Stadium 15 elongieren die Gefäße unvollständig und erreichen nicht ihre endgültige Position in den ersten Abdominalsegmenten des Embryos (Abbildung 5.10 C). In Stadium 16 Embryonen bilden die anterioren Gefäße schlaufen- oder lassoähnlichen Strukturen (C, D) aus und werden in den posterioren Abdominalsegmenten der EP(3)3330*5a Embryonen arretiert.

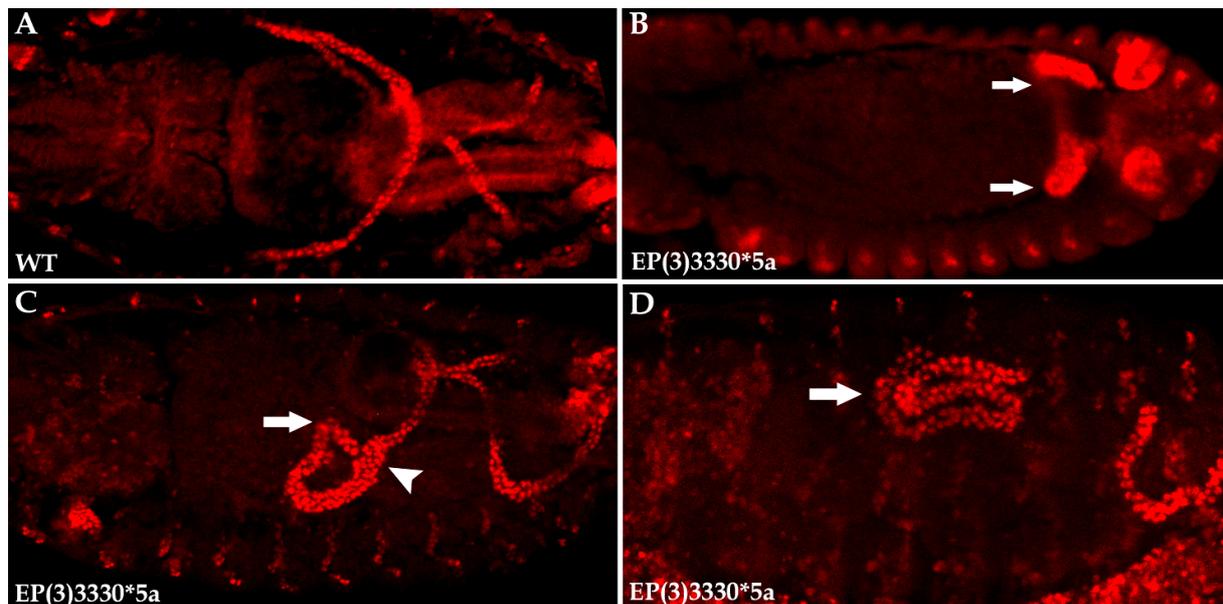


Abbildung 5.10: Die anterioren Malpighischen Gefäße der Deletionslinie EP(3)3330*5a elongieren fehlgeleitet. Dargestellt sind die Malpighischen Gefäße mittels anti-Cut Antikörpers. A) Wildtyp Embryo im Stadium 16. C)-D) EP(3)3330*5a Embryonen im Stadium 13 (B) und 16 (C und D). Die Anlagen der MpG entwickeln sich wildtypisch in der Deletionslinie (B, vgl. auch Abb. 5.2 A). In Stadium 16 Embryonen werden aber die Defekte in der Gewebestruktur (Pfeilspitze in C) und das desorientierte, schlaufenförmige Wachstum der MpG (D) im vgl. zum Referenzstadium 16 eines Wildtyp Embryos (in A) deutlich.

5.4 In den Malpighischen Gefäßen von *rolling pebbles* Mutanten sind Principal-Zellen und Stellate-Zellen detektierbar

Wie in Abschnitt 2.3.2 beschrieben, setzen sich die Malpighischen Gefäße von *Drosophila* generell aus zwei Zellpopulationen zusammen. Dabei stellen Typ I Zellen (Principal-Zellen; PCs) den größeren Anteil und bilden die eigentlichen Gefäße. In dieses Gewebe werden zusätzlich noch Stellate-Zellen (Typ II, SCs) integriert. Neben den unterschiedlichen physiologischen Aufgaben der Zellen ist seit den Arbeiten von Denholm et al., 2003 bekannt, dass sie sich zudem aus unterschiedlichen Anlagen rekrutieren. Während die PCs die eigentliche Anlage ektodermaler Herkunft darstellen, werden die SCs aus dem caudalen Mesoderm ausgegliedert, welches auch die Anlage der longitudinalen viszeralen Muskulatur enthält. Nach Migration werden sie dann in das Malpighische Gewebe integriert (Denholm et al., 2003). Diese mesodermale Herkunft ließ vermuten, dass eine Ursache für den Phänotyp in den Malpighischen Gefäßen von *rols* Mutanten im Verlust dieser Zellen zu finden sein könnte. Dies wurde mittels Antikörperfärbung gegen das Teashirt Protein (Tsh) überprüft, wodurch spezifisch die SCs ab dem Embryonalstadium 15 markiert werden. Anhand anti-Tsh-, anti-Cut Doppelfärbungen konnte die Existenz dieser Zellen in der *rolling pebbles* Defizienz und in der *rols6* spezifischen Deletion EP(3)3330*5a nachgewiesen werden (siehe Abbildung 5.11 B und C). In den entsprechenden Stadien scheinen die SCs prinzipiell in das Gewebe integriert zu werden. Ob sie eventuell zahlenmäßig von der Wildtypsituation reduziert vorkommen konnte nicht ermittelt werden.

5.5 Entwicklungsstörungen der Malpighischen Gefäße in *Myoblast city* mutanten Embryonen

Myoblast city (*mbc*) Mutanten zeichnen sich durch starke Defekte in der Entwicklung der Körperwandmuskulatur aus und werden zu den Muskelfusionsmutanten gezählt. Ebenso betroffen sind in diesen Mutanten der Dorsalschluss und allgemeine Vorgänge in der Zytoskelettorganisation in einer Vielzahl von Geweben (u.a. auch in der Myoblastenfusion der somatischen Muskulatur), was auf eine essentielle Funktion des Mbc Proteins während dieser Entwicklungsvorgänge zurückzuführen ist (Erikson et al., 1997). Eine solche Rolle in der Entwicklung der Malpighischen Gefäße wurde bisher für Mbc nicht beschrieben. Eine Beteiligung von Mbc in der Entwicklung dieser Organe war allerdings auf Grund einer ersten Beschreibung von fehlgeleiteten Gefäßen in der Körperhöhle von *mbc* mutanten Embryonen (Ainsworth et al., 2000) wahrscheinlich. Im Hinblick auf die *in vitro* beschriebene Interaktion der Proteine Myoblast City und Rolling Pebbles (Chen und Olson, 2001) wurden die

Malpighischen Gefäße dieser Mutante mittels anti-Cut Antikörperfärbung auf Entwicklungsstörungen untersucht und mit denen der *rols* Allele verglichen.

Es stellte sich heraus, dass der Verlust von *mbc* ebenfalls in desorientiert auswachsenden anterioren Gefäßen resultiert. Während der ersten Embryonalstadien werden alle Schritte zur Gefäßbildung und -verlängerung durchlaufen. Ab Stadium 15 werden die Gefäße durch ihr rückwärts gerichtetes Wachstum in der posterioren Körperhälfte des Embryos arretiert. Im Vergleich zu der Situation in *rolling pebbles* Allelen wurde allerdings kein anteriores Gefäß gefunden, das eines der ersten Abdominalsegmente erreichte.

Zellgruppierungen, die zur partiellen Verdickung der Gefäße führen, werden, wie für *rols* Mutanten des Stadiums 15 beschrieben, in *mbc* Embryonen nicht gebildet. Die Gefäße weisen die normale Morphologie auf, werden allerdings im anterior gerichteten Wachstum gehindert. Im Hinblick auf die Zellpopulationen innerhalb der Gefäße war bisher nicht bekannt, ob dieser Defekt auf den Verlust einer spezifischen Zellpopulation, z.B. der SCs, zurückzuführen ist. Mittels *teashirt*-Expression in den MpG konnte nachgewiesen werden, dass dies nicht der Fall ist (Abbildung 5.11 D). Die Anzahl der PCs in diesen Gefäßen scheint nicht betroffen zu sein. Auch sind SCs in den Gefäßen detektierbar. Allerdings schienen diese in ihrer Anzahl reduziert, was aber nicht statistisch belegbar war. Die mesodermalen Zellen des longitudinalen viszeralen Mesoderms sind also trotz des *mbc* mutanten genetischen Hintergrundes in der Lage zu migrieren und sich dem Zellverband der MpG anzuschließen. Ob die Migrationsfähigkeit eingeschränkt ist, oder ob die vermutete Zellreduzierung auf einem Zellteilungsdefekt beruht, ist noch zu klären.

5.6 Die Malpighischen Gefäße in *rac1/rac2*-Doppelmutanten sind in ihrer Entwicklung gestört

Für die Proteine Rolling pebbles und Myoblast city konnte *in vitro* eine direkte Interaktion gezeigt werden (Chen and Olson, 2001). Aus Säugerzellkulturen und Vertebraten-Modellorganismen ist die Wirkungsweise eines Myoblast city beinhaltenden Proteinkomplexes auf Rac-vermittelte Migrationsvorgänge und auf die Zytoskelett-Reorganisation bekannt (Brugnera et al., 2002; Cote et al., 2002; Gumienny et al., 2001). Ebenso wie Mbc, wird Rac während der Myoblastenfusion von *Drosophila* eine essentielle Rolle zugeschrieben (Hakeda-Suzuki et al., 2002; Önel et al., in Vorbereitung).

Im Hinblick auf diese Zusammenhänge wurden *rac1/rac2*-Doppelmutanten (Ng et al, 2002) auf embryonale Entwicklungsstörungen der Malpighischen Gefäße untersucht. Unter Anwendung von anti-Cut und anti-Tsh Antigennachweisen konnte ein Phänotyp in den MpG auch in *rac1/rac2* Doppelmutanten gezeigt werden. Auch hier weisen die Gefäße das gleiche desorientierte Wachstumsverhalten auf, wobei die

anterioren Gefäße wiederum schlaufen- oder lassoartige Strukturen bilden und am Vorwärtswachstum gehindert werden. Die SCs scheinen in *rac1/rac2*-Doppelmutanten prinzipiell integriert zu werden. Allerdings waren sie in ihrer Anzahl leicht reduziert, was aber nicht durch eine Statistik belegt werden konnte, während die Gefäße aus einer wildtypischen Anzahl an PCs gebildet zu werden scheinen.

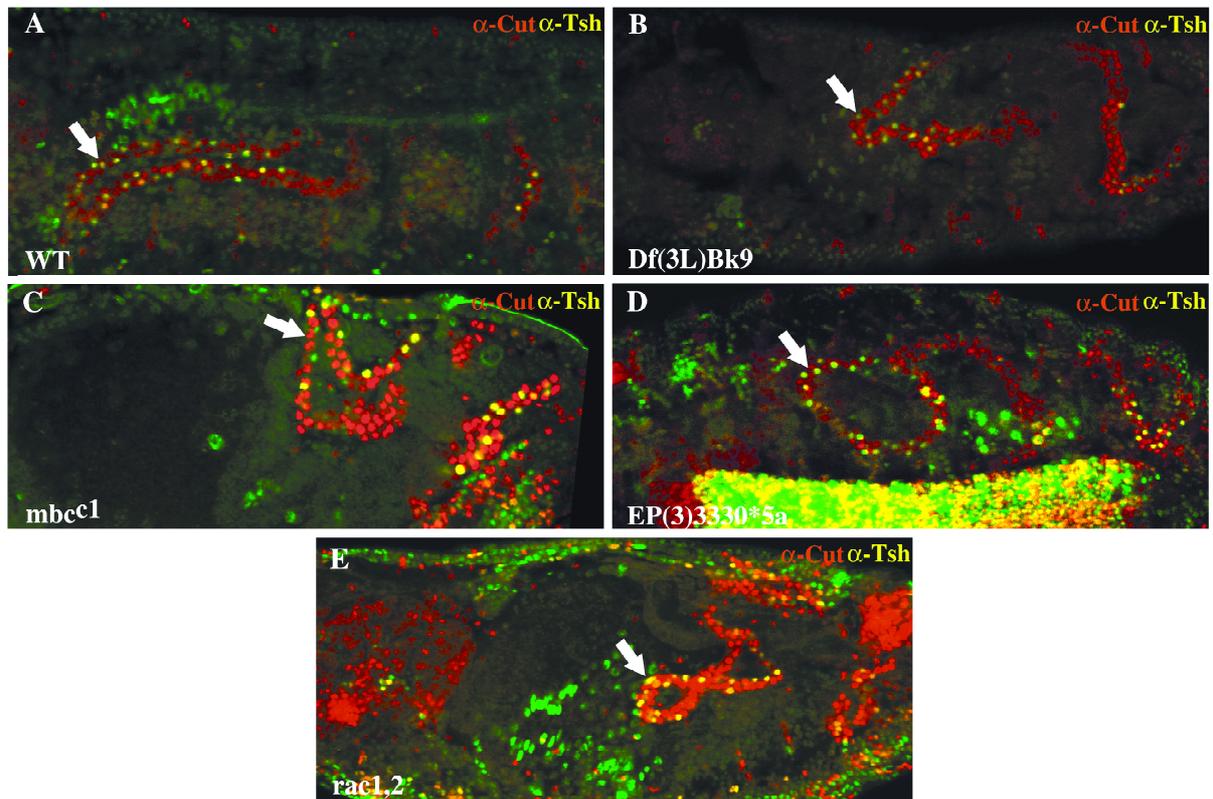


Abbildung 5.11: Morphologie und Integration von SCs in *rols*, *mbc* und *rac1/rac2* mutanten Embryonen. Dargestellt sind die MpG von Stadium 16 Embryonen mittels anti-Cut (rot, PCs) und anti-Tsh (gelb/grün, SCs) Antigendoppelnachweisen. **A:** In WT Embryonen sind PCs und SCs in regelmäßiger Formation im Initialsegment und im Hauptsegment der MpG angeordnet. Diese Formation ist in *rolling pebbles* mutanten Embryonen wegen der defekten Morphologie der PCs und wegen des abnormalen Wachstumsverhalten nicht mehr gegeben. SCs sind aber prinzipiell in der Lage, sich in die Gefäße zu integrieren (**B** und **D**). In *mbc* Mutanten (**C**) und *rac1/rac2* Doppelmutanten (**E**) stellt sich eine ähnliche Situation dar. Allerdings scheint hier die Anzahl der SCs in den MpG reduziert. (Pfeile weisen auf den Verlauf der anterioren Gefäße hin).

Diese phänotypischen Befunde geben Hinweise auf eine Beteiligung der Faktoren *Rols6*, *Mbc* und *Rac1/Rac2* in einer gemeinsamen Wirkkette, die für die Zellorganisation innerhalb der Malpighischen Gefäße und für die korrekte Ausrichtung und Lokalisation der Gefäße in der Körperhöhle essentiell ist.

5.7 Ansätze zum Nachweis des Rols6 Proteins

Der *rolling pebbles* Genort kodiert für zwei Proteine, welche sich nur im N-terminalen Bereich unterscheiden. Nachgewiesen wurde das mesodermale Protein Rols7 mittels generierter Peptidantikörper, die gegen den C-Terminus gerichtet waren (Kesper et al., in Vorbereitung; Menon und Chia, 2001). Durch diese Antikörper sollte sowohl *in vivo* als auch in Western Blot Analysen das kürzere Rols6 Protein ebenso detektierbar sein. Bisher wurde aber Rols6 weder *in vivo* noch in Western Blot Analysen mit diesen Antikörpern detektiert. Aufgrund des Phänotyps der für *rols6* spezifischen Deletionslinie und des *rols6* zugeschriebenen Phänotyps ist aber anzunehmen, dass die Isoform 6 des Gens *rolling pebbles* funktionstüchtig *in vivo* existiert. Um die Existenz eines Rols6 Proteins und die Funktion dieser Isoform zu verifizieren, wurden zwei Ansätze zur *in vivo* Detektion von *rols6* gewählt: 1.) die Expression eines Flag-Tag gekoppelten *rols6* Proteins mittels des UAS:Gal4 Systems und 2.) die Generierung eines *rols6* spezifischen Histidin markierten Fusionsproteins mittels des pBad/His Systems (Clontech).

5.7.1 Klonierung der Flag-Tag *rols6* cDNA

Die *rols6* cDNA (LDcDNA II in pBlueskript; Rau et al., 2001) besitzt eine einzelne Hind III Schnittstelle, welche es ermöglicht, das Plasmid zu linearisieren. Diese Schnittstelle liegt 77 bp stromabwärts des Translationsstarts im zweiten *rols6* Exon. An diese Stelle wurde ein künstliches Flag-Tag Oligonukleotid eingefügt. Dieses verfügte zusätzlich noch über eine Eco RI Schnittstelle, über die positive Klone identifiziert werden konnten, da bei Eco RI Restriktionsanalyse ein zusätzliches 0,6 kb großes DNA-Stück fragmentiert wurde. Aus positiven Klonen wurde mit zwei *rols6* spezifischen Primern („vorATGst“; „LD2SP2“) mittels PCR ein 300 bp großes Fragment amplifiziert, welches die Flag-Tag Insertionsstelle überspannte. Diese Fragmente wurden dann durch Sequenzanalyse überprüft. Der Klon „*rols6*FL4“ stellte sich als richtig orientierte Flag-Tag-Einfachinsertion heraus und war somit zur Weiterbearbeitung vorgesehen (siehe schematische Darstellung 5.12). Diese getagte cDNA sollte in einen UAS-Expressionsvektor umkloniert werden, um das Rols6 Protein indirekt in transgenen Fliegenlinien, welche das UAS-*rols6*FL4 Konstrukt tragen, über einen Flag-Antigennachweis zu detektieren. Geeignete Gal4-Treiberlinien stehen hierzu zur Verfügung, welche es ermöglichen, UAS-*rols6*FL4 im Endoderm und in den MpG zu exprimieren (arc-Gal4, Liu and Lengyel, 2000; drm-Gal4, Green et al., 2002).

Eine Umklonierung des Konstruktes „*rols6*FL4“ in den Expressionsvektor pUAST gelang bisher allerdings nicht.

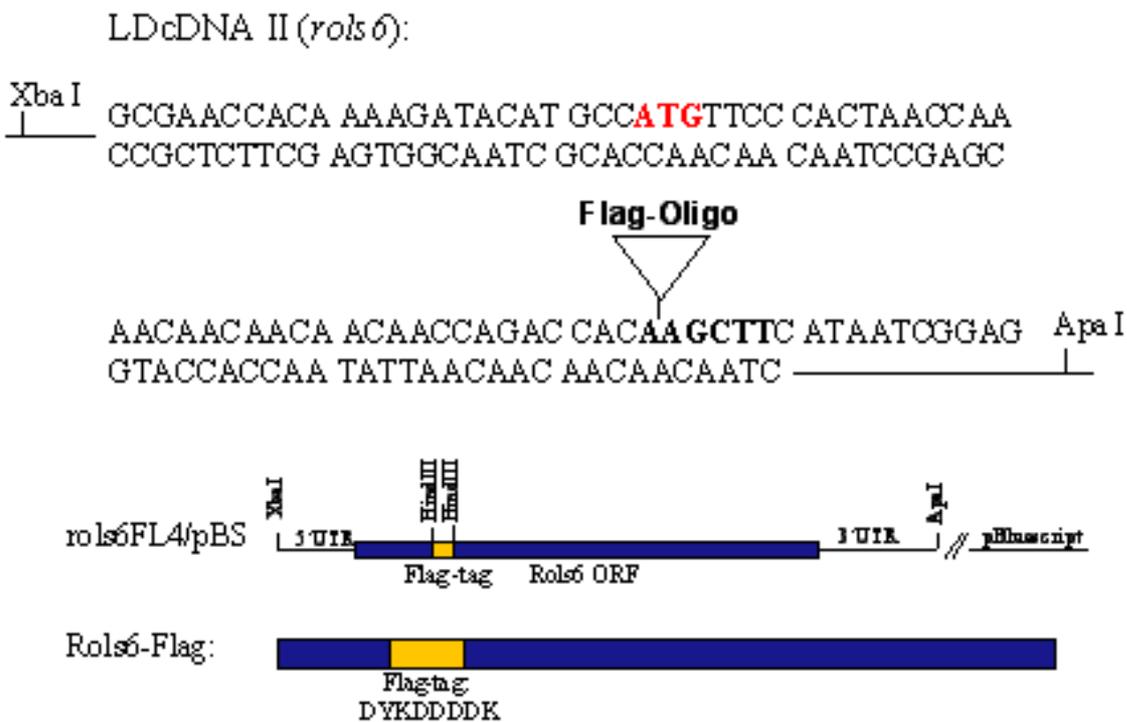


Abbildung 5.12: Sequenzausschnitt des Klons „*rolS6FL4*“ und schematische Darstellung des zu erwartenden N-terminal Flag-markierten Proteins Rols6-Flag. Die *rolS6* cDNA (LDcDNAII; kloniert über XbaI und ApaI in pBluescript) wurde über HindIII 77 bp stromabwärts des ATG geöffnet. In diese Stelle wurde das synthetisch hergestellte Oligonukleotid (Flag5 und Flag3, siehe Material und Methoden) ligiert. Daraus resultierte der Vorklon *rolS6FL4/pBS*. Nach Klonierung in pUAST könnte ein N-terminal markiertes Protein Rols6-Flag exprimiert und mittels anti-Flag Antigennachweis visualisiert werden.

5.7.2 Bakterielle Expression eines *rolS6* spezifischen Peptides zur Generierung eines spezifischen anti-Rols6 Antikörpers

Beide Rols Proteine unterscheiden sich nur in ihren jeweiligen N-Termini. Um proteinspezifische Peptidantikörper zu generieren ist es nötig, eine Aminosäuresequenz aus diesen Bereichen auszuwählen. Im Falle des Proteins Rols6 sind es 79 Aminosäuren, welche für Rols6 spezifisch sind (siehe Abbildung 2.1). Ausgehend von der *rolS6* LDcDNA II wurde per PCR mit den Primern *rolS6*-pBAD-5' und *rolS6*-pBAD-3' das Fragment amplifiziert, das den Aminosäuren 2-71 entspricht (210 bp). Dieses Fragment wurde nach Zwischenklonierung in pCRII-TOPO (Invitrogen) über Eco RI- und Sac I-Restriktion aus diesem Vektor isoliert und über diese Schnittstellen in den Expressionsvektor pBAD/*HisA* (Clontech) kloniert, welcher es ermöglicht, das gewünschte Protein N-terminal mit 6 *His*-tags zu versehen. Die Richtigkeit des Leserahmens eines positiven Klons wurde anhand der Sequenzen im Übergangsbereich von Vektor zu cDNA mittels des pBAD spezifischen 5'-Primers „BADFW“ überprüft. Der Klon Bad1/pBAD(9) wurde als positiver Klon zur Weiterverarbeitung vorgesehen.

Das spezifische, *His*-gekoppelte Rols6 Fusionsprotein sollte bakteriell nach Arabinoseinduktion exprimiert werden. Das zu erwartende Protein sollte relativ zu einem Proteinmarker auf einer Höhe von ca. 14 kDa auf dem Western Blot mit einem anti-*His* Antikörper zu detektieren sein. Die Proteingröße errechnet sich aus einem Rols6 Anteil von etwa 7 kDa und einem *His*-Tag Anteil von ca. 6-7 kDa.

Wie der Blot einer Pilot Expression in Abbildung 5.13 zeigt, ist Rols6(2-71)-*His* bakteriell exprimierbar und kann auch in der richtigen Größe detektiert werden. Ein Expressionsmaximum wurde in diesem Experiment bei einer Arabinosekonzentration von 0,2 % nach 4stündiger Inkubation der Zellen erreicht. Die Löslichkeit des Fusionsproteins wurde noch nicht geprüft. Zur Antigen synthese für eine Antikörperproduktion gegen Rols6 steht der Klon Bad1/pBAD(9) aber zur Verfügung.

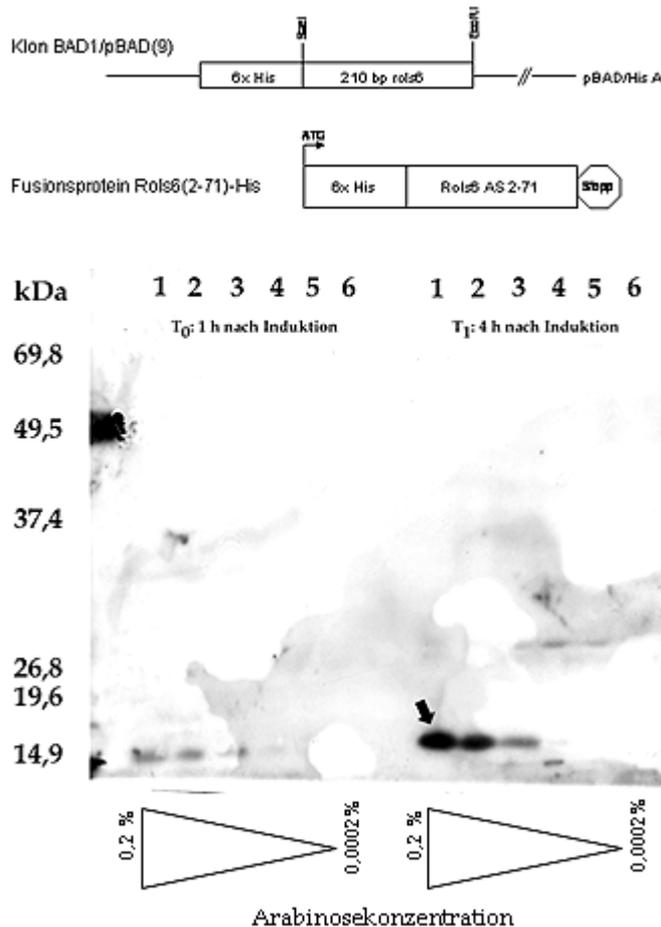


Abbildung 5.13: Klonierung der *rols6* spezifischen Basenpaare 4-213 (AS 2-71) in den Expressionsvektor pBAD/*His A* (Clontech) und bakterielle Expression eines *His*-gekoppelten Fusionsproteins Rols6(2-71)-*His*.

Die Basenpaare 4-213 des Rols6 ORFs wurden an LDcDNA II mit den Primern *rols6*-pBAD-5' und *rols6*-pBAD-3' amplifiziert und über *SacI* und *EcoRI* in den Expressionsvektor pBAD/*HisA* kloniert. Das zu erwartende Protein Rols6(2-71)-*His* hat eine Masse von ca. 14 kDa und konnte im Western Blot mit einem anti-*His* Antikörper nachgewiesen werden. Bei einer Arabinose-Konzentration von 0,2 % konnte ein Expressionsmaximum des Proteins nach 4 Stunden detektiert werden (schwarzer Pfeil).

Links (1-5) T₀: minimale Induktion des Fusionsproteins bei 0,2-0,002% Arabinosekonzentration nach 1 h Inkubation. Rechts (1-5) T₁: Starke Induktion des Fusionsproteins nach 4 h Inkubation. Die Spur 6 enthält eine nicht-induzierte Kontrollprobe.

5.8 Identifizierung der *rols6* spezifischen regulatorischen, genomischen Region

Neben der Expression und der phänotypischen Auswirkung von Mutationen *rols6* betreffend sollten auch die transkriptionell regulatorischen genomischen Bereiche identifiziert werden. Hinweise, wo putative *rols6* Promotor-Elemente lokalisiert sein könnten, ließen sich aus der *rolling pebbles* Genstruktur (schematisch dargestellt in Abbildung 2.1) ableiten. Die beiden *rols6* spezifischen Exons sind im 2. *rols7* Intron lokalisiert (Rau et al., 2001). Der genomische Bereich zwischen dem zweiten Exon des *rols7* Transkriptes und der *rols6* Transkriptionsinitiationsstelle (*rols6* Exon 1) umfasst etwa 5000 Basenpaare. Innerhalb dieses Bereiches war der *rols6* Promotor zu vermuten. Diese Annahme wurde auch dadurch verstärkt, dass in der vom *rols6* Exon 1 stromaufwärts gelegenen genomischen Region das P-Element der Enhancer-Trap Linie P1027 inseriert, deren β -Galaktosidase-Expression unter *rols6* Transkriptionskontrolle zu stehen scheint. Mittels PCR wurden verschiedenste Bereiche dieser genomischen Region amplifiziert und in Reportergerinstudien nach P-Element vermittelter Keimbahntransformation in transgenen Fliegen getestet und mit dem *rols6* Expressionsmuster verglichen.

5.8.1 Das *rols6* Expressionsmuster

Erste Daten zur Expression des kurzen *rolling pebbles* Transkriptes ergaben, dass *rols6* ab dem Embryonalstadium 11 in den Primordia des anterioren (amp) und posterioren (pmp) Mitteldarms, im Pharynxbereich (Ph) und in den Anlagen der Malpighischen Gefäßen (MpG), unmittelbar zwischen der ektodermalen Anlage des Enddarmes und des posterioren Mitteldarmes, exprimiert ist (Rau et al., 2001). Mittels "whole mount *in situ* Hybridisierungen" (Tautz and Pfeifle, 1989) mit einer DIG markierten, *rols6* spezifischen „antisense-Einzelstrang“ Sonde, die über PCR generiert wurde, konnte der zeitliche Verlauf der Transkriptexpression während der Embryogenese detailliert analysiert werden (siehe Abbildung 5.14). In Stadium 11 wird das Transkript, wie in Rau et al., 2001 beschrieben, in den Anlagen des Mitteldarmes (amp, pmp) und der MpG stark exprimiert. Eine zusätzliche Expression im Pharynxbereich ist zu detektieren (Abbildung 5.14 B). Diese Expression verbleibt in diesen Domänen bis in spätere Embryonalstadien erhalten. Dabei wird deutlich, dass *rols6* nach Beendigung der Keimstreifverkürzung in den Endodermzellen, die den Darm umschließen (5.14D und E), exprimiert bleibt und in allen PCs der MpG detektierbar ist (5.14C und D). In Stadium 16 Embryonen ist die Expression in den MpG nicht mehr eindeutig detektierbar, sie bleibt aber im Endoderm (Pfeile in E) und im Pharynx nachweisbar (E).

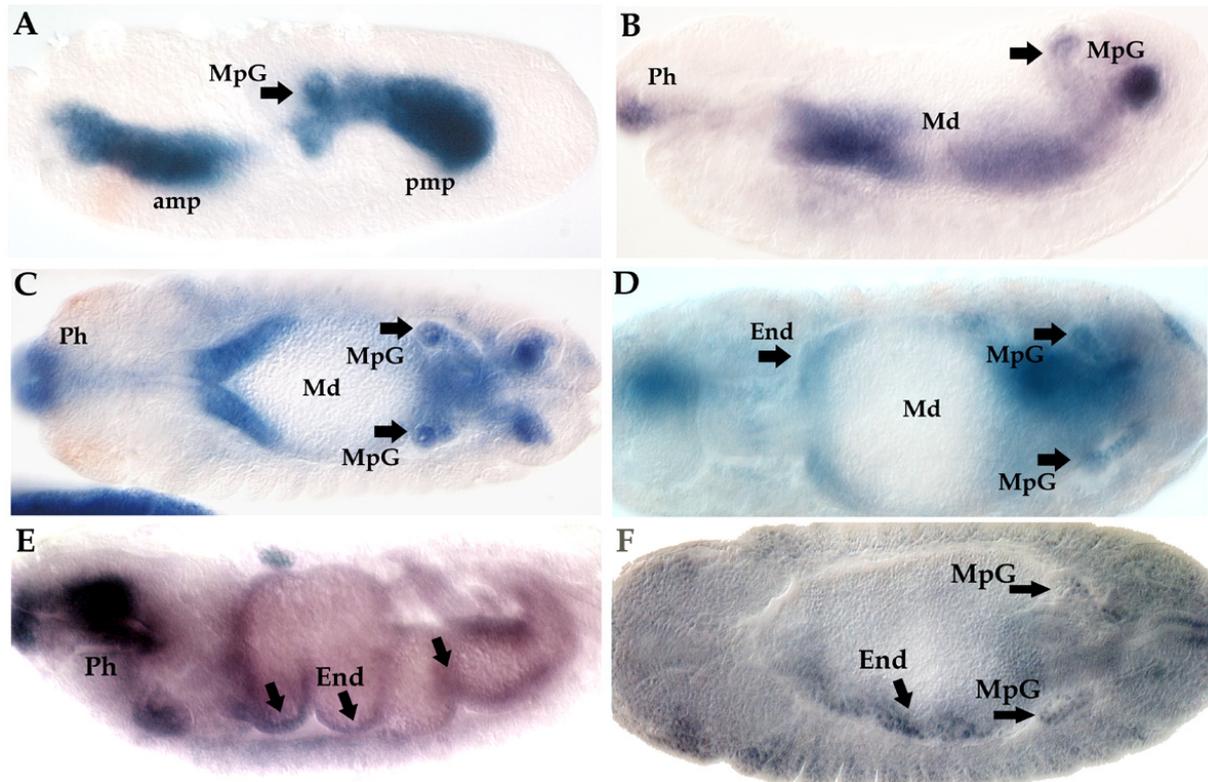


Abbildung 5.14: Das *ro/s6* Expressionsmuster während der Embryogenese.

Dargestellt sind „whole mount *in situ* Hybridisierungen“ an WT Embryonen der Stadien 11/12 (A), 13 (B), 14 (C), 15 (D) und 16 (E). In F ist das *lacZ*-Expressionsmuster der P-Insertionslinie P1027 teilweise dargestellt. Generiert wurde eine PCR-DIG markierte Einzelstrang-Gegensinn Sonde (primer: LDIIISP), den spezifischen 5' Anteil des *ro/s6* Transkriptes detektiert. Das Transkript wird in frühen Stadien in den Anlagen des Mitteldarmes, im Pharynx und in den entstehenden MpG detektiert (A-C). In diesen Expressionsdomänen bleibt es auch in späteren Stadien 15 (D) und 16 (E) nachweisbar, wobei es in den Zellen des Endoderms, welche den gesamten Darm umschließen und in allen Zellen der MpG exprimiert ist (D). In Stadium 16 Embryonen ist *ro/s6* mit dieser Sonde in den MpG nicht eindeutig nachweisbar, die Expression im Pharynx und im Endoderm (Pfeile in E) bleibt erhalten (E). Das *lacZ*-Expressionsmuster der Enhancer-trap Linie P1027 markiert Zellkerne des Endoderms und der MpG (F). amp: anteriores Mitteldarm primordium; End: Endoderm; Md: Mitteldarm; MpG: Malpighische Gefäße; Ph: Pharynx; pmp: posteriores Mitteldarm primordium.

Das P-Element in der Insertionslinie P1027 liegt ca. 100 bp vor der Transkriptionsinitiationsstelle von *ro/s6*. Wie in 2.1.2 beschrieben, wurde anhand des Enhancer-trap Musters dieser *lacZ*-exprimierenden Linie deutlich, dass die *rolling pebbles* Expressionsdomänen nicht auf mesodermale Gewebe beschränkt sein konnten, sondern auch im Endoderm und im Pharynxbereich detektierbar sind (Rau, A., 2001; Dissertation). Eine *lacZ*-Expression in den MpG dieser Linie wurde noch nicht beschrieben. Bei genauerer Betrachtung des Enhancer-trap Musters wurde deutlich, dass das P-Element auch unter dem Einfluss eines Regulationselementes stehen muss, welches eine schwache *lacZ*-Expression in den MpG erzeugt. Dies ist in Abbildung 5.15 F mittels β -Galaktosidase Antigennachweises gezeigt. Obwohl nicht bekannt ist, unter welchem Enhancereinfluss dieses P-Element steht, war aufgrund dieser Daten wahrscheinlich, dass im Bereich der P1027 Insertionstelle im 5'-vorgelagerten genomischen Bereich des ersten spezifischen *ro/s6* Exons

regulative Elemente, welche die oben beschriebenen Expressionen steuern, zu finden sein sollten.

5.8.2 Generierung von *rols6* spezifischen Reportergernekonstrukten

Um den putativ regulatorischen genomischen Bereich in Reportergerne Studien zu testen, wurden unterschiedliche Konstrukte generiert. Die in transgenen Fliegen getesteten Konstrukte sind in Abbildung 5.15 schematisch dargestellt und in Tab. 5.5 aufgelistet. Dabei handelte es sich um DNA-Fragmente, die über PCR an WT genomischer DNA amplifiziert und anschließend in den *Drosophila* Transformationsvektor pChab Δ Sal (Thummel et al., 1988) kloniert wurden, der das β -Galaktosidase Gen als Reporter beinhaltet. Um einen Enhancertest mit dem genomischen Fragment Rosh#0,45 durchzuführen, wurde der dafür geeignete Transformationsvektor pH-Pelican (Barolo et al., 2000) gewählt, da dieser über einen Minimalpromotor (*hsp70* TATA) verfügt. Dieser Vektor ist zusätzlich mit Gypsy Element Insulatoren ausgestattet, welche bewirken sollen, dass bei Integration ins Fliegen Genom Enhancer-Traps unterbunden werden. (siehe Abschnitt 5.8.5). Die aus der Keimbahntransformation enthaltenen transgenen Linien wurden anschließend als individuelle Linien etabliert und mit anti- β Galaktosidase Antigennachweisen untersucht.

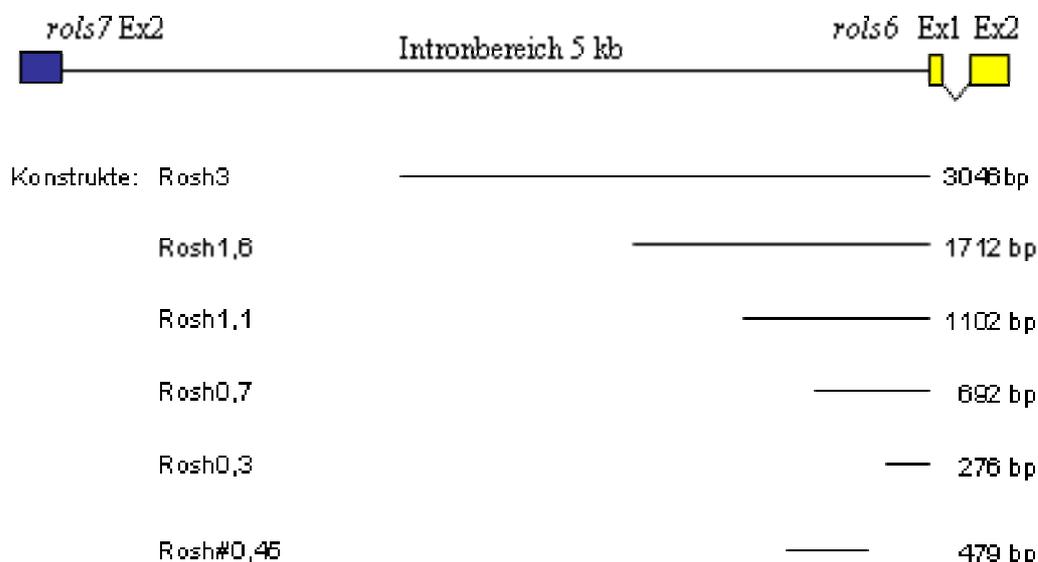


Abbildung 5.15: Schematische Darstellung der *rols6* Promotor-Konstrukte. Dargestellt werden die Promotor-Konstrukte mit Informationen über die beinhaltenden genomischen Fragmente, ihrer Größe und relativen Lage im 5 kb großen intronischen Bereich zwischen dem zweiten *rols7* spezifischen Exon (blauer Kasten) und den ersten *rols6* spezifischen Exon 1 und 2 (gelbe Kästen).

Tabelle 5.5: In transgenen Fliegenlinien getestete *rols6* Promotor-Konstrukte

Konstrukt	Synonym	Vektor	Primer	DNA-Fragment (bp)
ROSH L	Rosh3	pChab Δ Sal	ROSH P(e)/ ROHS PII	3046
ROSH K+610	Rosh1,6	pChab Δ Sal	ROSH PI+610/ ROHS PII	1712
ROSH K	Rosh1,1	pChab Δ Sal	ROSH PI/ ROHS PII	1102
ROSH K-410	Rosh0,7	pChab Δ Sal	ROSH PI-410/ ROHS PII	692
ROSH K-835	Rosh0,3	pChab Δ Sal	ROSH PI-835/ ROHS PII	276
ROSH K-280-759	Rosh#0,45	pH-Pelican	ROSH PI-280/ ROHS PI-759	479

5.8.3 Ein 1100 Basenpaarfragment aus der putativen *rols6* Promotor-Region spiegelt das gesamte *rols6* Expressionsmuster in Reporterstudien wieder

Die ersten beiden Konstrukte, die in transgenen Linien getestet wurden, waren das 1100 bp Fragment enthaltende Konstrukt Rosh1,1 und ein etwa 3 kb umfassendes Konstrukt Rosh3. Damit sollte der überwiegende Teil der dem Transkript 5'-vorgelagerten genomischen Region abgedeckt sein. Es stellte sich heraus, dass das Konstrukt Rosh1,1 das gesamte *rols6* Expressionsmuster (siehe auch Abbildung 5.14) durch die Reporteraktivität widerspiegelte (Abbildung 5.16; linke Säule: Rosh1,1; rechte Säule Rosh3,3). Sowohl die frühen Expressionsdomänen in den Mitteldarmanlagen (Abbildung 5.16 A und B) als auch in den Anlagen der Malpighischen Gefäßen (Abbildung 5.16 B) konnten in Stadium 11/12 Embryonen detektiert werden. Ebenso wie in den *rols6 in situ* Hybridisierungen beschrieben, wird das Reportergen auch in Stadium 15 und 16 Embryonen im Endoderm und in den MpG exprimiert (Abbildung 5.16 C-E). Einzig die Expression in der Pharynxregion war in älteren Embryonalstadien in diesen Linien schwach detektierbar.

In Rosh3 Embryonen konnte diese Reporteraktivität bestätigt werden (Abbildung 5.16, rechte Säule). Trotz des um ca. 2000 bp erweiterten genomischen Bereiches in diesem Konstrukt, waren nur markierte Amnioserosazellen zusätzlich zu den oben beschriebenen Expressionen zu beschreiben (Abbildung 5.16 G). Diese Expression in den Amnioserosazellen war zu erwarten, da schon die Enhancer-trap Linie P1027 eine *lacZ*-Expression zeigte (siehe Rau, 2001; Dissertation).

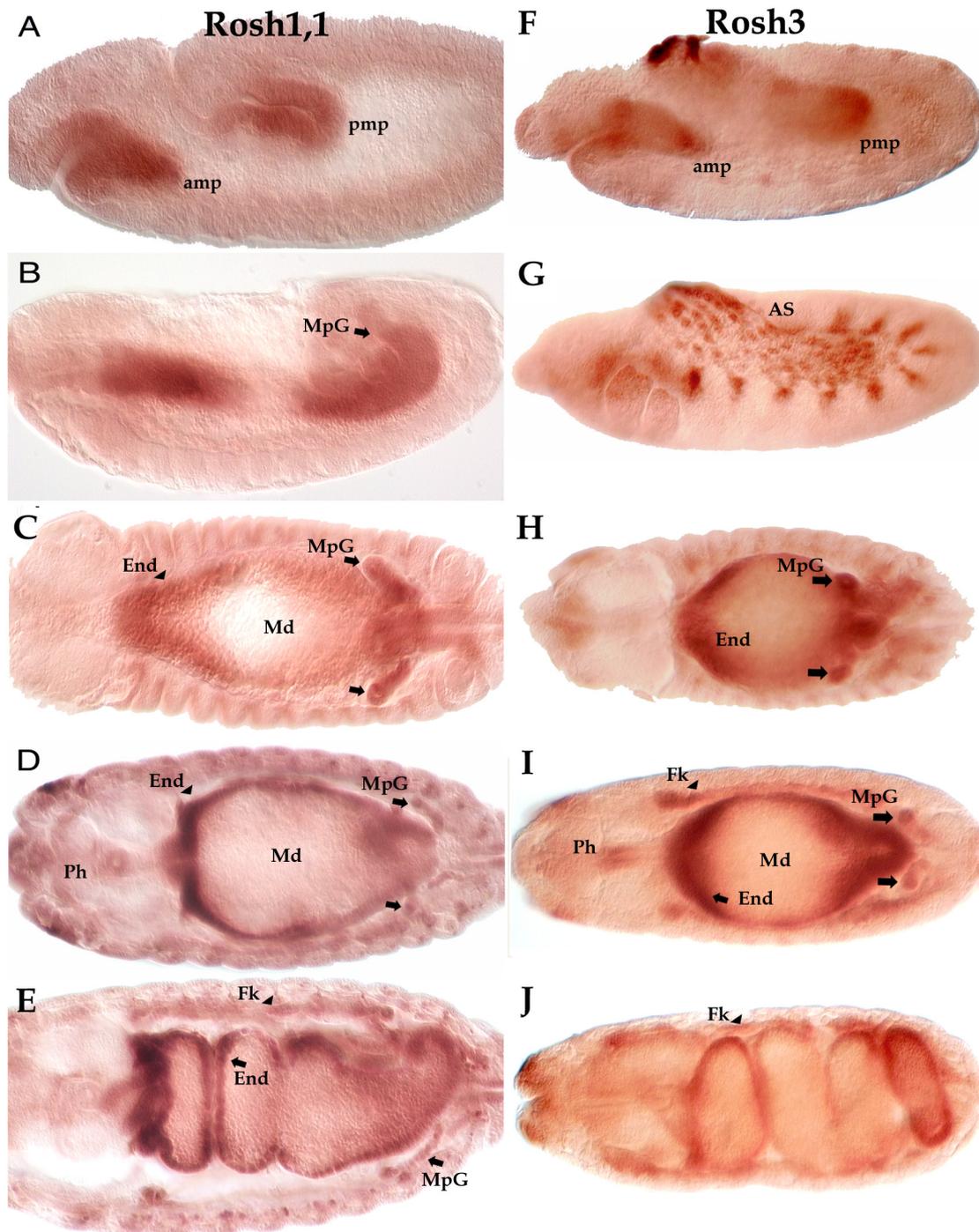


Abbildung 5.16: Die Konstrukte Rosh1,1 und Rosh3 zeigen das gesamte *roIs6* Expressionsmuster in der Reporterstudie. Dargestellt sind anti- β -Galaktosidase Antikörperfärbungen an Rosh1,1 (A-E) und Rosh3 (F-J) Embryonen zum Nachweis von Reporteraktivität. Die *lacZ*-Expression in allen Stadien entspricht dem *roIs6* Expressionsmuster. (Die einzelnen Domänen (Pharynx, Endoderm und Malpighische Gefäße) sind wie in Abbildung 5.14 gekennzeichnet). Rosh3 Embryonen weisen in Stadium 11 zusätzlich LacZ-markierte Amnioserosazellen (AS) auf (A; fokussiert in B). Bei beiden Konstrukten ergibt sich eine leichte Färbung im Fettkörper (Fk; Pfeilspitzen in E, I und J).

Auffälligerweise war in mehreren unabhängigen Linien beider Konstrukte eine leichte Färbung im Fettkörper zu detektieren (Abbildung 5.16 E; I -J). Ob es sich um ein Färbeartefakt oder um einen echten Enhancer handelt, wurde bis dato nicht geklärt.

Analoge Expressionsmuster wurden auch mit dem Konstrukt Rosh1,6 erhalten (Daten nicht gezeigt).

Diese Daten deuten darauf hin, dass die ersten 1100 bp stromaufwärts der Transkriptionsinitiation von *ro/s6* den wesentlichen regulativen Bereich für dieses Transkript beinhalten.

5.8.4 Datenbank-gestützte Sequenzanalyse der putativen *ro/s6* Promotor-Region

Mittels der Reportergenstudien (Abschnitt 5.8.3) konnte der putative Promotor-Bereich für *ro/s6* auf die ersten 1100 bp stromaufwärts des ersten Exons eingegrenzt werden. Zur weiteren Charakterisierung wurde diese genomische Region auf potentielle Bindestellen für Transkriptionsaktivatoren untersucht. Erste Hinweise auf putative Aktivatorbindestellen können gewonnen werden, indem die zu analysierenden Sequenzen via Internet in Datenbanken eingegeben werden, welche eine Vielzahl von Konsensusbindesequenzen von Regulatoren enthalten. Diese werden dann mit der betreffenden DNA-Sequenz abgeglichen und die potentiell bindenden Faktoren angezeigt. Die Programme sind über das Internet über das Portal <http://www.gene-regulation.com> zu erreichen und sind teilweise nicht-kommerziellen Nutzern frei zugänglich. Die DNA-Sequenz des putativen *ro/s6* Promotors wurde in drei Datenbanken abgeglichen. Die Voraussagen wurden von den Suchprogrammen TRANSFAC SEARCH, PatchTM und AliBaba2.1 gemacht. Diese Voraussagen sind zusammenfassend in Abbildung 5.18 dargestellt, wobei die Auswahl im Hinblick auf die Relevanz der vorausgesagten Regulatoren für die betreffenden Gewebe, das Endoderm und die MpG, sehr stark reduziert wurde.

Aus der Vielzahl der angezeigten Faktoren kamen wenige als potentielle *ro/s6* Regulatoren in Betracht.

In einem ersten Sequenzabgleich wurden vom TRANSFAC SEARCH Programm zwei Bindestellen für den Transkriptionsfaktor Krüppel (Kr) angezeigt. Die prozentuale Übereinstimmung mit der Datenbank-Referenzsequenz lag allerdings unter 30 % und die anderen oben genannten Programme reproduzierten diese Vorhersage nicht. Dennoch erschien eine Beteiligung des Faktors Krüppel an der Regulation von *ro/s6* nicht unwahrscheinlich, da Krüppel ein essentieller Determinierungsfaktor des Malpighischen Gewebes ist. So ist z.B. bekannt, dass die Expression des Faktors Krüppel die Tip-Zelle der MpG charakterisiert und dadurch in den zukünftigen Zellen der Gefäße (PCs) Aktivatoren und Signalwege angeschaltet

werden, über die die Zellspezifizierung der PCs und die Zellproliferation des Gewebes gesteuert werden (Hoch et al., 1994).

Eine weitere Bindestelle wurde für den Transkriptionsfaktor Zeste (Z) vorhergesagt. Eine Zeste-Expression in den embryonalen MpG ist bisher nicht beschrieben worden. In den larvalen MpG ist Zeste allerdings exprimiert. Da eine Expression von *ro/s6* in larvalen Geweben bisher nicht Gegenstand der Untersuchungen war, wurde die Analyse dieses Faktors nicht weiter betrieben.

Des Weiteren wurden diverse GATA-Faktor Bindestellen vorhergesagt. In *Drosophila* sind es die GATA-Faktoren Serpent (Srp; GATAb) (Abel et al., 1993; Reuter, 1994) bzw. Grain (Grn, GATAc) (Lin et al., 1995; Brown and Castelli-Gair Hombría, 2000), die in der Mitteldarmentwicklung eine Rolle spielen. Auch diese Faktoren werden früh in der Embryogenese exprimiert und kommen daher als Regulatoren von *ro/s6* im Endoderm in Frage.

Die Programme PatchTM und AliBaba2.1 sagten ebenso eine Vielzahl von Bindestellen für den GAGA-Faktor vorher. Aufgrund der sehr häufig vorkommenden GAGA-Faktor Konsensusbindesequenz (GAGAG) wurden diese in der schematischen Darstellung 5.18 nicht berücksichtigt. Einziger in *Drosophila* beschriebener GAGA-Faktor ist das Protein Trithorax-like (Trl; Soeller et al., 1993; Farkas et al., 1994). Dieser Faktor könnte in sofern eine Rolle spielen, da er in vielen Geweben als Repressor und auch als Aktivator von Regulatoren, wie z.B. Krüppel beschrieben worden ist (Kerrigan et al., 1991).

5.8.5 Ansätze zur Charakterisierung des putativen *ro/s6* Promotors

Obwohl die Datenbankanalyse aus 5.8.4 keine eindeutigen Hinweise auf Bindestellen für Transkriptionsfaktoren ergab, wurde anhand der vorhergesagten Krüppel- und GATA-Bindestellen das 1,1 kb Fragment aus Rosh1,1 geteilt und die Teilfragmente in Reporter-gen-Expressionsstudien untersucht. Dazu wurden die in Tabelle 5.5 und Abbildung 5.15 und 5.18 aufgeführten Konstrukte Rosh0,7, Rosh0,3 und Rosh#0,45 generiert, wobei das Rosh0,7 Konstrukt die 5'-gelegenen GATA-Bindestellen und die erste stromaufwärts gelegene Krüppel-Bindestelle enthält. Das DNA-Fragment in Rosh0,3 wurde so gewählt, dass lediglich die ersten beiden stromaufwärts vorhergesagten GATA-Bindestellen im Konstrukt enthalten sind. (schematisch dargestellt in Abbildung 5.18)

Nach β -Galaktosidase Antigennachweis in unabhängigen transgenen Linien der Konstrukte Rosh0,3 und Rosh0,7 konnte weder im Endoderm und im Pharynx, noch in den Malpighischen Gefäßen *LacZ*-Expression nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Dies könnte darauf hinweisen, dass die vorhergesagten GATA-Bindestellen nicht von einem solchen Faktor besetzt werden, oder aber, dass sie alleine nicht ausreichend sind, um Reportergenaktivität zu bedingen.

Das Rosh#0,45 Konstrukt wurde konstruiert, um zu überprüfen, ob die nur einmalig vorhergesagten Krüppel-Bindestellen tatsächlich als authentisch anzusehen sind. Wegen der Gewebe determinierenden Rolle, die Krüppel in den MpG übernimmt wäre in einem solchen Fall zu erwarten gewesen, dass Rosh#0,45 spezifisch in den Malpighischen Gefäßen *LacZ*-Expression zeigen würde. Benutzt wurde für dieses Konstrukt ein Transformationsvektor pH-Pelican (Barolo et al., 2000). Dieser Vektor enthält neben einem β -Galaktosidase Reportergen und dem Augenmarker *white* zusätzlich zwei Insulatorelemente, die verhindern sollen, dass das Transgen im Fliegen genom unter fremde Enhanceraktivität gerät, was eine Analyse des im Konstrukt enthaltenen genomischen Fragmentes auf cis-regulatorische Aktivität entgegenwirken würde. Ebenso enthält dieser Vektor einen Minimalpromotor mit TATA box und Initiator Sequenz, welche eine solche Analyse *in vivo* ermöglichen (Abbildung 5.17 A in rot).

Der β -Galaktosidase Antigennachweis der Rosh#0,45 transgenen Linien ergab interessanterweise ein der Erwartung widersprechendes Ergebnis. Statt der erwarteten *lacZ*-Expression in den MpG konnte diese nur in den Zellen des Endoderms nachgewiesen werden (siehe Abbildung 5.17 B und C). Dies deutet darauf hin, dass die vorhergesagten Krüppel-Bindestellen in diesem Kontext nicht funktionell sind. Des Weiteren muss in diesem genomischen Fragment ein Endoderm-spezifischer Enhancer lokalisiert sein.

A)

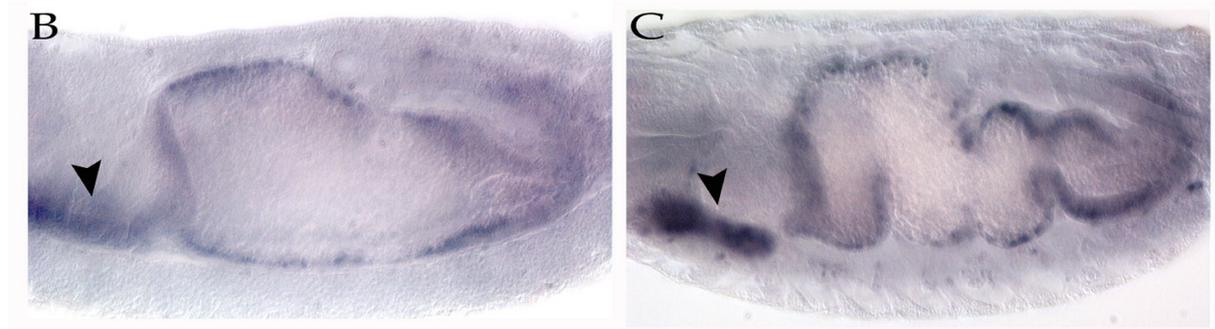
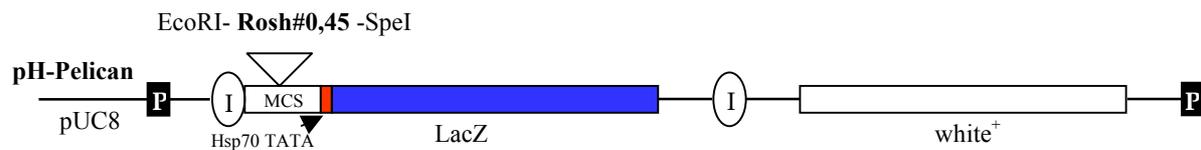
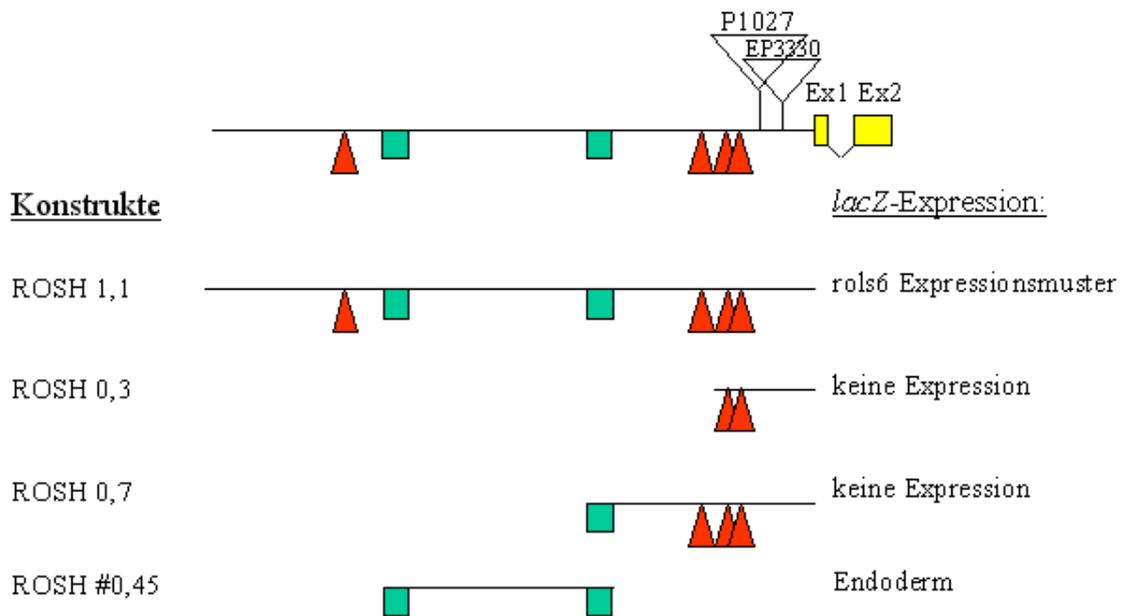


Abbildung 5.17: Schematische Darstellung des Konstruktes Rosh#0,45 und LacZ-Expression in Rosh#0,45 transgenen Linien.

A) Für das Konstrukt Rosh#0,45 wurde der Transformationsvektor pH-Pelican (incl. Minimalpromotor mit TATA box und Initiator Sequenz: rote Box) benutzt (P: P-Element Flügel; I: Gypsy Insulator-Element; MCS: multiple Klonierungsstelle; verändert nach Barolo et al., 2000). Die aus der P-Element Keimbahntransformation resultierenden, transgenen Rosh#0,45-Linien zeigten nur eine spezifische *lacZ*-Färbung in den Endodermzellen. Dargestellt sind Embryonen im Stadium 15 (B) und 16 (C). Die Pfeilspitze weist auf eine Hintergrundfärbung in den Speicheldrüsen hin, die dem benutzten Transformationsvektor zuzurechnen ist.

In der folgenden Abbildung 5.18 sind die Ergebnisse der Reporterstudien zusammengefasst. Die essentiellen *ro/s6* Promotor-Elemente sind in einer genomischen Region etwa 1100 bp stromaufwärts des ersten spezifischen Exons zu finden, wobei in einem Bereich zwischen Position -340 und -800 relativ zum Transkriptionsstart ein Endoderm-Enhancer lokalisiert zu sein scheint. Ob die regulativen Elemente, die für die Expression des Transkriptes in den Malpighischen Gefäßen verantwortlich sind, sich ausschließlich im weiter 5'-gelegenen genomischen Bereich, jenseits des Fragmentes in Rosh#0,45, befinden, oder ob eine Kombination verschiedener Fragmente benötigt wird, um diese Expression zu bewirken, konnte bisher nicht geklärt werden.

1100 bp stromaufwärts von *rols6*



Mögliche Bindestellen von Transkriptionsfaktoren (Minimierte Auswahl):

- ▲ GATA factor (*serpent / grain*) > 6 Bindestellen
- Krüppel 2 Bindestellen

Abbildung 5.18: Schematische Darstellung der putativen *rols6* Promotor-Region und der potentiell bindenden Transkriptionsfaktoren im Vergleich zur *lacZ*-Expression in den daraus resultierenden Promotor-Konstruktstudien. Das 1,1 kb enthaltende Konstrukt Rosh1,1 bewirkt *lacZ*-Expression im *rols6* Expressionsmuster. Anhand der vorausgesagten Transkriptionsfaktor-Bindestellen wurden verschiedene Konstrukte getestet. In Linien von verkürzten Konstrukten, die nur noch ca. 340 bp (Rosh0,3) bzw. ca. 700 bp (Rosh0,7) dieser genomischen Region tragen, konnte keine Reporteragenaktivität nachgewiesen werden. Ein genomisches Fragment aus der mittleren Region dieses putativen Promotors ist in der Lage, Reporteragenaktivität spezifisch im Endoderm zu bewirken (Rosh#0,45). Alle Konstrukte sind mit den dazugehörigen Oligonukleotiden in Tabelle 5.5 aufgelistet.

5.9 *rols6* Expressionsanalyse in Mutanten

Das *rolling pebbles* Transkript *rols6* ist während der *Drosophila* Embryogenese im Endoderm und in den Malpighischen Gefäßen exprimiert. Eine für *rols6* spezifische Mutagenese hat gezeigt, dass Rols6 in der Entwicklung der Malpighischen Gefäße eine Funktion ausübt, was durch die Analyse des in der *rols6* Deletionslinie EP(3)3330*5a auftretenden Phänotyps der MpG unterstützt wird. Die Expression des Transkriptes beginnt im Embryonalstadium 10/11 in den Anlagen der MpG und in den Primordia des Mitteldarmes (Rau et al., 2001). Die Aktivatoren der Transkription sind allerdings nicht bekannt.

Aufgrund der frühen Expression und der Voraussagen der Bindestellen für Transkriptionsfaktoren aus der Datenbankanalyse (siehe 5.8.4) wurden erste Expressionsanalysen in Mutanten der potentiellen Transkriptionsfaktoren Krüppel (Kr), Serpent (Srp) und Trithorax-like (Trl) durchgeführt. Diese Faktoren sind insofern als potentielle Transkriptionsaktivatoren interessant, da sie in den betreffenden Geweben in Determinierungskaskaden wesentlich beteiligt sind.

Obwohl sich aus den Reporter-gen-Assays (siehe Abschnitt 5.8.5) keine direkten Hinweise für eine Beteiligung des Transkriptionsfaktors Krüppel an der *rols6* Genregulation ergeben hatten, wurden diese Daten anhand von *rols6* spezifischen *in situ* Hybridisierungen in *Krüppel* mutanten Embryonen verifiziert. Die Anlagen der MpG sind in Krüppel Mutanten als Zellkluster zu erkennen. Die Ausdifferenzierung der Zellen zu PCs und die Elongationschritte finden in diesen Mutanten allerdings nicht mehr statt (Hoch et al., 1994). Auch können die Zellen der MpG nicht mit dem Marker Cut detektiert werden, da Cut ein direktes Zielgen des Faktors Krüppel ist und somit nicht exprimiert wird. In Abbildung 5.19 A und B sind *Krüppel* mutante Embryonen der Stadien 11 (A) und 15 (B) des Allels *Krüppel-2* (Kr^2 ; Hoch et al., 1994) gezeigt. Sowohl in den rudimentär ausgebildeten Anlagen der MpG als auch im Endoderm und im Pharynxbereich kann das *rols6* Transkript nachgewiesen werden. Dies war auch in mutanten Embryonen des Allels *Krüppel-1* (Kr^1 ; Hoch et al., 1994) der Fall (Daten nicht gezeigt).

Der GATA Faktor Serpent (Srp) übernimmt in der Entwicklung des Mitteldarmes eine wesentliche Rolle. In *srp* Mutanten wird kein Mitteldarm gebildet. Stattdessen werden die angelegten Zellen des posterioren Mitteldarmprimordiums zu Zellen des Enddarmes transformiert. Die Malpighischen Gefäße werden allerdings an der korrekten Position in den Mutanten gebildet und erscheinen im Vergleich zu wildtypischen Gefäßen nur verkleinert (Reuter, 1994). *rols6 in situ* Hybridisierungen an Embryonen des Allels *srp*³ zeigten, dass eine *rols6* transkriptionsaktivierende Beteiligung des Faktors Serpent auszuschließen ist, da das Transkript in den rudimentär ausgebildeten Anlagen des Mitteldarmes und in den MpG nachweisbar ist (Abbildung 5.19 C und D).

Der einzige beschriebene GAGA Faktor in *Drosophila* ist Trithorax-like (Trl; Farkas et al., 1994). Eine Expression dieses Faktors in den Embryonalstadien 11-15 und in den

Malpighischen Gefäßen wurde bisher nicht beschrieben. DNA-Bindestellen für diesen Faktor wurden allerdings in den Promotoren der unterschiedlichsten Gene (z.B. *fushi tarazu* (*ftz*; Topol et al, 1991) *engrailed* (*en*) und *Ultrabithorax* (*Ubx*) (Biggin and Tjian, 1988; Soeller et al., 1988) und auch in den Promotoren von Histonekodierenden Genen (Gilmour et al., 1989) identifiziert. Auch in der *rols6* regulativen Region wurden diverse putative Bindestellen für den GAGA-Faktor vorhergesagt. Allerdings konnte das *rols6* Transkript in mutanten Embryonen des *trithorax-like* Allels *trl*²³²⁵ sowohl in frühen Embryonen (Abbildung 5.19 E) als auch in den Stadien 14 und 15 (Abbildung 5.19 F und G) im Endoderm und in den Malpighischen Gefäßen nachgewiesen werden.

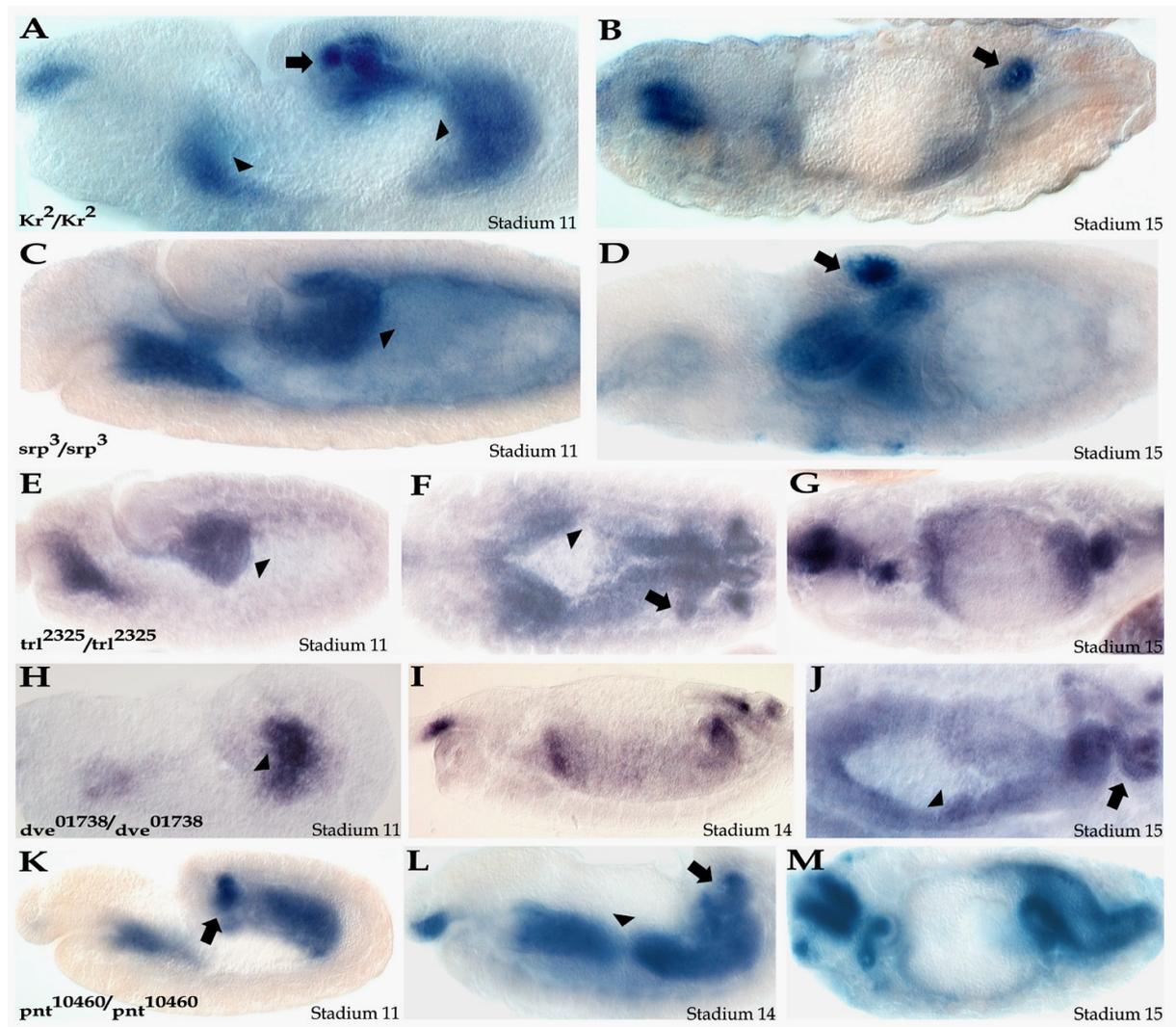


Abbildung 5.19: *rols6* Expression in Mutanten von frühen, gewebespezifisierenden Regulatoren des Endoderms und der Malpighischen Gefäße.

Dargestellt werden *in situ* Hybridisierungen mit einer *rols6* spezifischen Sonde. Die Allele der untersuchten Gene sind in der Abbildung angezeigt. Nachgewiesen wurde das *rols6* Transkript in Embryonen der Stadien 11 bis 15. Die Pfeile weisen auf die teilweise nur rudimentär ausgebildeten Malpighischen Gefäße, die Pfeilspitzen auf die Zellen des Endoderms hin (Erläuterungen im Text).

In situ Hybridisierungen mit einer *rols6* spezifisch detektierenden Sonde in Allelen der oben beschriebenen Genregulatoren, die von essentieller Bedeutung für die Ausbildung der betreffenden Gewebe sind, zeigten, dass keiner der aus der Datenbankanalyse hervorgegangenen vorausgesagten Faktoren an der *rols6* Transkription direkt beteiligt ist.

Aus der *rols6* Expressionsanalyse in Abschnitt 5.8.1 und den Reporter-gen-Expressionsstudien in Abschnitt 5.8.3 war ersichtlich, dass eine starke Expression im anterioren Endodermabschnitt detektiert werden konnte (siehe Abbildung 5.14 C und E; Abbildung 5.16 C-E und H-I). In dieser Region ist der Proventrikel lokalisiert. Ein regulativ aktiver Faktor in diesem Darmabschnitt ist der Homeoboxfaktor Defective proventriculus (Dve), der im Stadium 9/10 im anterioren Mitteldarm primordium exprimiert ist. Wenig später ist er auch im posterioren Mitteldarm primordium detektierbar (Fuß and Hoch, 1998; Nakagoshi et al., 1998). Damit beginnt die Expression des Transkriptionsfaktors Dve in diesem Gewebe etwas früher als die von *rols6* und daraus ergibt sich die Möglichkeit einer Interaktion während der *rols6* Genregulation. Dies wurde ebenfalls durch *rols6 in situ* Hybridisierungen an *dve* Mutanten getestet. In mutanten Embryonen des Allels *dve*⁰¹⁷³⁸ konnte allerdings ebenfalls das *rols6* Transkript nachgewiesen werden (Abbildung 5.19 H-J), womit eine Transkriptionsregulation durch Dve ausgeschlossen werden kann.

Die Expression von *defective proventriculus* im Proventrikel wird über den Wingless (Wg) Signalweg reguliert, während die Dve Mitteldarmexpression von Decapentaplegic (Dpp) gesteuert wird (Fuß and Hoch, 1998; Nakagoshi et al., 1998). Ob *rols6* eventuell indirekt unter Regulationskontrolle von Dpp steht, sollte in Mutanten des Gens *punt* (*put*) analysiert werden. *punt* kodiert für den TGF- β Typ II Receptor (transforming growth factor- β type II receptor) (Letsou et al., 1995; Ruberte et al., 1995) und ist als Heterodimer mit *thick veins* (*thv*) an der Dpp-Signalweiterleitung beteiligt (Letsou et al., 1995; Ruberte et al., 1995). Embryonen des *punt* Allels *put*¹⁰⁴⁶⁰ wurden auf *rols6* Expression geprüft. Die Malpighischen Gefäße in *put* mutanten Embryonen variieren sehr stark innerhalb ihres Verlaufes in

ihrer Dicke. In diesen Mutanten ist nicht die Zellanzahl der MpG-bildenden Zellen reduziert oder vervielfältigt, sondern das Zellarangement ist defekt. Untersuchungen zeigten, dass ca. 80% des proximalen Teiles der Gefäße nicht elongieren (Jack and Myette, 1999). Wie in Abbildung 5.19 (K-M) dargestellt ist, konnte das *roIs6* Transkript auch in diesen Mutanten sowohl im Endoderm, als auch in den Zellen der MpG nachgewiesen werden. Demnach ist nicht zu erwarten, dass Dpp regulatorisch auf *roIs6* wirkt.

5.10 Das *roIs6* Expressionsmuster in den Geweben von 3. Larven

Wie die Reportergeren-Assays in Abschnitt 5.8 gezeigt haben, ist es möglich, mit dem Konstrukt Rosh1.1 das gesamte *roIs6* Expressionsspektrum in der Embryonalentwicklung darzustellen. Innerhalb dieser genomischen Region sind also vermutlich die Bindestellen für Aktivatoren der Transkription während der Embryogenese lokalisiert. *LacZ*-Reportergeren Analysen sollten klären, ob diese genomische Region auch Regulationselemente enthält, die auf eine larvale Expression des Gens schließen lassen. Um einen Überblick über eine solche eventuelle Expression zu erhalten wurden 3. Larven der transgenen Rosh1,1 Linien auf *lacZ*-Reportergerenaktivität untersucht. Ein Überblick über die *lacZ*-Expression in den larvalen Geweben dieser Linien ist in Abbildung 5.20 dargestellt. In den Imaginalscheiben (IS) der Halteren (Abbildung 5.20 B) stellte sich die *lacZ*-Aktivität als diffuses Hintergrundmuster dar und kann somit als nicht spezifische Färbung interpretiert werden. In den Flügelimaginalscheiben (Abbildung 5.20 A) und den Augen-IS (Abbildung 5.20 C) erscheint die β -Galaktosidase-Expression spezifisch. Auch in den Beinimaginalscheiben (Abbildung 5.20 D-F) konnte eine spezifische Färbung in den inneren Segmenten der adulten Beinanlage, in den Tarsal und Tibia-Segmenten beobachtet werden. Als ebenso spezifisch ist die Färbung im apikalen Testesbereich (Abbildung 5.20 H) anzusehen. Im larvalen Gehirn war keine *lacZ*-Aktivität detektierbar. (Abbildung 5.20 G)

Die larvalen Malpighischen Gefäße dieser Reporterlinie zeigte keine β -Galaktosidase Expression. Ebenso konnte keine Reportergerenaktivität in Mitteldarmbereichen beobachtet werden (Abbildung 5.20 I).

Diese Daten weisen darauf hin, dass *roIs6* in einigen Geweben von 3. Larven exprimiert zu werden scheint. Ob allerdings der gleiche genomische Bereich, der die

regulativen Elemente für die embryonale Transkription enthält, ebenso für die larvale Expression verantwortlich ist, konnte mit den Daten aus diesem Pilotexperiment nicht geklärt werden. Jedenfalls ist eine Expression, und damit eine potentielle Funktion von *rols6* in den Malpighischen Gefäßen 3. Larven nur mit diesem Konstrukt nicht zu analysieren.

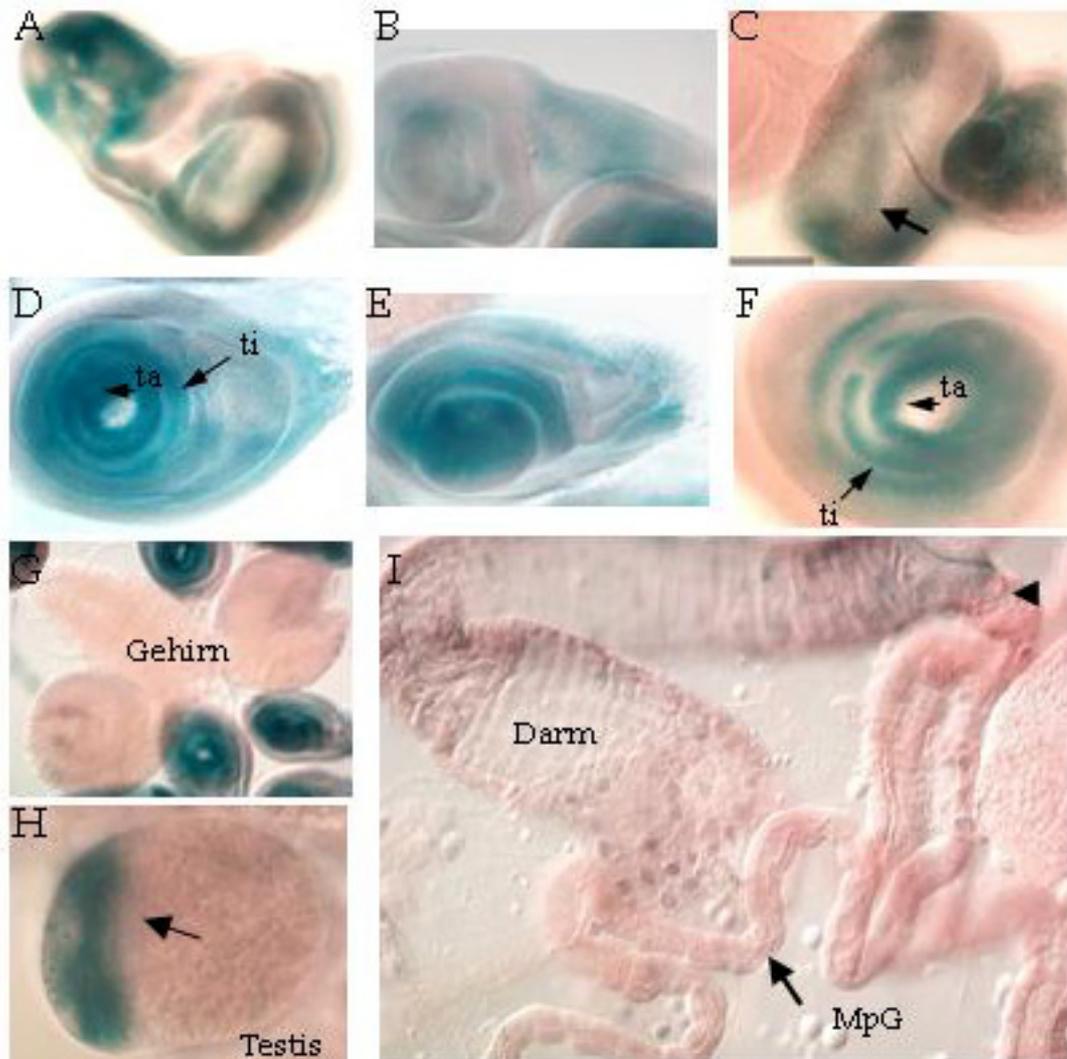


Abbildung 5.20: *lacZ*-Reporterstudie an Geweben von 3. Larven. Imaginalscheiben von 3. Larven der *rols6* Promotor-Konstrukt-Linie Rosh1,1. zeigen β -Galaktosidase Aktivität im Testis, in der Augen- und Antennen- und auch in der Flügelimaginalscheibe, sowie in den Segmenten Tarsus (ta) und Tibia (ti) der Beinimaginalscheiben (D-F). In den larvalen Malpighischen Gefäßen (MpG) und im Darmbereich war keine Reporteragenaktivität detektierbar. A) Flügelimaginalscheibe, B) Halterenimaginalscheibe, C) Augenimaginalscheibe, D-F) Beinimaginalscheiben, G) larvales Gehirn mit umliegenden Beinimaginalscheiben, H) Testis, der Pfeil weist auf die apikale Testisspitze hin, I) larvaler Enddarmbereich mit Malpighischen Gefäßen (Pfeil). Die Pfeilspitze weist auf den Ureter, über den die MpG mit dem Enddarm verbunden sind.

6. Diskussion

Die larvale Bewegungsmuskulatur von *Drosophila* wird während der Embryogenese gebildet und resultiert im letzten Embryonalstadium in einem stereotypischen Aufbau von 30 Muskeln pro Hemisegment (Bate, 1990; Bate and Martinez-Arias, 1993). Gebildet werden die Muskeln durch die Fusion zweier Zelltypen, bei der Muskelfounder-Zellen mit fusionskompetenten Myoblasten (Fcm's) zu multinukleären Myotuben verschmelzen. An diesen Myoblastenfusionsprozessen sind unterschiedliche Faktoren beteiligt, welche die grundlegenden Mechanismen wie Zell-Zellerkennung, -Migration und -Adhäsion vermitteln sollen. Dazu gehören u.a. die Mitglieder der Immunglobulin-Superfamilie (IgSF) Dumbfounded (Duf), Roughest (Rst) und Hibris (Hbs), ebenso wie SH3-domänentragende Adapterproteine wie Myoblast city (Mbc) und Multidomänen-Proteine wie Rolling pebbles (Rols) (Übersichtsartikel: Baylies et al., 1998; Frasch, M., 1999; Dworak, H.A. and Sink, H., 2002; Taylor, M.V., 2002). Mutanten für diese Gene weisen den charakteristischen Phänotyp von Fusionsmutanten auf, bei denen Zell-Zellerkennung und/oder die Zelladhäsion der Fcm's mit den Founder-Zellen gestört ist und so keine multinukleären Myotuben gebildet werden.

Die Malpighischen Gefäße (MpG) von *Drosophila* sind kein fusionierendes Gewebe. Ihre Anlage befindet sich in direkter Nachbarschaft zwischen der Anlage des Enddarmes und dem Primordium des posterioren Mitteldarmes und entstammen dem Ektoderm. Die Zellen dieses Gewebes proliferieren und bilden so Knospen, welche durch Zellteilung und -Wachstum verlängert werden. Gleichzeitig migrieren mesodermale Zellen von der Anlage der viszeralen longitudinalen Muskulatur zur Anlage der MpG und werden in den wachsenden Zellverband integriert (Denholm et al., 2003). Ist diese Phase abgeschlossen, elongieren die Gefäße nur noch durch die Umstrukturierung der Zellen und damit des gesamten Zellverbandes, bis der stereotypische „zwei Zellen umschließen das Lumen“-Aufbau erreicht ist, wobei die anterioren Gefäße in den ersten Abdominalsegmenten mit dem Fettkörper, die posterioren Gefäße mit dem Enddarm verknüpft werden (zur Übersicht siehe Skaer, 1993).

Bei diesen Vorgängen sind die oben angesprochenen Prozesse der Zell-Zellerkennung, der Zellmigration und der Zelladhäsion ebenso von essentieller Bedeutung, wie die Umstrukturierung des Zytoskelettes der beteiligten Zellen.

Aufgrund der essentiellen Rolle, welche die Rolling pebbles Isoform 7 (Rols7) in der Myoblastenfusion ausübt, und im Hinblick auf die differentielle Expression der zwei *rolling pebbles* Transkripte (*rols7* und *rols6*), sollten Funktionen der Isoform 6 in nicht-mesodermalen Geweben untersucht werden.

Im Folgenden sollen deshalb die einzelnen Ergebnisse dieser Arbeit unter den Aspekt der Funktion der Rolling pebbles Isoform 6 (Rols6) als potentiell Adapterprotein und die *rols6* Transkriptionsregulation während der Differenzierung der MpG diskutiert werden.

6.1 *rolling pebbles* mutante Embryonen zeigen Defekte in der Differenzierung der Malpighischen Gefäße

Die starken Defekte in der Ausbildung der somatischen Muskulatur in der Defizienz Df(3L)BK9 wurden auf die Deletion des Genes *rolling pebbles (rols)* zurückgeführt (Rau et al., 2001; Menon and Chia, 2001). Weitere Entwicklungsstörungen in anderen Geweben, die dem Verlust von *rols* zugeschrieben werden konnten, wurden für diese defiziente Linie bisher nicht beschrieben. Aufgrund der Expression des kurzen *rols* Transkriptes *rols6* in nicht mesodermalen Geweben konzentrierten sich die Analysen, die in der vorliegenden Arbeit durchgeführt wurden, auf die Differenzierung des Endoderms und der Malpighischen Gefäße während der Embryonalentwicklung von *Drosophila*.

Für homozygote Df(3L)BK9 Embryonen konnte ein nur selten auftretender, schwach ausgeprägter endodermaler Phänotyp festgestellt werden. Dieser äußert sich darin, dass das Endoderm, welches letztendlich den gesamten Darm umschließt, im Mitteldarmabschnitt Lücken aufweist. Dies bestätigt die Beobachtung aus vorangegangenen Analysen dieser Defizienz, dass der Dotter sich in einigen wenigen Embryonen in die Bauchhöhle ergoss (Rau, Dissertation, 2001). Dieser Defekt war aber statistisch nicht repräsentativ und konsistent feststellbar, so dass alle Nachfolgenden Analysen auf die Malpighischen Gefäße fokussierten.

Es stellte sich heraus, dass in homozygoten Embryonen dieser Linie Abweichungen in der Entwicklung der MpG zu beobachten sind. Obwohl die ersten Determinierungsschritte und die Ausbildung der Gefäße in den Stadien 11 bis 14 wildtypisch abzulaufen scheinen, werden diese Entwicklungsstörungen ab dem Stadium 15 sichtbar. Diese äußern sich darin, dass die Zellen der MpG sich während der späten Elongationsphase nicht so zueinander umorientieren, dass der wildtypische Aufbau von zwei Zellen, welche das Lumen umschließen, gebildet wird. Stattdessen bilden sich Zellkluster, wodurch Teilabschnitte des Hauptsegmentes der anterioren Gefäße verdickt erscheinen. Obwohl diese Verdickungen im letzten Embryonalstadium weitestgehend aufgelöst werden, erreichen die anterioren Gefäße nicht ihre Position in den anterioren Abdominalsegmenten 2/3, wo sie normalerweise im Fettkörper verankert werden. Sie verbleiben stattdessen im mittleren Abdomenbereich und bilden lassoähnliche und knotenförmige Strukturen aus. Dieser Phänotyp wurde auch in den *rols* spezifischen Allelen *rols^{xx117}* und EP(3)3330 gefunden. Diese Beobachtungen deuteten darauf hin, dass die

Entwicklungsstörungen der MpG auf Mutationen innerhalb des *rolling pebbles* Genortes beruhen, was auf eine Funktion von *rols6* in diesem Gewebe schließen ließ. Aufgrund der in den betrachteten Allelen ebenfalls auftretenden Muskelfusionsstörungen war allerdings anzunehmen, dass beide *rolling pebbles* Transkripte betroffen sind.

6.2.1 EP(3)3330*5a ist eine *rols6* spezifische Deletionsmutante

Um die Funktion eines Genes in einem Gewebe zu beschreiben, ist es unerlässlich, das Gen zu mutieren, um die Auswirkungen einer solchen Mutation zu analysieren. In *Drosophila* ist der molekulare Zugang durch Transposoninsertionen in der Nähe der kodierenden Genregion gegeben. Die in dieser Arbeit gewählte Remobilisierung der Transposoninsertion EP(3)3330 war eine Möglichkeit zur spezifischen Mutagenese, da durch die Exzision eines P-Elementes häufig nur ein Teil des P-Elementes oder auch ein der Insertionsstelle direkt benachbarter genomischer Bereich deletiert wird (JumpOut) (Delattre et al., 1995). Diese Methode kann auch dazu benutzt werden, weitere Neuinsertionen in dem gewünschten Genbereich zu generieren, da P-Elemente die Eigenschaft besitzen sollen, nach Remobilisierung in einer Entfernung von etwa 100 kb, relativ zur Insertionsstelle, zu reintegrieren (so genanntes Local Hop Ereignis) (Tower et al., 1993; Zhang and Spradling, 1993). Diese Ereignisse beruhen allerdings auf dem Zufallprinzip und erfordern sowohl eine ausreichend hohe Anzahl an JumpOut oder Local Hop-Nachkommen als auch molekulare Analysen der generierten potentiellen Allele.

Der P-Element JumpOut Versuch mit dem EP(3)3330 erbrachte eine Vielzahl von letalen und vitalen Linien. Diejenigen letalen Linien, welche allelisch zum *rols* Genort sind, zeigten ausnahmslos den für *rols7* Allele beschriebenen Muskelfusionsphänotyp, was bedeutet, dass beim P-Element JumpOut ein Ereignis stattgefunden haben muss, welches eine Mutation des *rols7* Transkriptes erzeugt hat. Sie sind demnach keine spezifischen *rols6* Allele und wurden bisher nicht molekular charakterisiert.

Eine auf PCR basierende Strategie der vitalen JumpOut Linien deckte auf, dass etwa 1,5 kb im genomischen, dem ersten *rols6* Exon 5' vorgelagerten Bereich, in der Linie EP(3)3330*5a deletiert sind. Da postuliert wurde, dass in diesem Bereich transkriptionell regulierende Promotorelemente lokalisiert sind, war diese Linie als eine potentielle *rols6* spezifische Deletion anzusehen und wurde deswegen phänotypisch charakterisiert.

6.2.2 Die Defekte in den Malpighischen Gefäßen von *rolling pebbles* Mutanten korrelieren mit einer Störung des *rols6* Transkriptes

Embryonen der JumpOut-Linie EP(3)333*5a zeigten in β 3-Tubulin- und Fasciclin III-Antigennachweisen keine Entwicklungsstörungen in mesodermalen Derivaten. Sowohl die somatische als auch die viszerale Muskulatur wird gebildet, was bedeutet, dass *rols7* nicht vom JumpOut Ereignis in dieser Linie betroffen ist. Die Malpighischen Gefäße dieser Linie hingegen zeigten den schon in Df(3L)BK9, *rols*^{xx117} und in der Ausgangslinie EP(3)3330 beschriebenen Phänotyp. Diese phänotypischen Beobachtungen lassen den Schluss zu, dass eine Korrelation zwischen einer mutierten Form des Gens *rols6* und den Defekten in der Entwicklung der MpG besteht und dass dieser Phänotyp nicht auf Grund von Störungen in anderen Geweben als sekundärer Defekt hervorgerufen wird.

Weitere Evidenzen für diese Hypothese verdichten sich bei der Betrachtung der aus dem JumpOut Experiment hervorgegangenen letalen JumpOut-Linien. Durch β 3-Tubulin Antigennachweis wurde ersichtlich, dass alle zum *rols* Genort allelischen letalen EP*-Linien Fusionsstörungen in der somatischen Muskulatur aufweisen. Demnach muss das mesodermspezifische *rols7* Transkript in diesen Linien von einer Mutation betroffen sein. Bei der Betrachtung der Malpighischen Gefäßen mittels Cut und Fasciclin II Antigennachweis stellte sich heraus, dass diese nicht mehr die Entwicklungsstörungen aufweisen, wie es in der Ausgangs-EP-Insertionslinie der Fall ist. In diesen Linien wurde durch die Remobilisation von EP(3)3330 der Phänotyp der MpG zum WT revertiert. Dies kann bedeuten, dass bei diesen JumpOut Ereignissen die EP(3)3330 Insertionsstelle nach der Exzision des P-Elementes korrekt repariert wurde, an anderer Stelle aber kurzfristig eine Neuinsertion stattgefunden hat, welche spezifisch das lange *rols* Transkript betrifft. Ob die Letalität dieser Linien auf dieser eventuellen neuen Mutation im *rols* Gen beruht, kann nur vermutet werden; die Komplementationstests zum *rols* Genort und mit *rols* spezifischen Allelen, sowie der Fusionsphänotyp in diesen Linien sprechen aber dafür.

Diese Daten sind erste Beweise für eine Funktion von Rols6 in der Differenzierung der Malpighischen Gefäße von *Drosophila*. Eine Verifizierung dieses Postulates muss allerdings noch durchgeführt werden. Dies kann durch Rettungsexperimente im *rols* mutantern genetischen Hintergrund erfolgen. Eine Möglichkeit dazu wäre durch die Fertigstellung des in Abschnitt 5.7.1 beschriebenen UAS-*rols6*FL4 Konstruktes gegeben. Durch eine ektopische Expression eines FLAG-markierten Rols6 Proteins mittels der zur Verfügung stehenden endodermalen und MpG-spezifischen Treibern *arc*-Gal4 (Liu and Lengyel, 2000) und *drm*-Gal4 (Green et al., 2002) könnte eine Rettung des Phänotyps der MpG in *rolling pebbles* Mutanten dokumentiert werden.

6.3 Die aus dem EP-JumpOut Experiment erhaltenen letalen Linien können zur Charakterisierung des EMS-Allels *rols^{xx117}* beitragen

Das muskelfusions-relevante Gen *rolling pebbles* wurde mittels der Defizienz Df(3L)BK9 identifiziert. Der molekulare Zugang und die Klonierung des Gens wurden durch zwei P-Elementinsertionen P1027 und P1729 gewährleistet, die im zweiten *rols7* Intron inserieren (Rau et al., 2001; Rau, Dissertation, 2001). Zur phänotypischen Charakterisierung des *rolling pebbles* Fusionsphänotyps standen auch zwei EMS-Allele *rols^{AD328}* und *rols^{xx117}* (Gisselbrecht et al., 1996) zur Verfügung, die durch Komplementationstests als *rols* spezifische Allele identifiziert wurden (Rau, Dissertation, 2001). Eine Sequenzanalyse dieser EMS induzierten Mutanten ergab bisher allerdings keine Hinweise darauf, in welchem Genabschnitt die Mutationen zu finden sind und wie sie sich auf die Rols-Proteinsynthese auswirken (persönliche Mitteilung, Dr. A. Holz).

In der vorliegenden Arbeit wurde eines der beiden EMS-Allele, *rols^{xx117}*, wegen seiner stammhaltungsbedingt vorteilhafteren Verfügbarkeit gegenüber *rols^{AD328}* in die Untersuchungen zur Entwicklung der MpG mit einbezogen.

Die Tatsache, dass *rols^{xx117}* sowohl schwere Störungen in der Muskelfusion der somatischen Muskulatur als auch die für *rols* charakteristischen Differenzierungsdefekte der Malpighischen Gefäße aufweist, lässt den Rückschluss zu, dass in dieser Linie beide *rols* Transkripte betroffen sein müssen.

Die aus dem EP(3)3330 JumpOut Experiment entstandenen letalen Linien sind keine *rols6* spezifische Deletionslinien. Sie wurden aber bisher noch nicht molekular charakterisiert. Es ist aber durchaus denkbar, dass durch eine zwischenzeitliche Neuintegration des P-Elementes eventuell der *rols7* spezifischen 5'-Bereich betroffen wurde. Sollte dies der Fall sein, könnten diese Linien neu generierte *rols7* Allele darstellen.

Bei der Zuordnung der durch den JumpOut entstandenen Komplementationsgruppen, verhielt sich die Linie EP(3)3330*58a abweichend in ihrem allelischen Verhalten. Im Vergleich mit den anderen generierten, potentiellen *rols* Allelen ergab sich, dass die Mutation zwar innerhalb der Defizienz lokalisiert ist, aber nicht mehr zum Ausgangs P-Element und auch nicht zum EMS-Allel *rols^{xx117}* allelisch ist. Da sich EP(3)3330*58a aber zu allen anderen neu generierten *rols* Allelen allelisch verhält, könnten molekulare Analysen dieser Linien Aufschluss über das Zustandekommen der Komplementationsgruppen geben und eventuell die Mutation *rols^{xx117}* auf einen Teilbereich des Gens beschränken. Alternativ wären auch Western Blot Analysen mit den neu generierten C-terminalen Rols-Peptidantikörpern (persönliche Mitteilung, Dr. D. Buttgerit) oder aber mit einem spezifisch gegen Rols6

gerichteten Antikörper (siehe Abschnitt 5.7.2) von Nutzen, um die Auswirkungen dieser Mutationen auf die Proteinsynthese der Rols Proteine zu analysieren.

6.4 Eine subzelluläre Lokalisationsanalyse von Rols6 könnte Aufschluss über Zelladhäsionsvorgänge unter Rols-Beteiligung in den MpG geben

Das Protein Rols7/Ants wird in den Muskelfounder-Zellen exprimiert und ist im Zytoplasma verteilt. Auf subzellulärem Level konnte beobachtet werden, dass Rols7/Ants an den Stellen entlang der Zellmembran akkumuliert, wo Founder-Zellen und Fcm's in Kontakt treten (Chen and Olson, 2001; Menon and Chia, 2001). Dies konnte auch in Fusionsmutanten wie *stick and stones (sns)* (Bour et al., 2000), *D-mef2* (Bour et al., 1995), *myoblast city (mbc)* (Erickson et al., 1997) und *blown fuse (blow)* (Doberstein et al., 1997) gezeigt werden, in denen das Rols7 Protein an den Zellmembranen von unfusionierten Founder-Zellen angereichert wird, was darauf schließen lässt, dass der eigentliche Fusionsprozess kurz nach der Anreicherung von Rols an der Membran eingeleitet wird (Menon and Chia, 2001). In mutanten Embryonen des Rols7/Ants Interaktionspartners Dumbfounded/ Kin of Irregular-chiasm-C (Duf/ Kirre) (Ruiz-Gomez et al., 2000; Strünkelnberg et al., 2001) konnte eine solche Verteilungsverschiebung vom Zytoplasma zur Zellmembran nicht beobachtet werden (Chen and Olson, 2001; Menon and Chia, 2001).

Die subzellulären Analysen von Menon und Chia (2001) wurden mit einem Antikörper durchgeführt, der gegen einen Bereich im Rols7 spezifischen N-Terminus gerichtet ist. Demzufolge wurde mit diesem Antikörper nur spezifisch die Rols7 Proteinverteilung analysiert. Der von Chen und Olson (2001) generierte anti-ANTS Antikörper richtete sich gegen ein C-terminales Peptid (AS 1656-16710). Dieser Antikörper müsste neben der Rols7/Ants Verteilung auch Rols6 detektieren. Dies wurde aber bisher nicht beschrieben.

Um aber eine Funktionsanalyse für Rols6 erfolgreich abzuschließen, ist es essentiell, wie auch in der Myogenese die subzelluläre Verteilung des Proteins in den Zellen der MpG zu beschreiben, zumal in den Analysen der vorliegenden Arbeit nicht eindeutig geklärt werden konnte, ob sich die Expression von *rols6* nur auf die Principal Cells (PCs) beschränkt. Auf Grund der erlangten Daten wird angenommen, dass Rols6, wie auch Rols7 in der Myoblastenfusion, dort eine Funktion als Adapterprotein übernimmt, wo es zur Signalübertragung durch Zell-Zellkontakt kommt. Demnach ist auch für die Rols6 Proteinverteilung anzunehmen, dass es im Verlaufe der Umstrukturierung der Gefäße zu einer Umverteilung des Proteins in ähnlicher Weise, wie in der Myogenese beschrieben, kommt. Ebenso ungeklärt ist die Frage, ob *rols* in den Stellate Cells (SCs) der MpG exprimiert wird. Dies konnte in den *rols6 in situ* Hybridisierungen nicht eindeutig geklärt werden.

Erste Analysen mit einem Rols-Antikörper, der gegen einen C-terminalen Bereich beider Rols Proteine gerichtet ist (persönliche Mitteilung, Dr. D. Buttgerit) ergaben Hinweise auf eine zytoplasmatische Rols6 Verteilung in der Nähe des Zellkerns in den PCs. Die Spezifität dieses Antikörpers wird aber derzeit noch getestet. Auf Grund dessen waren bisher auch keine Doppelantikörperrnachweise gegen Rols-Teashirt (Tsh) und Rols-Cut möglich, welche Aufschluss über die Expression von Rols6 in den Zellpopulationen der MpG erbringen würden. Mit Hilfe dieses Antikörpers und mit den in Abschnitt 5.7 beschriebenen Ansätzen zur Rols6 *in vivo* Detektion mittels eines spezifischen Rols6 Antikörpers oder durch den Nachweis eines FLAG-getaggtten Rols6 Proteins, könnten diese Fragen geklärt werden.

6.5 Beurteilung der Phänotypen der Malpighischen Gefäßdifferenzierung in Mutanten von potentiellen Rolling pebbles Interaktionspartnern

6.5.1 *myoblast city* und *rac* mutante Embryonen zeigen ähnliche Defekte in der Malpighischen Gefäßdifferenzierung wie *rolling pebbles* Mutanten

Das Adapterprotein Myoblast city (*mbc*) (Erickson et al., 1997; Nolan et al., 1998) wurde in Co-Immunoprecipitations-Experimenten von Chen und Olson (2001) *in vitro* als Rols7 Interaktionspartner beschrieben. Ubiquitär zytoplasmatisch exprimiert ist dieses Protein auch in Vertebraten (DOCK180) an der Zytoskelettorganisation beteiligt, indem es, gemeinsam mit dem Protein ELMO1, als funktioneller „guanine nucleotid exchange factor“ (GEF) aktivierend auf die GTPase Rac wirkt (Gumienny et al., 2001; Brugnera et al., 2002; Cote et al., 2002). Die Aktivierung von Rac ist ein essentieller Mechanismus in biologischen Prozessen, wie z.B. Zell-Motilität, Phagozytose und Zytoskelett-Umstrukturierung. Eine Beteiligung an diesen biologischen Vorgängen wurde für DOCK180/ Mbc sowohl in *Drosophila* (Rushton et al., 1995; Erickson et al., 1997; Nolan et al., 1998) als auch für das DOCK180 Ortholog CED-5 in *C. elegans* beschrieben (Wu and Horvitz, 1998, Reddien and Horvitz, 2000).

Auf Grund dieser beschriebenen Funktionen und Interaktionen, und da sowohl *mbc* als auch *rac* Mutanten schwere Muskelfusionsstörungen in *Drosophila* aufweisen (Erickson et al., 1997; Hakeda-Suzuki et al., 2000; Önel et al., in Vorbereitung), wurden sie im Hinblick auf einen Phänotyp in der Differenzierung der MpG analysiert. Es stellte sich heraus dass Embryonen beider Mutanten in der Entwicklung der MpG ähnlich gestört sind, wie in *rols6* Mutanten.

Diese Daten geben einen ersten Hinweis auf die Beteiligung der Proteine Rols6, Mbc und Rac in einer gemeinsamen Wirkkette, die dazu führt, dass die beteiligten Zellen bei der Elongation der anterioren MpG strukturell so umorganisiert werden, dass am Ende der Embryonalentwicklung zwei Zellen das Lumen der Gefäße umfassen. Dies

geschieht in *rols6* Mutanten des Stadiums 15 nicht. Die in *rols6* Mutanten beschriebenen Zellkluster und Verdickungen sind in *mbc* und *rac* Mutanten nicht zu beobachten. Dennoch erreichen die anterioren Gefäße nie ihre Endposition in Abdominalsegment 2/3. Ob die Missorientierung im Wachstum und die schlaufenförmige Führung der anterioren Gefäße in *mbc* und *rac* Mutanten auf einem Zytoskelett-Umstrukturierungs-Defizit beruhen, ist auf Grund der biologischen Funktionen beider Proteine sehr wahrscheinlich.

6.5.2 Die mesodermalen Stellate-Zellen sind in *mbc* und *rac* Mutanten befähigt, zur Anlage der Malpighischen Gefäße zu migrieren

Wie in Abschnitt 2.3.2 beschrieben, setzen sich die MpG in *Drosophila* aus zwei Zellpopulationen zusammen, den Principal Zellen (PCs) und den Stellate Zellen (SCs). Beide Zelltypen konnten sowohl in *mbc* als auch in *rac* Mutanten, wenn auch teilweise in reduzierter Anzahl, nachgewiesen werden (siehe Abschnitt 5.5 und 5.6). Die Anzahl der PCs scheint in den Mutanten beider Gene wildtypisch gebildet zu werden. Dies wurde aber nicht statistisch belegt.

Die SCs gehen aus der longitudinalen viszeralen Muskulatur hervor, sind also mesodermaler Herkunft und räumlich von der Anlage der MpG getrennt. Sie werden während der Keimstreifverkürzung aus dem viszeralem Mesoderm ausgegliedert und migrieren zur Anlage der MpG (Denholm et al., 2003). Wie in Abschnitt 6.5.1 bereits erwähnt, ist aus Vertebraten-Modellen und *C. elegans* bekannt, dass die Rac-Aktivierung via DOCK180/Mbc/CED-5 und seines Interaktionspartners ELMO1/CED-12 einen wesentlichen Mechanismus in der Zellmigration darstellt (Gumienny et al., 2001; Reddien and Horvitz, 2000; Wu et al., 2001; Zhou et al., 2001). In diesem Kontext ist die Anwesenheit der SCs gerade in *mbc* und *rac* Mutanten unerwartet, denn, obwohl sie in ihrer Anzahl reduziert erscheinen, ist es ihnen möglich, Migrationsprozesse zu durchlaufen und in die MpG integriert zu werden. Es ist also nicht auszuschließen, dass die Rac-Signalkaskade bei der Migration dieser speziellen Zellen keine essentielle Rolle spielt. Allerdings sind bisher keine weiteren Faktoren oder Signalkaskaden für diesen Migrationsprozess beschrieben worden.

6.5.3 Eine Funktion von Dumbfounded/ Kin of Irregular-chiasm-C in der Differenzierung der Malpighischen Gefäße ist nicht bekannt

Seit den Co-Immuno-precipitations-Experimenten, die von Chen und Olson (2001) mit Ants/Rols7 durchgeführt wurden, ist bekannt, dass Ants/Rols7 *in vitro* mit dem Transmembran-Immunglobulin Protein Dumbfounded/ Kin of Irregular-chiasm-C (Duf/Kirre) (Ruiz-Gomez et al., 2000; Strünkelnberg et al., 2001) interagiert. Dieses Protein kennzeichnet während der somatischen Myoblastenfusion nur eine

Zellpopulation, da es nur in den Muskelfounder-Zellen exprimiert ist. Duf wird eine essentielle Rolle in der Zell-Zell-Erkennung zwischen den Founder-Zellen und den Fcm's zugeschrieben, da in *duf* mutanten Embryonen, im Gegensatz zu *rols* Mutanten, wo erste Fusionen stattfinden können, die Fcm's orientierungslos Filopodien ausstrecken, um ihre Targets, die Founder-Zellen, zu kontaktieren (Übersichtsartikel: Frasch and Leptin, 2000; Menon and Chia, 2001).

Während der Myoblastenfusion scheint das Zusammenspiel der zwei Ig-Domänen enthaltenden Proteine Dumbfounded und Stick and stones (*sns*) (Bour et al., 2000) ein wesentlicher Bestandteil der Zellkommunikation zwischen den beiden Zellpopulationen zu sein, wobei *Sns* nur in den Fcm's exprimiert wird. Eine Interaktion der beiden Immunglobuline Duf und *Sns* wird diskutiert (Dworak et al., 2001; Übersichtsartikel: Dworak and Sink, 2002).

In der Elongationsphase der MpG werden die Zellen strukturell so umorientiert, dass jeweils zwei Zellen das Lumen der Gefäße umschließen. Bei diesen Reorganisationsprozessen müssen auch die Zellkontaktstellen innerhalb des Gewebes verändert werden, was bedeutet, dass die Zellen untereinander kommunizieren müssen. Sowohl für Duf als auch für *Sns* ist bisher keine Expression in diesem Gewebe beschrieben worden. Auch wurde bisher auf Seiten der PCs kein Molekül identifiziert, welches eine signalisierende Funktion in der Zelladhäsion der PCs untereinander übernimmt, wie es für die Myogenen Faktoren Duf und *Sns* diskutiert wird.

Aus der unterschiedlichen Herkunft der PCs und der SCs ergibt sich in der Entwicklung der MpG eine ähnliche Situation der Zell-Zell-Kommunikation wie in der Myogenese, wo die Founder-Zellen und die Fcm's über unterschiedliche Sets an Faktoren verfügen. Da die SCs mesodermaler Herkunft sind und Duf auch bei der Bildung der viszeralen Muskulatur eine essentielle Rolle spielt (San Martin et al., 2001; Klapper et al., 2002) könnte Duf ein Kandidat für die Übermittlung von Signalen auf Seiten der SCs darstellen.

Um die Frage einer eventuellen Expression von Duf in den MpG zu klären, wurde in der vorliegenden Arbeit zum einen das Expressionsmuster der Enhancer-Trap-Linie rP298-*lacZ* (Nose et al., 1998) untersucht, zum anderen wurden Antikörperfärbungen mit einem anti-Kirre Antikörper (aus Kaninchen; zur Verfügung gestellt von K.F. Fischbach) an Wildtyp Embryonen durchgeführt (Daten nicht gezeigt). Diese Pilotexperimente konnten allerdings keinen Aufschluss auf Duf/ Kirre Expression in den MpG geben.

Analysen zur *Sns* Expression wurden im Rahmen dieser Überlegungen nicht durchgeführt. Die Expression des *Sns* Paralogenes *Hibris* wird im Abschnitt 6.10 diskutiert.

6.6 Das *rolling pebbles* Transkript *rols6* wird differentiell unabhängig von *rols7* transkribiert

Seit den Analysen zur Funktionalität von *rols7* während der *Drosophila* Myogenese war bekannt, dass der *rolling pebbles* Genort für ein zweites, kürzeres Transkript (*rols6*) kodiert, welches nicht im Mesoderm exprimiert wird (Rau et al., 2001). Auf Grund der differentiellen Gewebeverteilung der Transkripte konnte also davon ausgegangen werden, dass das kurze *rols6* Transkript über einen eigenen regulativen Promoterbereich verfügt. Anlass für die Vermutung, dass dieser im 5' vorgelagerten genomischen Bereich zwischen dem 2. spezifischen *rols7* Exon und dem ersten spezifischen *rols6* Exon lokalisiert sein könnte, war in der genomischen *rols* Genorganisation gegeben (siehe Abbildung 2.1), da dieser intronische Bereich mit ca. 5000 bp diverse Möglichkeiten für Bindestellen für Transkriptionsfaktoren zu enthalten schien.

Die in dieser Arbeit generierten *lacZ*-Reportergenkonstrukte konnten eindeutige Beweise für einen *rols6* spezifischen Promoter im genomischen 5'-Bereich relativ zur *rols6* Transkriptionsinitiationsstelle erbringen (siehe Abschnitt 5.8.3). Es stellte sich heraus, dass ein etwa 1,1 kb großes Fragment (Position +1 bis -1100) aus dieser Region ausreichend ist, um in *lacZ*-Expressionsstudien die gesamte *rols6* Expression darzustellen. Innerhalb dieses Fragmentes konnte ein ca. 470 bp großes Fragment isoliert werden (Position -340 bis -800 relativ zum Transkriptionsstart) mit welchem eine *lacZ*-Expression ausschließlich im Endoderm detektiert werden konnte. Dies bedeutet, dass in diesem Bereich ein oder mehrere regulative Elemente lokalisiert sind, die für die *rols6* Expression im Endoderm verantwortlich sind. Wo die speziell für die Expression in den MpG verantwortlichen Regulationselemente lokalisiert sind, kann mit den generierten Konstrukten nicht genauer eingegrenzt werden. Vermutlich liegen diese in dem weiter 5'gelegenen genomischen Bereich stromaufwärts von Position -800 relativ zum Transkriptionsstart, da *Rosh#0,45*, *Rosh0,3* und *Rosh0,7* (siehe Tabelle 5.5) keine Expression in diesem Gewebe zeigten. Zur Klärung dieser Fragestellung müssten weitere Konstrukte generiert werden, die sich aus Kombinationen dieser Teilfragmente mit dem Bereich -800 bis -1100 zusammensetzen.

Auf die Regulation der Expression im Pharynxbereich wurde in der vorliegenden Arbeit nicht näher eingegangen und stellt eine separate Fragestellung für zukünftige Analysen dar.

Mit den analysierten Promoterkonstrukten konnte aber der essentielle *rols6* Promoterbereich auf etwa 1100 bp stromaufwärts des Transkriptionsstartes eingegrenzt werden. Ebenso wurde hierdurch auch gezeigt, dass dieser *rols*

intronische, genomische Bereich spezifisch auf *rols6* wirkt, da keine *lacZ*-Expression im somatischen Mesoderm detektiert wurde.

6.7 Beurteilung der zusätzlich zum *rols6* Expressionsmuster auftretenden Expressionen in den Promoterkonstrukten Rosh1,1 und Rosh3

Die Färbungen der Linien Rosh1,1 und Rosh3 zeigten neben den erwarteten Expressionsdomänen (Pharynx, Endoderm und MpG) auch zusätzliche Muster. In Linien beider Konstrukte wurde auch eine schwache β -Galaktosidase-Expression im Fettkörper detektiert (siehe Abschnitt 5.8.3). Im Hinblick auf die Beurteilung des *rols6* Phänotyps in den MpG und im Kontext der Problematik der Anheftung der anterioren Gefäße im Fettkörper könnte diese *lacZ*-Expression die Frage einer *rols6* Expression im Fettkörper aufwerfen. Da aber in den *rols6* spezifischen *in situ* Hybridisierungen das Transkript nie im Fettkörper detektiert wurde, und da die Fettkörperfärbung nicht in allen Linien der generierten Konstrukte auftrat, ist diese Färbung eher einem Enhancer-Trap oder einer Hintergrundfärbung zuzurechnen, als einer zusätzlichen *rols6* Expressionsdomäne.

Die in Rosh3 auftretende Färbung in den Amnioserosazellen hingegen war aus dem Enhancer-Trap Muster der P-Element-Insertion P1027 bekannt, die ca. 100 bp vor dem *rols6* Transkriptionsstart inseriert (Rau, Dissertation, 2001). Hinweise auf eine *rols* Expression in Amnioserosazellen sind aber weder aus der *rols6* Transkriptverteilung noch aus *in situ* Hybridisierungen mit *rols7* spezifischen Sonden zu entnehmen (Rau et al, 2001; Rau, Dissertation, 2001) und wurden auch nicht während der Analysen der vorliegenden Arbeiten deutlich. Da die umgebenden genomischen Regionen der Insertionsstellen von P1027 und Rosh3 nicht auf potentielle Enhancer untersucht wurden, kann es als Zufall angesehen werden, dass beide P-Elemente unter den Einfluss eines Amnioserosazell-Enhancers geraten sind.

6.8 *rols6* transkriptions-aktivierende Faktoren konnten in ersten Analysen in Mutanten von früh zell-determinierenden Transkriptionsfaktoren nicht identifiziert werden

Nachdem die putative *rols6* Promoterregion auf etwa 1100 bp stromaufwärts des Transkriptionsstartes eingegrenzt werden konnte, wurde diese Sequenz mittels der Suchprogramme TRANSFAC SEARCH, PatchTM und AliBaba2.1 (zugänglich für unkommerzielle Nutzung über <http://www.gene-regulation.com>) auf potentielle Bindestellen für Transkriptionsfaktoren analysiert. Dabei wurden nur wenige, als

wahrscheinlich erscheinende Voraussagen gemacht, welche die zell-determinierenden Faktoren Krüppel, GATA-Faktor und GAGA-Faktor einschloss. Der *Drosophila* GAGA-Faktor wurde erstmals als sequenzspezifisch DNA-bindendes Protein mit stimulierender Wirkung auf die Transkription der Gene *engrailed (en)* und *Ultrabithorax (Ubx)* *in vitro* beschrieben (Biggin and Tjian, 1988; Soeller et al., 1988). Kodiert wird der GAGA-Faktor vom Gen *Trithorax-like (trl)* (Farkas et al., 1994). DNA-Bindestellen für Trl wurden ebenso in den Promotoren vieler anderer Genen identifiziert, u.a. in den regulativen Regionen von *fushi tarazu (ftz)* (Topol et al., 1991), den Hitzeschock-Genen *hsp26* (Glaser et al., 1990; Lu et al., 1993) und *hsp70* (Lee et al., 1992) und auch in den *Histon3* und *Histon4* Promotoren (Gilmour et al., 1989). Ausgehend von diesen ersten Daten wurde angenommen, dass der GAGA-Faktor ein allgemeiner Faktor der Transkriptionsmaschinerie sei. Neben der Transkriptionsregulation von homeotischen Genen (Schwendemann and Lehmann, 2002), ist bekannt, dass dieser Faktor stark maternal vererbt wird und in der Oogenese eine globale Rolle im Aufbau oder/und in der Chromatin-Architektur, der Chromosomen-Kondensation und –Segregation übernimmt (Bhat et al., 1996). Trotz dieser sehr weit gefassten Funktionspalette wurde eine Expression oder Funktion des GAGA-Faktors bisher in den embryonalen Malpighischen Gefäßen nicht beschrieben.

Da dieser Faktor an eine sehr häufig vorkommende Konsensussequenz bindet (GAGAG), ist dies als Grund der Vorhersage durch die Computerprogramme anzusehen. Die *rols6* Transkriptanalyse in *trl* Mutanten in Abschnitt 5.9 hat gezeigt, dass der GAGA-Faktor keine direkte Regulatorfunktion von *rols6* übernimmt.

Die Voraussagen einer potentiellen Bindung des GATA-Faktors im *rols6* Promoter wurden auf Grund der starken endodermalen Komponente in der *rols6* Transkriptverteilung in *in situ* Hybridisierungen an Mutanten überprüft. Die GATA-Faktoren stellen in *C. elegans*, in *Drosophila* und in Vertebraten eine Familie von Zink-Finger-Transkriptionsfaktoren dar, die über eine core-consensus Sequenz -GATA- an DNA binden (Yamamoto et al., 1990; Omichinski et al., 1993; Pedone et al., 1997), und an der Entwicklung diverser Gewebe beteiligt sind.

Die Faktoren GATA-4, GATA-5 und GATA-6 werden im Endoderm und Darmbereich von Säugetieren exprimiert, wo sie an der Differenzierung der Gewebe beteiligt sind (Laverriere et al., 1994; Arceci et al., 1993; Tamura et al., 1993; Soudais et al., 1995; Suzuki et al., 1996; Gao et al., 1998). In *Drosophila* und *C. elegans* sind es die GATA-Faktoren *serpent (srp)* und *end-1*, die essentielle Rollen in der endodermalen Darmentwicklung übernehmen (Rehorn et al., 1996; Zhu et al., 1997).

In *Drosophila* *srp* Mutanten wird kein Mitteldarm gebildet. Stattdessen werden die angelegten Zellen des posterioren Mitteldarmprimordiums zu Zellen des Enddarmes transformiert, wobei die Determinierung der Malpighischen Gefäßzellen, die aus

derselben Anlage stammen, in diesen Mutanten nicht beeinträchtigt ist (Reuter, 1994).

Ein weiteres, GATA-Faktor kodierendes Gen wurde mit *grain* (*grn*) beschrieben (Lin et al., 1995). Das *grain* Transkript kann schon im Blastodermstadium detektiert werden, eine sehr starke Komponente des Gens konnte aber auch in Stadium 11 Embryonen in den Darmprimordia beschrieben werden (Lin et al., 1995). Auch wurde eine Funktion des Gens im Prozess der Zell-Reorganisation beschrieben (Brown and Castelli-Gair Hombria, 2000).

Im Hinblick auf diese Daten wurden Mutanten dieser beiden *Drosophila* GATA-Faktoren auf *rols6* Expression analysiert. Die *in situ* Hybridisierungen an *grain*^{7L} mutanten Embryonen erbrachten allerdings keine eindeutig dokumentierbare Ergebnisse. Ebenso konnte der indirekte Nachweis der *rols6* Transkription in diesen Mutanten durch das Einkreuzen des Rosh1,1 Konstruktes nicht eindeutig erbracht werden (Daten nicht gezeigt). Daher ist zu diesem Zeitpunkt eine Beteiligung von Grain an der Regulation von *rols6* im Endoderm nicht ausgeschlossen.

Eine solche Funktion kann aber für den GATA-Faktor Serpent ausgeschlossen werden, da in *rols6* spezifischen *in situ* Hybridisierungen das Transkript eindeutig nachgewiesen werden konnte.

Die oben aufgeführten Transkriptionsfaktoren können demnach als Regulatoren des *rols6* Gens ausgeschlossen werden. Faktoren, welche die Expression des Transkriptes im Endoderm positiv regulieren bleiben daher noch unbekannt.

Die *rols6* Transkriptanalyse in *krüppel* Mutanten wurde auf Grund des Hinweises durch das TRANFAC SEARCH Programm, welches zwei Krüppel-Bindestellen im *rols6* Promoterbereich vorhergesagt hatte, durchgeführt. Ebenso erschien eine regulative Funktion von Krüppel auf *rols6* auf Grund der Determinierenden Wirkung von Krüppel auf die PCs der MpG und der frühen Expression von *rols6* in diesen Zellen wahrscheinlich. Sowohl in den Reporterger-Assays als auch durch *in situ* Hybridisierungen konnte diese Vorhersage widerlegt werden. Allerdings scheint aber auch kein von Krüppel reguliertes Zielgen an der Expression von *rols6* beteiligt zu sein.

Eine starke Expression von *rols6* im Bereich des Proventrikels wurde sowohl in den *lacZ*-Reportergerstudien in Abschnitt 5.8.3 als auch aus den *in situ* Hybridisierungen (Abschnitt 5.8.1) ersichtlich. In diesem vorderen Darmabschnitt wird zur gleichen Zeit der Transkriptionsfaktor Defective proventriculus (*dve*) exprimiert, der später auch funktionell im posterioren Darmbereich wirkt (Fuß and Hoch, 1998; Nakagoshi et al., 1998). Eine Regulation des *rols6* Transkriptes durch diesen Faktor ist aber ausgeschlossen, da in *dve* mutanten Embryonen das *rols6* Transkript nachgewiesen werden konnte.

Mutanten des Transkriptionsfaktors *punt* (*put*) (Letsou et al., 1995; Ruberte et al., 1995), der wegen seiner zeitgleichen Expression im Darmbereich und eines beschriebenen Defektes in den MpG als interessant erschien, waren ebenfalls Gegenstand erster Analysen zur Identifizierung von *rols6* Regulatoren. Die Malpighischen Gefäße in *punt* mutanten Embryonen variieren sehr stark innerhalb ihres Verlaufes in ihrer Dicke. In diesen Mutanten ist nicht die Zellanzahl der MpG-bildenden Zellen reduziert oder vervielfältigt, sondern das Zellarrangement ist defekt. Untersuchungen zeigten, dass ca. 80% des proximalen Teiles der Gefäße nicht elongieren (Jack and Myette, 1999). Auch in *punt* Mutanten konnte das *rols6* Transkript nachgewiesen werden (siehe Abschnitt 5.9). Durch diese Analyse konnte die indirekte Einwirkung des früh zell-determinierenden Faktors Decapentaplegic (Dpp) auf die *rols6* Expression ausgeschlossen werden, da *punt* für den den TGF- β Typ II Receptor kodiert und als Heterodimer mit *thick veins* (*thv*) an der Dpp-Signalweiterleitung beteiligt ist (Letsou et al., 1995; Ruberte et al., 1995).

Ein Regulator für *rols6* bleibt also auch für die Expression in den MpG unbekannt. Eine Liste von Transkriptionsfaktoren, deren Expression in den MpG von *Drosophila* beschrieben wurden kann in der Datenbank der Flybase (Indiana, USA) unter <http://flybase.net/allied-data/lk/interactive-fly/aimorph/maltubls.htm> eingesehen werden und wird regelmäßig aktualisiert. In dieser Auflistung sind eine Vielzahl von Faktoren aufgezählt, deren Expressionsmuster mit dem von *rols6* zeitlich übereinstimmt, so dass eine Analyse der Bindesequenzen dieser Faktoren mit der *rols6* Promotersequenz und Mutantanalysen eventuell einen Regulator identifizieren könnten.

6.9 Rols6 im Kontext der Malpighischen Gefäßentwicklung in *Drosophila* im Vergleich zur Nierenentwicklung in Vertebraten-Modellen

In den unterschiedlichsten Modelorganismen und auch in Zellkulturexperimenten wurden die biologischen Prozesse der Zellwanderung und die Umstrukturierung des Zytoskelettes untersucht. Aus den Ansätzen zur Identifizierung von Faktoren, die in diesen Prozessen essentielle Aufgaben übernehmen, ist bis heute ein weites Feld von Faktoren und deren Verknüpfung untereinander, bzw. deren Wirkungsweise in Multiproteinkomplexen bekannt.

Einer dieser Faktoren ist Myoblast city (Erickson et al., 1997), welcher in *Drosophila* als Rols Interaktionspartner beschrieben wurde (Chen and Olson, 2001). Das Mbc Vertebraten-Homolog DOCK180 interagiert mit einem Faktor ELMO1/Ced-12. Dieser Komplex wirkt als „guanine nucleotide exchange factor“ (GEF) aktivierend auf die „small GTPase“ Rac. Diese Rac-Aktivierung wirkt sich in einer Umstrukturierung des

Zytoskelettes oder/und in Zellmigration aus (Gumienny et al., 2001; Brugnera et al., 2002; Cote and Vuori, 2002). Weitere Proteinkomplexe werden durch die Interaktionen der Proteine DOCK180, p130^{cas} und Crk gebildet. Diese Proteinkomplexbildung hat ebenfalls Zellmigration und Zytoskelett-Reorganisation unter der Beteiligung der GTPase Rac zur Folge (Hasegawa et al., 1996; Klemke et al., 1998; Galletta et al., 1999; Reddien and Horvitz, 2000).

Das Protein NEPHRIN ist ein Mitglied der Immunglobulin Super Familie (IgSF), zu denen auch die schon angesprochenen Proteine Duf/Kirre (Ruiz-Gomez et al., 2000; Strükelberg et al., 2001) und Sns (Bour et al., 2000) angehören. Nephrin wurde als essentiell beteiligtes Protein bei der Integrität der Podozytenzellen und des Slit-Diaphragmas in menschlichen und auch in Maus-Nieren beschrieben. Mutationen im *nephrin* Gen des Menschen verursachen eine Krankheit, die allgemein „Congenitales Nephrotisches Syndrom“ genannt wird (Kestila et al., 1998). Damit ist ein Symptomkomplex gemeint, bei dem u.a. Proteinurie (Ausscheidung von überwiegend niedermolekularen Proteinen) und Hypo- und Dysproteinämi (verminderte Plasmaproteinwert und Mangel an Lipoproteinen des Blutes) beim Patienten als Folge der veränderten Durchlässigkeit der glomerulären Basalmembran (Slit-Diaphragma) auftreten.

In *Drosophila* ist ein *nephrin* Homolog *hibris* bekannt, das in der *Drosophila* Myogenese eine Rolle spielt (Artero et al., 2001). Seit den Arbeiten von Denholm et al., 2003 ist bekannt, dass Hibris in den SCs der MpG exprimiert ist. In *hibris* Mutanten ist die Anzahl der SCs signifikant reduziert. Die Mutanten sterben allerdings nicht während der Embryogenese, sondern als junge Adulte, wobei eine verminderte „Nierenfunktion“ der nicht korrekt ausgebildeten MpG als Ursache der Letalität vermutet wird (Denholm et al., 2003). Diese Daten weisen darauf hin, dass im Vergleich zur humanen oder Maus-Niere Nephrin/Hibris auch in *Drosophila* bei der Bildung der MpG eine essentielle Funktion aus zu üben scheint.

Interessanterweise wurde ein weiteres Adaptermolekül CMS/CD2AP als Nephrin-Interaktionspartner beschrieben. CD2AP „knock-out“ Mäuse sterben ebenfalls an schweren Nierendefekten (Shih et al., 1999; Shih et al., 2001). Dieser Nephrin/CD2AP Komplex ist in der Lage an das oben angesprochene Linkermolekül p130^{cas} zu binden (Kirsch et al., 1999).

Auf Grund dieser Daten über eine dichte Verflechtung dieser Faktoren erscheint es in der Folge sinnvoll, die Expressionsmuster und Interaktionen dieser aus Mensch und Maus identifizierten Moleküle in *Drosophila* zu testen. Homologe zu allen angesprochenen Faktoren können im *Drosophila* Genom gefunden werden. So wird auch für CD2AP in *Drosophila* ein „computed gene“ CG11316 (www.flybase.bio.indiana.edu) angegeben, welches aber noch nicht molekular oder funktionell beschrieben wurde.

Da sowohl in den Zell-Zell-Kommunikationsvorgängen, Migrationen und Zelladhäsionsprozessen im Verlauf der Myoblastenfusion in *Drosophila* als auch in der Entwicklung der Nieren in Vertebraten alles darauf hindeutet, dass die beschriebenen Multiproteinkomplexe und Signalkaskaden eine Vielzahl von faktoriellen Übereinstimmungen zeigen, ist auch eine Beteiligung von Rols6 in diesem Geflecht von Interaktionen in beiden Zelltypen der MpG, den PCs und den SCs, denkbar. Eine sehr interessante Rolle könnte dabei auch CD2AP spielen, da aus Zellkulturexperimenten bekannt ist, dass CD2AP in der Lage ist, in seiner Funktion als Adaptermolekül, Nephrin an Aktin zu binden (Kirsch et al., 1999). Da gleichzeitig der Proteinkomplex DOCK180/p130^{cas}/Crk von CD2AP gebunden werden kann, und Rols als Mbc/DOCK180 Interaktionspartner diskutiert wird, wäre über diese Vernetzung eine Beteiligung von Rols an der Zytoskelett-Organisation gegeben.

In der Myogenese wird für Rolling pebbles eine Funktion als Signalvermittler durch eine direkte Interaktion mit dem IgSF-Protein Duf diskutiert. Diese Interaktion soll auf eine Signalkaskade wirken, die via Mbc-Interaktion zur Rac-Aktivierung und damit zur Umstrukturierung des Zytoskelettes während der Fusion der Founder-Zellen mit den Fcm's führt. In den MpG sind allerdings bisher keine „Signalmoleküle“, wie z.B. die Immunglobuline Duf oder Sns, als funktionell exprimiert beschrieben worden (siehe auch Abschnitt 6.5.3). Einzig in den SCs konnte eine Expression von Hibris identifiziert werden. Dieses Molekül hat sehr große Ähnlichkeit zu seinem Paralog Sns (Übersichtsartikel: Dworak and Sink, 2002). In der Myogenese werden beide Proteine in den Fcm's der somatischen Muskulatur exprimiert, wobei die *hibris* Expression etwas früher als die *sns* Expression endet. Auch produzieren *hibris* Mutanten nicht den erwartet starken Muskelfusionsphänotyp, was für eine Redundanz des Proteins in der Myogenese spricht (Artero et al., 2001; Dworak et al., 2001). In Schneiderzell Interaktions-Assays wurde gezeigt, dass Hibris in der Lage ist, mit Duf/Kirre zu interagieren. Ein IgSF-Paralog von Duf, welches ebenfalls aus der Myogenese bekannt ist, Irregular-chiasm-C/ Roughest (Irre-C/ Rst) (Strünelberg et al., 2001; Ramos et al., 1993; Schneider et al., 1995), und das sowohl in Muskelfounder-Zellen als auch in Fcm's exprimiert ist, wurde interessanter Weise in diesem Assay nicht von Hibris gebunden (Dworak et al., 2001). Allerdings ist auch eine potentielle Interaktion von Rols und Irre-C/ Rst noch unklar.

Auf Grund dieser Daten aus der Myogenese könnte es ein erfolgsversprechender Ansatz sein, mögliche Expressionen und Funktionen von Duf/ Kirre und von Irre-C/ Rst und deren potentiellen Interaktionen mit Rols und Hibris in den MpG aufzudecken, da auch ein weiterer Hinweis auf eine Beteiligung des Duf Paraloges Rst aus einer Parallele zur Wirbeltier-Niere gegeben ist. Dort wurde ein *rst* Ortholog *neph1* identifiziert (Donoviel, et al., 2001). *Neph1* hat große Ähnlichkeit zu Nephrin

und verfügt über eine starke Komponente in den Nieren von Menschen und Mäusen. Ein Verlust der Funktion von Neph1 in „knock-out“ Mäusen führt zur Degeneration der glomerulären Basalmembran und Podozytenstruktur und zwangsläufig zu schwerer Proteinuria und früher postnataler Letalität (Donoviel, et al., 2001). Auch diese Daten sprechen für eine Beteiligung des Immunglobulins Roughest an der Entwicklung der Malpighischen Gefäße in *Drosophila*.

6.10 Eine Funktion von Rols6 in Geweben von 3. Larven bleibt unbekannt

Der Schwerpunkt der Analysen, die in dieser Arbeit zur Funktion und Genregulation des *rols6* Transkriptes durchgeführt wurden, lag auf der Embryonalentwicklung. In einem ersten Pilotexperiment zur *rols6* Expression in larvalen Geweben wurden β -Galactosidase-Nachweise in transgenen Linien durchgeführt, die das Rosh1,1 Promotorkonstrukt tragen (Abschnitt 5.10). Dieses Konstrukt beinhaltet die essentiellen, direkt 5' stromaufwärts vor dem *rols6* Transkriptionsstart gelegenen 1100 bp, mit denen es möglich war, β -Galactosidase als Reporter gen in transgenen Fliegen im *rols6* Expressionsmuster zu exprimieren (siehe Abschnitt 5.8.3). Eine Analyse der β -Galactosidase-Expression in Geweben 3. Larven ergab, dass die embryonale Gewebe, die durch eine starke *rols6* Expression charakterisiert sind, in 3. Larven nicht zu den *rols6* Expressionsdomänen zählen. So konnte in den larvalen MpG und im Darmbereich mit diesem Konstrukt keine β -Galactosidase nachgewiesen werden (siehe Abbildung 5.19 I). Diese ersten Beobachtungen sprechen allerdings nicht generell gegen eine Funktion von Rols6 in diesen larvalen Geweben, da bisher nur diese genomische Region getestet wurde. Die weiter stromaufwärts gelegenen genomischen Bereiche, die z.B. durch die Konstrukte Rosh1,6 und Rosh3 vertreten sind, wurden bisher noch nicht untersucht. Eine Aussage über regulative Elemente in diesen Bereichen oder eine Rols6 Funktion kann also bisher nicht gemacht werden.

6.11 Ausblick auf zukünftige Untersuchungen

Durch die Analysen in der vorliegenden Arbeit konnten erste Hinweise auf eine Funktion des Rols6 Proteins in der Differenzierung der Malpighischen Gefäße von *Drosophila* aufgedeckt werden. Im Zentrum der weiterführenden Untersuchungen sollte die Frage stehen, ob das Rols6 Protein tatsächlich die postulierte Funktion eines Adaptermoleküles ausübt. Dazu ist es zwingend notwendig, dass die subzelluläre Lokalisation mittels eines spezifischen Antikörpers möglich ist, zumal die Frage der Expression in den unterschiedlichen Zelltypen der MpG zu klären ist. Dann sollte es möglich sein, mögliche überlappende Expressionsmuster mit potentiellen

Interaktionspartnern zu analysieren. Sollten die oben angesprochenen Faktoren tatsächlich Co-Expression zeigen, wäre es auch möglich, potentielle Interaktionen in Co-Immunoprecipitations-Experimenten zu verifizieren oder auch den Rols-Proteinkomplex zu isolieren.

Ein weiterer Aspekt für zukünftige Experimente sollte die genaue Charakterisierung der *rols6* Promoterregion sein. Dieser Promoter konnte in dieser Arbeit nur sehr ungenau auf einen etwa 1,1 kb großen genomischen Bereich eingeschränkt werden, wobei ein Endoderm-Enhancer im Konstrukt Rosh#0,45 identifiziert werden konnte. Die spezifischen Bereiche für die Expression in den MpG und im Pharynxbereich wurden bisher nicht präzise benannt. Dies kann mit der gängigen Methode der Reporter-gen-Assays bewerkstelligt werden. Im Rahmen dieser Experimente könnte auch die Frage geklärt werden, ob und in welchen Geweben *rols6* in den Larvenstadien exprimiert wird. Erste Hinweise auf eine larvale Expression konnte in dieser Arbeit gewonnen werden. Allerdings konnte keine der embryonalen Expressionsdomänen (Endoderm und MpG) in larvalen Geweben bestätigt werden.

Zwei Fragen zur Funktionalität des Rols6 Proteins sind in dieser Arbeit nicht bearbeitet worden. Zum einen ist es erstaunlich, dass *rols6* über eine sehr starke endodermale Komponente verfügt, die *rols6* spezifische Deletionslinie EP(3)3330*5a aber keinerlei auffälligen Defekt im Endoderm aufweist. Dies wurde allerdings nicht mit einem entsprechenden Marker detailliert überprüft. Mit anti-Hindsight Antikörperfärbungen könnten aber auch eventuell nicht gravierende Schäden des Endoderm-Epithels sichtbar gemacht werden. Ebenso wurde die Expression im Pharynx nicht bearbeitet. Die Lösung dieser Fragestellungen wird allerdings erschwert, da ein Verlust der Funktion des *rols6* Gens nicht zur Letalität führt. Somit wird man von der Verfügbarkeit geeigneter Marker abhängig sein, um Expressions- und Funktionsanalysen durch zu führen.

7. Abbildungsverzeichnis

2.1	Schematische Darstellung des <i>rolling pebbles</i> Genortes	3
2.2	Muskelfusionsstörungen in <i>rolling pebbles</i> mutanten Embryonen	8
2.3	Entwicklung und Verlauf der Malpighischen Gefäße während der <i>Drosophila</i> Embryogenese	9
2.4	Darstellung der Malpighischen Gefäße (nach Sözen et al., 1997)	11
5.1	Das Endoderm ist in <i>rolling pebbles</i> defizienten Embryonen im Mitteldarmbereich teilweise unterbrochen	41
5.2	Die Malpighischen Gefäße der <i>rolling pebbles</i> Defizienz Df(3)BK9 sind missgebildet.	42
5.3	Darstellung des Phänotyps der Malpighischen Gefäße von <i>rols</i> Allelen	44
5.4	Schematische Darstellung der Generierung einer <i>rols6</i> spezifischen Deletionsmutante und Kreuzungsschema zur Remobilisierung von EP(3)3330	45
5.5	Die generierten, homozygot letalen „JumpOut“-Linien zeigen Defekte in der Muskelfusion der Körperwandmuskulatur	49
5.6	Die Entwicklung der Malpighischen Gefäße der homozygot letalen „JumpOut“-Linien ist nicht gestört	51
5.7	Die EP*-JumpOut-Linie EP(3)3330*58a weist neben Muskelfusionsdefekten auch einen schwachen Phänotyp der MpG auf	53
5.8	Schematische Darstellung der genomischen Region zwischen dem 2. spezifischen <i>rols7</i> Exon und den <i>rols6</i> spezifischen Exons	54
5.9	Die Deletionslinie EP(3)3330*5a weist keine Störungen in mesodermalen Derivaten auf	55
5.10	Die anterioren Malpighischen Gefäße der Deletionslinie EP(3)3330*5a elongieren fehlgeleitet	56
5.11	Morphologie und Integration von SCs in <i>rols</i> , <i>mbc</i> und <i>rac1/rac2</i> mutanten Embryonen	59
5.12	Sequenzausschnitt des Klons „ <i>rols6</i> FL4“ und schematische Darstellung des zu erwartenden N-terminal Flag-markierten Proteins Rols6-Flag	61
5.13	Klonierung der <i>rols6</i> spezifischen Basenpaare 4-213 (AS 2-71) in den Expressionsvektor pBAD/ <i>His A</i> (Clontech) und bakterielle Expression eines His-gekoppelten Fusionsproteins Rols6(2-71)-His	62
5.14	Das <i>rols6</i> Expressionsmuster während der Embryogenese	64
5.15	Schematische Darstellung der <i>rols6</i> Promotor-Konstrukte	65
5.16	Die Konstrukte Rosh1,1 und Rosh3 zeigen das gesamte <i>rols6</i> Expressionsmuster in der Reporterstudie	67

5.17	Schematische Darstellung des Konstruktes <i>Rosh#0,45</i> und <i>LacZ</i> -Expression in <i>Rosh#0,45</i> transgenen Linien	71
5.18	Schematische Darstellung der putativen <i>roIs6</i> Promotorregion und der potentiell bindenden Transkriptionsfaktoren im Vergleich zur <i>lacZ</i> -Expression in den daraus resultierenden Promotor-Konstruktstudien	72
5.19	<i>roIs6</i> Expression in Mutanten von frühen, gewebespezifisierenden Regulatoren des Endoderms und der Malpighischen Gefäße	74
5.20	<i>lacZ</i> -Reporterstudie an Geweben von 3. Larven	77

8. Abkürzungen

amp	anteriores Mitteldarm primordium
AS	Aminosäure
bp	Basenpaare
cDNA	complementary DNA
DAB	Diaminobenzidin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EMS	Ethylmethansulfonat
End	Endoderm
EtOH	Ethanol
F1, F2 etc.	Filialgeneration 1, 2 etc.
Fcm's	fusionskompetente Myoblasten
Fk	Fettkörper
HCl	Salzsäure
Ig	Immunglobulin
IgSF	Immunglobulin-Superfamilie
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
L	Liter
M	Molar
Md	Mitteldarm
MpG	Malpighische Gefäße
Na ₂ HPO ₄	di-Natriumhydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NaH ₂ PO ₄	Natrium-di-Hydrogenphosphat
NBT	Nitrobluetetrazolium
NiCl ₂	Nickelchlorid
OD	optische Dichte
ORF	offener Leserahmen
P	Parentalgeneration
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
PCs	Principal Zellen
Ph	Pharynx
pmp	posteriores Mitteldarm primordium
s	Sekunde
SCs	Stellate Zellen
SDS	Natriumdodecylsulfat
TPR	Tetratricopeptid repeat
Tris	Tris (Hydroxymethyl)-aminomethan
TritonX-100	Octylphenolpolyethylenglycolether
Tween 20	Polyoxyethylensorbitanmonolaurat
U	Enzymeinheit Unit
ü.N.	über Nacht
UpM	Umdrehungen pro Minute
UTR	untranslatierte Region
v/v	Volumen pro Volumen
VT	Volumenanteil
w/v	Gewicht pro Volumen
WT	Wildtyp
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-indolyl-β-D-Galactosid
X-Phosphat	5-Brom-4-Chlor-3-indolyl-Phosphat
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter

9. Literaturverzeichnis

- Abel, T., Michelson, A. M. and Maniatis, T.** (1993). A *Drosophila* GATA family member that binds to Adh regulatory sequences is expressed in the developing fat body. *Development* **119**: 623-633.
- Adams, M.D. et al.** (2000). The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science* **287**: 2185-2195.
- Ainsworth, C., Wan, S. and Skaer, H.** (2000). Coordinating cell fate and morphogenesis in *Drosophila* renal tubules. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* **355**: 931-937.
- Arceci, R.J., King, A.A., Simon, M.C., Orkin, S.H., Wilson, D.B.** (1993). Mouse GATA-4 a retinoic acid-inducible GATA-binding transcription factor expressed in endodermally derived tissues and heart. *Mol. Cell. Biol.* **13**: 2235-2246.
- Artavanis-Tsakonas, S., Rand, M.D. and Lake, R.J.** (1999). Notch signalling: Cell fate control and signal integration in development. *Science* **284**: 770-776.
- Artero, R.D., Castanon, I. and Baylies, M.K.** (2001). The immunoglobulin-like protein Hibris functions as a dose-dependent regulator of myoblast fusion and is differentially controlled by Ras and Notch signalling. *Development* **128**: 4251-4264.
- Barolo, S., Carver, L.A. and Posakony, J.W.** (2000). GFP and β -Galactosidase Transformation Vectors for Promoter/Enhancer Analysis in *Drosophila*. *BioTechn.* **29**: 726-732.
- Bate, C.M.** (1990). The embryonic development of larval muscles in *Drosophila*. *Development* **110**: 791-804.
- Bate, M.** (1993). The mesoderm and its derivatives. In: „The Development of *Drosophila melanogaster*.“ (M. Bate and A. Martinez-Arias, eds.) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, vol 2, pp 1013-1090.
- Baylies, M.K., Bate, M., and Ruiz-Gomez, M.** (1998). Myogenesis: a view from *Drosophila*. *Cell* **93**: 921-927.
- Biggin, M.D. and Tjian, R.** (1988). Transcription factors that activate the Ultrabithorax promoter in developmentally staged extracts. *Cell* **53**: 699-711.
- Birnboim, H.C. and Doly, J.** (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Acids Res.* **7**: 1513-1523.
- Blatch, G.L. and Lässle, M.** (1999). The tetratricopeptide repeat: a structural motif mediating protein-protein interactions. *BioAssays* **21**: 932-939.
- Borden, K.L.B.** (2000). RING domains: master builders of molecular scaffolds? *Mol. Biol.* **295**: 1103-1112.
- Borden, K.L.B. and Freemont, P.S.** (1996). The RING finger domain: a recent example of a sequence-structure family. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **6**: 395-401.
- Bork P.** (1993). Hundreds of ankyrin-like repeats in functionally diverse proteins: mobile modules that cross phyla horizontally? *Proteins* **17**:363-374.
- Bour, B.A., Chakravarti M., West, J.M. and Abmayr, S.M.** (2000). *Drosophila* SNS, a member of the immunoglobulin superfamily that is essential for myoblast fusion. *Genes Dev.* **14**: 1498-1511.
- Bour, B.A., O'Brien, M.A., Lockwood, W.L., Goldstein, E.S., Bodmer, R., Taghert, P.H., Abmayr, S.M. and Nguyen, H.T.** (1995). *Drosophila* Mef2, a transcription factor that is essential for myogenesis. *Genes Dev.* **9**: 730-741.
- Brown, S. and Castelli-Gair Hombria, J.** (2000). *Drosophila grain* encodes a GATA transcription factor required for cell rearrangement during morphogenesis. *Development* **127**: 4867-4876.
- Brugnera, E., Haney, L., Grimsley, C., Lu, M., Walk, S.F., Tosello-Trampont, A.C., Macara, I.G., Madhani, H., Fink, G.R. and Ravichandran, K.S.** (2002). Unconventional Rac-GEF activity is mediated through the Dock180-ELMO complex. *Nat. Cell Biol.* **4**: 574-582.

- Buttgereit, D., Paululat, A. and Renkawitz-Pohl, R.** (1996). Muscle development and attachment to the epidermis is accompanied by expression of $\beta 3$ and $\beta 1$ isotypes, respectively. *Int. J. Dev. Biol.* **40**: 189-196.
- Cagan, R.** (2003). The signals that drive kidney development: a view from the fly eye. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* **12**: 11-17.
- Campos-Ortega, J.A. and Hartenstein, V.** (1985). The embryonic development of *Drosophila melanogaster*. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg.
- Carmena, A. Bate, M. and Jiménez, F.** (1995). *lethal of scute*, a proneural gene participates in the specification of muscle progenitors during *Drosophila* embryogenesis. *Genes Dev.* **9**: 2373-2383.
- Chen E. and Olson E.** (2001). Antisocial, an intracellular adaptor protein, is required for myoblast fusion in *Drosophila*. *Dev. Cell* **1**: 705-715.
- Cote, J.F. and Vuori, K.** (2002). Identification of an evolutionarily conserved superfamily of DOCK180-related proteins with guanine nucleotide exchange activity. *J Cell Sci.* **115**:4901-4913.
- D'Andrea, L.D. and Regan, L.** (2003). TPR proteins: the versatile helix. *TRENDS in Biochem. Sci.* **28**: 655-662.
- Delattre, M., Anxolabéhère, D. and Coen, D.** (1995). Prevalence of localized rearrangements vs. transpositions among events induced by *Drosophila* P-element transposase on a P transgene. *Genetics* **141**: 1407-1424.
- Denholm, B., Sudarsan, V., Pasalodos-Sanchez, S., Artero, R., Lawrence, P., Maddrell S., Baylies, M and Skaer, H.** (2003). Dual origin of the renal tubules in *Drosophila*: mesodermal cells integrate and polarize to establish secretory function. *Curr. Biol.* **13**: 1052-1057.
- Doberstein, S.K., Fetter, R.D., Metha, A.Y. and Godman, C.S.** (1997). Genetic analysis of myoblast fusion: *blown fuse* is required for progression beyond the prefusion complex. *J. Cell Biol.* **136**: 1249-1261.
- Donoviel, D.B., Freed, D.D., Vogel, H., Potter, D.G., Hawkins, E., Barrish, J.P., Mathur, B.M., Turner, C.A., Geske, R., Montgomery, C.A., Starbuck, M., Brandt, M., Gupta, A., Ramirez-Solis, R., Zambrowicz, B.P. and Powell' D.R.** (2001). Proteinuria and Perinatal Lethality in Mice Lacking NEPH1, a Novel Protein with Homology to NEPHRIN. *Mol. Cell Biol.* **21**: 4829-4836.
- Dow, J.A.T., Davies, S.A., Guo, Y., Graham, S., Finbow, M.E. and Kaiser, K.** (1997). Molecular genetic analysis of V-ATPase function in *Drosophila melanogaster*. *J. Exp. Biol.* **202**: 237-245.
- Dworak, H.A. and Sink, H.** (2002). Myoblast fusion in *Drosophila*. *BioAssays* **24**: 591-601.
- Dworak, H.A., Charles, M.A., Pellerano, L.B. and Sink, H.** (2001). Characterization of *Drosophila hibris*, a gene related to human *nephrin*. *Development* **128**: 4265-4276.
- Erickson, M.R.S., Galletta, B.J. and Abmayr S.M.** (1997). *Drosophila myoblast city* encodes a conserved protein that is essential for myoblast fusion, dorsal closure, cytoskeletal organization. *J. Cell Biol.* **138**: 589-603.
- Farkas G, Gausz J, Galloni M, Reuter G, Gyurkovics H, Karch F.** (1994). The *trithorax-like* gene encodes the *Drosophila* GAGA factor. *Nature* **371**: 806-808.
- Frasch, M.** (1999). Controls in patterning and diversification of somatic muscles during *Drosophila* embryogenesis. *Curr. Opin. Genet.* **9**: 522-529.
- Frasch, M. and Leptin, M.** (2000). Mergers and Acquisitions: Unequal partnerships in *Drosophila* myoblast fusion. *Cell* **102**: 127-129.
- Fuß, B. and Hoch, M.** (1998). *Drosophila* endoderm development requires a novel homeobox gene, which is a target of Wingless and Dpp signalling. *Mech. Dev.* **79**: 83-97.
- Galletta B.J., Niu X.P., Erickson, M.R. and Abmayr, S.M.** (1999). Identification of a *Drosophila* homologue to vertebrate Crk by interaction with MBC. *Gene* **228**: 243-252.

- Gao, X., Sedgwick, T., Shi, Y. –B., and Evans, T.** (1998). Distinct functions are implicated for the GATA-4, -5 and -6 transcription factors in the regulation of intestine epithelial cell differentiation. *Moll. Cell. Biol.* **18**: 2901-2911.
- Georgias, C. Wasser M. and Hinz U.** (1997). A basic-helix-loop-helix protein expressed in precursors of *Drosophila* longitudinal visceral muscles. *Mech. Dev.* **69**: 115-124.
- Gilmour DS, Thomas GH, Elgin SC.** (1989). *Drosophila* nuclear proteins bind to regions of alternating C and T residues in gene promoters. *Science* **245**: 1487-90.
- Gisselbrecht, S., Skeath, J.B., Doe, C.Q. and Michelson, A.M.** (1996). *Heartless* encodes a fibroblast growth factor receptor (DFR1/DFGF-R2) involved in the directional migration of early mesodermal cells in the *Drosophila* embryo. *Genes Dev.* **10**: 3003-3017.
- Goebi M. and Yanagida M** (1991). The TPR snap helix: a novel protein repeat motif from mitosis to transcription. *Trends Biochem. Sci.* **16**: 173-177.
- Green, R. B., Hatini, V., Johansen, K. A., Liu, X. and Lengyel, J. A.** (2002). Drumstick is a zinc finger protein that antagonizes Lines to control patterning and morphogenesis of the *Drosophila* hindgut. *Development* **129**: 3645-3656.
- Gumienny, T.L, Brugnera, E., Tosello-Trampont, A.C., Kinchen, J.M., Haney, L.B., Nishiwaki, K., Walk, S.F., Nemergut, M.E., Macara, I.G., Francis, R., Schedl, T., Qin, Y., Van Aelst, L., Hengartner, M.O. and Ravichandran, K.S.** (2001). CED-12/ELMO, a novel member of the CrkII/Dock180/Rac pathway, is required for phagocytosis and cell migration. *Cell* **107**: 27-41.
- Hakeda-Suzuki S., Ng, J., Tzu, J., Dietzl, G., Sun, Y., Harms, M., Nardine, T., Luo, L. and Dickinson, B.J.** (2002). Rac function and regulation during *Drosophila* development. *Nature* **416**: 438-442.
- Hasegawa, H., Kiyokawa, E., Tanaka, S., Nagashima, K., Gotoh, N., Shibuya, M., Kurata, T. and Matsuda, M.** (1996). DOCK180, a major CRK-binding protein, alters cell morphology upon translocation to the cell membrane. *Mol. Cell Biol.* **16**: 1770-1776.
- Hoch, M., Broadie, K, Jäckle, H. and Skaer, H.** (1994). Sequential fates in a single cell are established by the neurogenic cascade in the Malpighian tubules of *Drosophila*. *Development* **120**: 3439-3450.
- Jack, J. and Myette, G.** (1999). Mutations that alter the morphology of the Malpighian tubules in *Drosophila*. *Dev. Genes Evol.* **209**: 546-54.
- Janning, W., et al.,** (1986). *Roux's Arch. Dev. Biol.* **195**: 22-23.
- Joazeiro, C.A. and Weissman, A.M.** (2000). RING finger proteins: mediators of ubiquitin ligases activity. *Cell* **102**: 549-552.
- Joazeiro, C.A., Wing, S.S., Huang, H., Levenson, J.D., Hunter, T. and Liu, Y.C.** (1999). The tyrosin kinase negative regulator c-Cbl as a RING-Type, E2-dependent ubiquitin-protein ligase. *Science* **286**: 309-312.
- Kerrigan, L.A., Croston, G.E., Lira, L.M. and Kadonaga, J.T.** (1991). Sequence-specific transcriptional antirepression of the *Drosophila krueppel* gene by the GAGA factor. *J. Biol. Chem.* **266**: 574-82.
- Kestila, M., Lenkkeri, U., Mannikko, M., Lamerdin, J., McCready, P., Putaala, H., Ruotsalainen, V., Morita, T., Nissinen, M., Herva, R., Kashtan, C.E., Peltonen, L., Holmberg, C., Olsen, A. and Tryggvason K.** (1998). Positionally cloned gene for a novel glomerular protein – *nephrin* - is mutated in congenital nephrotic syndrome. *Mol. Cell* **1**: 575-582.
- Kirsch, K., Georgescu, M.-M., Ishimaru, S. and Hanafusa, H.** (1999). CMS: An adapter molecule involved in cytoskeletal rearrangements. *Proc. Natl. Acad. USA* **96**: 6211-6216.
- Klapper, R., Heuser, S., Strasser, T. and Janning, W.** (2001). A new approach reveals syncytia within the visceral musculature of *Drosophila melanogaster*. *Development* **128**: 2517-2524.

- Klapper, R., Stute, C., Schomaker, O., Strasser, T., Janning, W., Renkawitz-Pohl, R. and Holz, A.** (2002). The formation of syncytia within the visceral musculature of the *Drosophila* midgut is dependent on *duf*, *sns* and *mbc*. *Mech. Dev.* **110**: 85-96.
- Klemez, R., Weber, U. and Gehring, W.J.** (1987). The white gene as a marker in a new P-element vector for gene transfer in *Drosophila*. *Nucleic Acids Res.* **15**: 3947-3959.
- Klemke, R.L., Leng, J., Molander, R., Brooks, P.C., Vuori, K. and Cheresh, D.A.** (1998). CAS/Crk coupling serves as a "molecular switch" for induction of cell migration. *J. Cell. Biol.* **140**: 961-972.
- Kusch, T. and Reuter, R.** (1999). Functions for *Drosophila brachyenteron* and *forkhead* in mesoderm specification and cell signalling. *Development* **126**: 3991-4003.
- Kyshe-Anderson, J.** (1984). Electroblotting of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J. Biochem. Biophys. Methods* **10**: 103-209.
- Laemmli, U.K.** (1970). Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Lai, E.L.** (2004). Notch signaling : control of cell communication and cell fate. *Development* **131**: 965-973
- Laverriere, A.C., MacNeill, C., Mueller, C., Poelmann, R.E., Burch, J.B. and Evans, T.** (1994). GATA-4/5/6 a subfamily of three transcriptions factors transcribed in developing heart and gut. *J. Biol. Chem.* **269**: 23177-23184.
- Lawrence, P.A. and Johnston, P.** (1989). Pattern formation in the *Drosophila* embryo: allocation of cells to parasegments by *evenskipped* and *fushi tarazu*. *Development* **105**: 761-768.
- Lee, H., Kraus, K.W., Wolfner, M.F. and Lis, J.T.** (1992). DNA sequence requirements for generating paused polymerase at the start of Hsp70. *Genes Dev.* **6**: 284—295.
- Leicht, B.G. and Bonner, J.J.** (1988). Genetic analysis of chromosomal region 67A-D of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **119**: 579-593.
- Leiss, D. Hinz, U., Gasch, A., Mertz, R. and Renkawitz-Pohl, R.** (1988). β 3-tubulin expression characterizes the differentiating mesodermal germ layer during *Drosophila* embryogenesis. *Development* **104**: 525-531.
- Letsou, A., Arora, K., Wrana, J.L., Simin, K., Twombly, V., Jamal, J., Staehling-Hampton, K., Hoffmann, F.M., Gelbart, W.M., Massague, J., et al.** (1995). *Drosophila* Dpp signaling is mediated by the *punt* gene product: a dual ligand-binding type II receptor of the TGF beta receptor family. *Cell* **80**: 899-908.
- Lin, W. -H., Huang, L. -H., Yeh, J. -Y., Hoheisel, J., Lehrach, H., Sun, Y. H. and Tsai, S. -F.** (1995). Expression of a *Drosophila* GATA transcription factor in multiple tissues in the developing embryos. *J. Biol. Chem.* **270**: 25150-25158.
- Lindsley, D.L. and Zimm, G.G.** (1992). The genome of *Drosophila melanogaster*. Academic Press, San Diego.
- Liu, S. and Jack, J.** (1992). Regulatory interactions and role in cell type specification of the Malpighian tubules by the *cut*, *krüppel* and *caudal* genes of *Drosophila*. *Dev. Biol.* **150**: 133-143.
- Liu, X. and Lengyel, J.A.** (2000). *Drosophila arc* encodes a novel adherens junction-associated PDZ domain Protein required for wing and eye development. *Dev. Biol.* **221**: 419-434.
- Lu, Q., Wallrath, L.L., Granok, H. and Elgin, S.C.** (1993). (CT) n (GA) n repeats and heat shock elements have distinct roles in chromatin structure and transcriptional activation of the *Drosophila* hsp26 gene. *Molec. Cell. Biol.* **13**(5): 2802-2814.
- Menon, S.D. and Chia, W.** (2001). *Drosophila Rolling pebbles*: a novel multidomain protein essential for myoblast fusion that localizes at fusion sites and recruits D-Titin in response to the myoblast attractant Dumbfounded. *Dev. Cell* **1**: 691-703.

- Nakagoshi, H., Hoshi, M., Nabeshima, Y. and Matsuzaki, F.** (1989). A novel homeobox gene mediates Dpp signal to establish functional specificity within target cells. *Genes and Development* **12**: 2724-2734.
- Ng, J., Nardine, T., Harms, M., Tzu, J., Goldstein, A., Sun, Y., Dietzl, G. and Dickson, B.J. & Luo, L.** (2002). Rac GTPases control axon growth, guidance and branching. *Nature* **416**: 442-7.
- Nolan, K.M., Barrett, K., Lu, Y., Hu, K.Q., Vincent, S. and Settleman, J.** (1998). Myoblast city, the *Drosophila* homolog of DOCK180/CED-5, is required in a Rac signalling pathway utilized for multiple developmental processes. *Genes Dev.* **12**: 3337-3342.
- Nose, A., Isshiki, T. and Takeichi, M.** (1998). Regional specification of muscle progenitors in *Drosophila*: the role of the *msh* homeobox gene. *Development* **125**: 215-223.
- O'Donnell, M.J., Dow, J.A.T., Huesmann, G.R., Tublitz, N.J. and Maddrell, S.H.P.** (1996). Separate control of anion and cation transport in Malpighian tubules of *Drosophila melanogaster*. *J. Exp. Biol.* **197**: 421-428.
- O'Donnell, M.J., Rheault, M.R., Davies, A.S., Rosay, P., Harvey, B.J., Maddrell, S.H.P., Kaiser, K. and Dow, J.A.T.** (1998). Hormonally controlled chloride movement across *Drosophila* tubules is via ion channels in Stellate cells. *Am. J. Physiol.* **274**: R1039-1049.
- O'Neill, J.W. and Bier, E.** (1994). Double-label *in situ* hybridization using biotin and digoxigenin-tagged RNA probes. *Biotechniques* **17**: 870-874.
- Ogata, K., Arakawa, M., Kasahara, T., Shiori-Nakano, K. and Hiraoka, K.** (1983). Detection of toxoplasma membrane antigens transferred from SDS-polyacrylamide gel to nitrocellulose with monoclonal antibody and avidin-biotin, peroxidase anti-peroxidase and immunoperoxidase methods. *J. Immunol. Meth.* **65**: 75-82.
- Omichinski, J.G., Clore, G.M., Schaad, O., Felsenfeld, G., Grainor, C., Appella, E., Stahl, S.J. and Groneborn, A.M.** (1993). NMR structure of a specific DNA complex of Zn-containing DNA binding domain of GATA-1. *Science* **261**: 438-446.
- Patel, N.H., Snow, P.M. and Godman, C.S.** (1987). Characterization and cloning of Fasciclin III: a glycoprotein expressed on a subset of neurons and axon pathways in *Drosophila*. *Cell* **48**: 975-988.
- Paululat, A., Burchard S. and Renkawitz-Pohl, R.** (1995). Fusion from myoblasts to myotubes is dependent on the *rolling stone* gene (*rost*) of *Drosophila*. *Development* **121**: 2611-2620.
- Pedone, P.V., Ochimski, J.P., Nony, C., Groneborn, A.M., Clore, G.M. and Felsenfeld, G.** (1997). The N-terminal fingers of chicken GATA-2 and GATA-3 are independent sequence-specific DNA-binding domains. *EMBO J.* **16**: 2874-2882.
- Pirotta, V.** (1986). Cloning *Drosophila* genes. *Drosophila: A Practical Approach* (Roberts, D.B., ed.). IRL Press, Oxford, 83-100.
- Rau, A.** (2001). Genetische und molekulare Analysen der *rolling pebbles* (*rols*) –Transkriptionseinheit sowie die Charakterisierung des Fusionsphänotyps weisen auf eine essentielle Funktion von Rols-LP in den Muskelvorläuferzellen hin. Dissertation, Philipps-Universität Marburg
- Rau, A., Buttgerit, D., Holz, A., Fetter, R., Doberstein, S.K., Paululat, A., Staudt, N., Skeath, J., Michelson, A.M. and Renkawitz-Pohl, R.** (2001). *rolling pebbles* (*rols*) is required in *Drosophila* muscle precursors for recruitment of myoblasts for fusion. *Development* **128**: 5061-5073.
- Reddien, P. W. and Horvitz, H.R.** (2000). CED-2/CrkII and CED-10/Rac control phagocytosis and cell migration in *Caenorhabditis elegans*. *Nat. Cell Biol.* **2**: 131-136.
- Rehorn, K.P., Thelen, H., Michelson, A.M. and Reuter, R.** (1996). A molecular aspect of hematopoiesis and endoderm development common to vertebrates and *Drosophila*. *Development* **122**: 4023-4031.
- Reuter, R.** (1994). The gene *serpent* has homeotic properties and specifies endoderm versus ectoderm within the *Drosophila* gut. *Development* **120**: 1123-1135.

- Riechmann, V., Irion, U., Wilson, R., Grosskortenhaus, R. and Leptin, M.** (1997). Control of cell fates and segmentation in the *Drosophila* mesoderm. *Development* **124**: 2915-2922.
- Rorth, P.** (1996). A modular misexpression screen in *Drosophila* detecting tissue-specific phenotypes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**:12418–12422.
- Ruberte E, Marty T, Nellen D, Affolter M, Basler K.** (1995). An absolute requirement for both the type II and type I receptors, *punt* and *thick veins*, for *dpp* signaling in vivo. *Cell* **80**: 889-897.
- Rubin, G.M. and Spradling, A.C.** (1982). Genetic transformation of *Drosophila* with transposable element vectors. *Science* **218**: 348-353.
- Rubtsov, A.M. and Lopina, O.D.** (2000). Ankyrins. *FEBS Lett.* **482**: 1-5.
- Ruiz-Gomez, M., Coutts, N., Price, A., Taylor, M.V., Bate, M.** (2001). *Drosophila* Dumbfounded: a myoblast attractant essential for fusion. *Cell* **102**:189-198.
- Rushton, E., Drysdale, R. Abmayr, S.M., Michelson, A.M. and Bate, M** (1995). Mutations in a novel gene, *myoblast city*, provide evidence in support of the founder cell hypothesis for *Drosophila* muscle development. *Development* **121**: 1979-1988.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stofel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B. and Ehrlich, H.A.** (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**: 487-491.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T.** (1989). Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- San Martin, B. and Bate, M.** (2001). Hindgut visceral mesoderm requires an ectodermal template for normal development in *Drosophila*. *Development* **128**: 233-42.
- San Martin, B., Ruiz-Gomez, M. Landgraf, M. and Bate, M** (2001). A distinct set of founders and fusion-competent myoblasts make visceral muscles in the *Drosophila* embryo. *Development* **128**: 3331-3338.
- Saurin, A.J., Borden, K.L.B., Boddy, M.N. and Freemont, P.S.** (1996). Does this have a familiar RING? *TRENDS Biochem. Sci.* **21**: 208-214.
- Schneider, T., Reiter, C., Eule, E., Bader, B., Lichte, B., Nei, Z., Schimansky, T., Ramos, R.G.P. and Fischbach, K.F.** (1995). Restricted expression of the Rst protein is required for normal axonal projections of columnar visual neurons. *Neuron* **15**: 259-271.
- Schultz, J., Copley, R.R., Doerks, T., Ponting, C.P. and Bork, P.** (2000). SMART: A web-based tool for study of genetically mobile domains. *Nucleic Acids. Res.* **28**: 231-234.
- Schultz, J., Milpetz, F. Bork, P. and Ponting, C.P.** (1998). SMART, a simple modular architecture research tool: Identification of signalling domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 5857-5864.
- Schwendemann, A., and Lehmann, M.** (2002). Pipsqueak and GAGA factor act in concert as partners at homeotic and many other loci. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**:12883-12888.
- Shih, N.Y., Li, J., Cotran, R., Mundel, P., Miner, J.H. and Shaw, A.S.** (2001). CD2AP localizes to the slit diaphragm and bind to nephrin via a novel C-terminal domain. *Am. J. Pathol.* **159**: 2303-2308.
- Shih, N.Y., Li, J., Karpitskii, V., Nguyen A., Dustin, M.L., Kanagawa, O., Miner, J.H. and Shaw, A.S.** (1999). Congenital nephrotic syndrome in mice lacking CD2-associated protein. *Science* **286**: 312-315.
- Skaer, H.** (1989). Cell division in Malpighian tubule development is regulated by a single Tipp cell. *Nature* **342**: 566-569.
- Skaer, H.** (1993). Development of the alimentary canal. In: The development of *Drosophila* (M. Bate and A. Martinez-Arias, eds.). Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, pp. 941-1012.
- Skaer, H. and Martinez-Arias, A.** (1992). The *wingless* product is required for cell proliferation in the Malpighian tubule anlage of *Drosophila melanogaster*. *Development* **116**: 745-754.

- Soeller, W.C., Oh, C.E. and Kornberg, T.B.** (1993). Isolation of cDNAs encoding the *Drosophila* GAGA transcription factor. *Mol. Cell Biol.* **13**: 7961-70.
- Soeller, W.C., Poole, S.J. and Kornberg T.** (1988). In vitro transcription of the *Drosophila engrailed* gene. *Genes Dev.* **2**: 68-81.
- Soudais, C., Bielinska, M., Heikinheimo, M., MacArthur, C.A., Narita, N., Saffitz, J.E., Simon, M.C., Leiden, J.M. and Wilson, D.B.** (1995). Targeted mutagenesis of the transcription factor GATA-4 gene in mouse embryonic stem cells disrupts visceral endoderm differentiation in vitro. *Development* **121**: 3877-3888.
- Sözen, M.A., Armstrong, J.D., Yang, M., Kaiser, K. and Dow, J.A.T.** (1997). Functional domains are specified to single cell-resolution in a *Drosophila* epithelium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**: 5207-5212.
- Spradling, A.C. and Rubin, G.M.** (1982). Transposition of cloned P-elements into the *Drosophila* germ line chromosomes. *Science* **218**: 341-347.
- Steller, H. and Pirota, V.** (1986). P transposons controlled by the heat shock promoter. *Mol. Cell Biol.* **6**: 1640-1649.
- Strünkelnberg, M., Bonengel, B., Moda, L. M., Hertenstein, A., de Couet, H. G., Ramos, R. G. P. and Fischbach, K. F.** (2001). *rst* and its paralogue *kirre* act redundantly during embryonic muscle development in *Drosophila*. *Development* **128**: 4229-4239.
- Stute, C., Schimmelpfeng, K., Renkawitz-Pohl, R., Palmer, R.H. and Holz, A.** (2004). Myoblast determination in the somatic and visceral mesoderm depends on Notch signalling as well as on *milliways* (*mill^{Alk}*) as receptor for Jeb signalling. *Development* **131**: 743-754.
- Suzuki, E., Evans, T., Lowry, J., Truong, L., Bell, D.W., Testa, J.R. and Walsh, K.** (1996). The human GATA-6 gene: structure, chromosomal location, and regulation of expression by tissue-specific and mitogen-responsive signals. *Genomics* **38**: 283-290.
- Tamura, S., Wang, X.H., Maeda, M. and Futai, M.** (1993). Gastric-DNA-binding proteins recognize upstream sequence motifs of parietal cell-specific genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**: 10876-10880.
- Tautz, D. and Pfeifle, C.** (1989). A non-radioactive in situ hybridization method for the localization of specific RNAs in *Drosophila* embryos reveals translational control of the segmentation gene *hunchback*. *Chromosoma* **98**: 81-85.
- Taylor, M.V.** (2002). Muscle differentiation: How two cells become one. *Curr. Biol.* **12**: R224-R228.
- Thummel, C.S., Boulet, A.M. and Lipshitz, H.D.** (1988). Vectors for *Drosophila* P-element-mediated transformation and tissue culture transfection. *Gene*. **74**: 445-56.
- Topol, J., Dearolf, C.R., Prakash, K. and Parker, C.S.** (1991). Synthetic oligonucleotides recreate *Drosophila fushi tarazu* zebra-stripe expression. *Genes Dev.* **5**: 855-67.
- Towbin, H. Staehelin, T. and Gordon, J.** (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**: 4350-4353.
- Tower J., Karpen, G.H., Craig, N. and Spradling, A.C.** (1993). Preferential transposition of *Drosophila* P-elements to nearby chromosomal sites. *Genetics* **133**: 347-359.
- Wan, S., Cato, A.M. and Skaer, H.** (2000). Multiple Signalling Pathways Establish Cell Fate and Cell Number in *Drosophila* Malpighian Tubules. *Dev. Biol.* **217**: 153-165.
- Wu, Y.C. and Horvitz, H.R.** (1998). *C. elegans* phagocytosis and cell-migration protein CED-5 is similar to human DOCK180. *Nature* **392**: 501-504.
- Yamamoto, M., Ko, L.J., Leonard, M.W., Beug, H., Orkin, S.H. and Engel, J.D.** (1990). Activity and tissue-specific expression of the transcription factor NF-E1 multigene-family. *Genes and Dev.* **4**: 1650-1662.

- Zhang, P. and Spradling, A.C.** (1993). Efficient and dispersed local P-element transposition from *Drosophila* females. *Genetics* **133**: 361-373.
- Zheng, N., Wang, P., Jeffrey, P.D. and Pavletich, N.P.** (2000). Structure of a c-CBL-Uch7 complex: RING domain function in ubiquitin-protein ligases. *Cell* **102**: 533-539.
- Zhou, Z., Caron, E., Hartwig, E., Hall, A. and Horvitz, H.R.** (2001). The *C. elegans* PH domain protein CED-12 regulates cytoskeletal reorganization via a Rho/Rac GTPase signalling pathway. *Dev. Cell* **1**: 477-489.
- Zhu, J., Hill, R.J., Heid, P.J., Fukuyama, M., Sugimoto, A., Priess, J.R. and Rothman** (1997). *end-1* encodes an apparent GATA factor that specifies the endoderm precursors in *Caenorhabditis elegans* embryos. *Genes Dev.* **11**: 2883-2896.

Erklärung

Ich versichere, dass ich meine Dissertation

Genregulatorische und funktionelle Analysen des differentiell exprimierten *rolling pebbles* Transkriptes *rols6* zeigen, dass das Rols6 Protein für die vollständige Differenzierung der Malpighischen Gefäße in *Drosophila melanogaster* notwendig ist.

selbständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Marburg, September 2004
