

**Die Suche nach Faktoren des gerichteten Wachstums von Myotuben
in der Embryogenese von *Drosophila* führt zu vielfältig,
einem neuen Replikationsregulator.**

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

dem
Fachbereich Biologie
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von
Nicole Staudt
aus Herborn

Marburg/Lahn 2002

Vom Fachbereich Biologie (FB17) der Philipps-Universität Marburg als Dissertation
am 12.08.2002 angenommen.

Erstgutachter: Prof. Dr. Renate Renkawitz-Pohl

Zweitgutachter: Prof. Dr. Herbert Jäckle

Tag der mündlichen Prüfung am 19.08.2002

Inhaltsangabe

1. Einleitung	6
1.1 Embryonalentwicklung von <i>Drosophila melanogaster</i>	7
1.2 Zellzyklus und Chromatin	12
1.3 Ausbildung der somatischen Muskulatur	17
1.4 Apodementwicklung und gerichtetes Wachstum von Myotuben	20
1.5 Misexpression-Screen	23
2. Ergebnisse	28
2.1 Der Misexpression-Screen	28
2.2 Die Insertionsstelle von EP1344	37
2.3 Das Expressionsmuster der <i>vielfältig</i> -mRNA	40
2.4 Das Expressionsmuster des Vielfältig Proteins	44
2.5 Auswirkungen der ektopischen Expression von <i>vielfältig</i>	46
2.6 Analyse der Kutikula von <i>vielfältig</i> -Mutanten	49
2.7 Untersuchung der Anordnung von Zellkernen in <i>vielfältig</i> -Embryonen	51
2.8 Auswirkungen auf die Kondensation von Chromatin in <i>vielfältig</i> -mutanten Embryonen	54
2.9 Analyse von <i>vielfältig</i> -dsRNA behandelten Embryonen	56
2.10 Untersuchung der Inkorporation von BrdU in <i>vielfältig</i> -mutanten Embryonen	58
3. Diskussion	62
3.1 Können Faktoren des gerichteten Wachstums mithilfe eines Misexpression-Screens identifiziert werden?	62
3.2 <i>vielfältig</i> -mRNA ist in teilungsaktiven Zellen akkumuliert	65
3.3 Die subzelluläre Lokalisation von Vielfältig-Protein ändert sich im Verlauf des Kernteilungszyklusses.	66
3.4 In <i>vielfältig</i> -mutanten Embryonen ist die Größe und Anordnung der Zellkerne gestört.	67
3.5 <i>vielfältig</i> beeinflusst die Kondensation von Chromatin.	70
3.6 Die Segregation des Chromatins während der Mitose ist in <i>vielfältig</i> -dsRNA behandelten Embryonen stark beeinträchtigt.	71
3.7 In <i>vielfältig</i> -Mutanten ist die Inkorporation von BrdU verändert.	72

3.8 Welche Funktion übernimmt Vielfalt während der Kernteilung?	74
4. Material und Methoden	80
4.1 Stammhaltung und Anzucht von Bakterien	80
4.1.1 Bakterienstämme	80
4.1.2 Herstellung chemisch kompetenter Zellen	81
4.2. Stammhaltung und Anzucht von <i>Drosophila melanogaster</i>	81
4.2.1 Sammeln von Embryonen für immunhistochemische Färbungen	82
4.2.2 Sammeln von Embryonen zur Präparation von RNA	82
4.2.3 Ansetzen von Kreuzungen von <i>Drosophila melanogaster</i>	83
4.2.3.1 Fliegenlinien	83
4.3 Grundlegende molekularbiologische Methoden zum Arbeiten mit Nukleinsäuren	84
4.3.1 Behandlung von DNA mit Restriktionsendonukleasen	84
4.3.2 Elektrophoretische Auftrennung von DNA in Agarosegelen	84
4.3.3 Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen bzw. PCR-Ansätzen	85
4.3.4 Bestimmung der Konzentration von DNA und RNA	86
4.3.5 Dephosphorylierung von Vektor-DNA	86
4.11.1.1 Vektoren	87
4.3.6 Ligation	87
4.3.7 Transformation	87
4.3.8 Präparation von Plasmid-DNA aus Mini-Kulturen	88
4.3.9 Präparation von Plasmid-DNA aus Midi-Kulturen	88
4.3.10 Präzipitieren von DNA	89
4.3.11 Phenol/Chloroform-Extraktion	89
4.3.12 Präparation von genomischer DNA	90
4.3.13 Analyse von Nukleinsäuren mittels PCR	90
4.3.14 Plasmid-Rescue-Experimente	93
4.3.15 Sequenzierung von DNA	94
4.4 Northern-Blot-Analyse	95
4.4.1 Präparation von Gesamt-RNA	95
4.4.2 Isolierung von PolyA ⁺ -RNA	96
4.4.3 Herstellung radioaktiv markierter RNA-Sonden	99
4.4.4 Northern-Blot-Transfer	97
4.4.5 Hybridisierung	98

4.4.6 Detektion radioaktiv markierter Sonden	98
4.5 Antikörperaufreinigung mittels CNBr-aktivierter Sepharose	99
4.6 Western-Blot-Analyse	100
4.7 Antikörperfärbungen an Embryonen von <i>Drosophila melanogaster</i>	101
4.7.1 Fixierung von Embryonen für Antikörperfärbungen	101
4.7.2 Antikörperinkubation und -detektion	102
4.8 <i>in-situ</i>-Hybridisierung an Embryonen von <i>Drosophila</i>	103
4.8.1 Fixierung von Embryonen für In-situ-Hybridisierungen	103
4.8.2 Herstellung von DIG- bzw. Fluorescein-markierten RNA-Sonden	103
4.8.3 Hybridisierung mit RNA-Sonden und Detektion	104
4.9 Pulsmarkierung mit BrdU (5`-Bromo-2`-Desoxyunridine)	106
4.10 Herstellung von dsRNA	106
4.11 Injektion von Antikörpern oder dsRNA in Embryonen von <i>Drosophila</i>	108
Abkürzungen	109
5. Zusammenfassung	110
6. Literaturangabe	111

1. Einleitung

Das Ziel molekularer Untersuchungen entwicklungsbiologischer Prozesse ist das bessere Verständnis des Zusammenwirkens einer großen Anzahl verschiedenartiger Moleküle, die die Entwicklung eines komplexen lebensfähigen Organismus aus einer Zelle ermöglichen.

Die Taufliege *Drosophila melanogaster* (Meigen) hat sich während der letzten Dekade als ein geeigneter Modellorganismus der molekularen Entwicklungsbiologie erwiesen. Dieser Erfolg lässt sich auf folgende Eigenschaften zurückführen. Neben einfacher Haltung und Zucht zeichnet sie sich durch eine hohe Nachkommenzahl und einen kurzen Generationszyklus (Abb. 1) aus. Das auf drei Autosomen und zwei Gonosomen verteilte diploide Genom ist mit $1,2 \times 10^8$ bp Euchromatin relativ klein. Die Basenpaarsequenz des beinahe gesamten heterochromatischen Anteils des Genoms ist im Jahre 2000 veröffentlicht worden (Adams *et al.*, 2000), wodurch eine Zahl von 13600 Genen annotiert werden konnte. Seitdem ist die Sequenz in Datenbanken zugänglich, wodurch eine schnelle Zuordnung und Lokalisierung von Genen und nicht-kodierenden DNA-Abschnitten innerhalb des Genoms möglich ist.

Ein weiterer wichtiger Vorteil zur funktionellen Analyse bestimmter Genprodukte besteht in der Möglichkeit transgene Fliegenlinien zu etablieren, wobei spezifische DNA-Sequenzen stabil in das Genom integriert werden. Dies geschieht mithilfe transposabler Elemente, so genannter P-Elemente (Spradling *et al.*, 1980), die zu Mutationen (Cooley *et al.*, 1988) bzw. zur Induktion einer ektopischen Expression von Genen führen können (Rorth *et al.*, 1996).

Die Möglichkeit zur Erzeugung von stabilen Mutationen mittels verschiedener Techniken ist einer der größten Vorteile von *Drosophila* für die entwicklungsbiologische Forschung. Denn vor allem durch die Kenntnis von sichtbaren bzw. messbaren Auswirkungen einer fehlerhaften Expression eines bestimmten Genproduktes lassen sich Rückschlüsse auf die Funktion dieses Proteins ziehen.

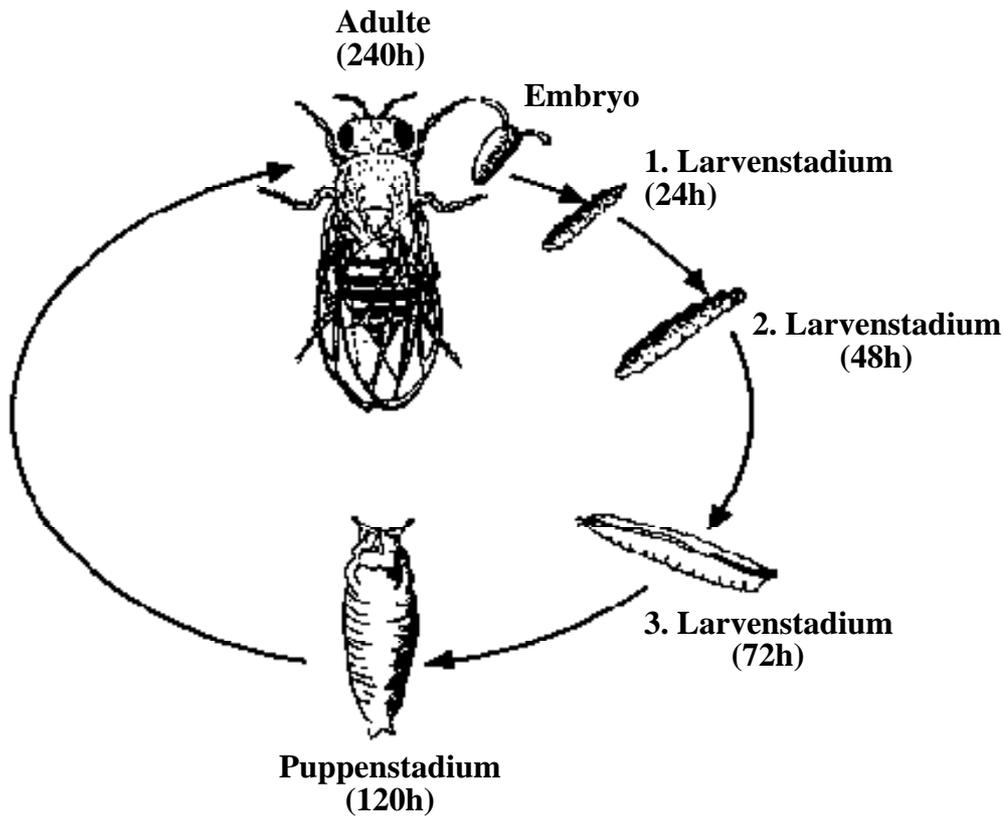


Abb. 1: Dargestellt ist der Generationszyklus von *Drosophila melanogaster* mit Angabe der Entwicklungszeit in Stunden bei einer Temperatur von 25°C.

Auf eine 24stündige Embryonalentwicklung folgen drei Larvenstadien, wobei die ersten beiden nach jeweils 24 und das dritte Stadium nach 72 Stunden abgeschlossen ist. Dem letzten Larvenstadium folgt die Verpuppung. Dieses Stadium dauert insgesamt ca. 120 Stunden und endet mit dem Schlüpfen der adulten Fliege, welche innerhalb der nächsten 24 Stunden die Fortpflanzungsreife erreicht (nach Seiffert *et al.*, 1998).

1.1. Embryonalentwicklung von *Drosophila melanogaster*

Aufgrund einer meroistischen Oogenese (zur Übersicht: Gilbert, 1997) bei *Drosophila melanogaster* bleibt die Oocyte mit 15 polyploiden Nährzellen über Zytoplasmabrücken in Kontakt (Lin *et al.*, 1994). Auf diesem Weg werden bereits während der Oogenese Transkripte und Proteine spezifisch in die

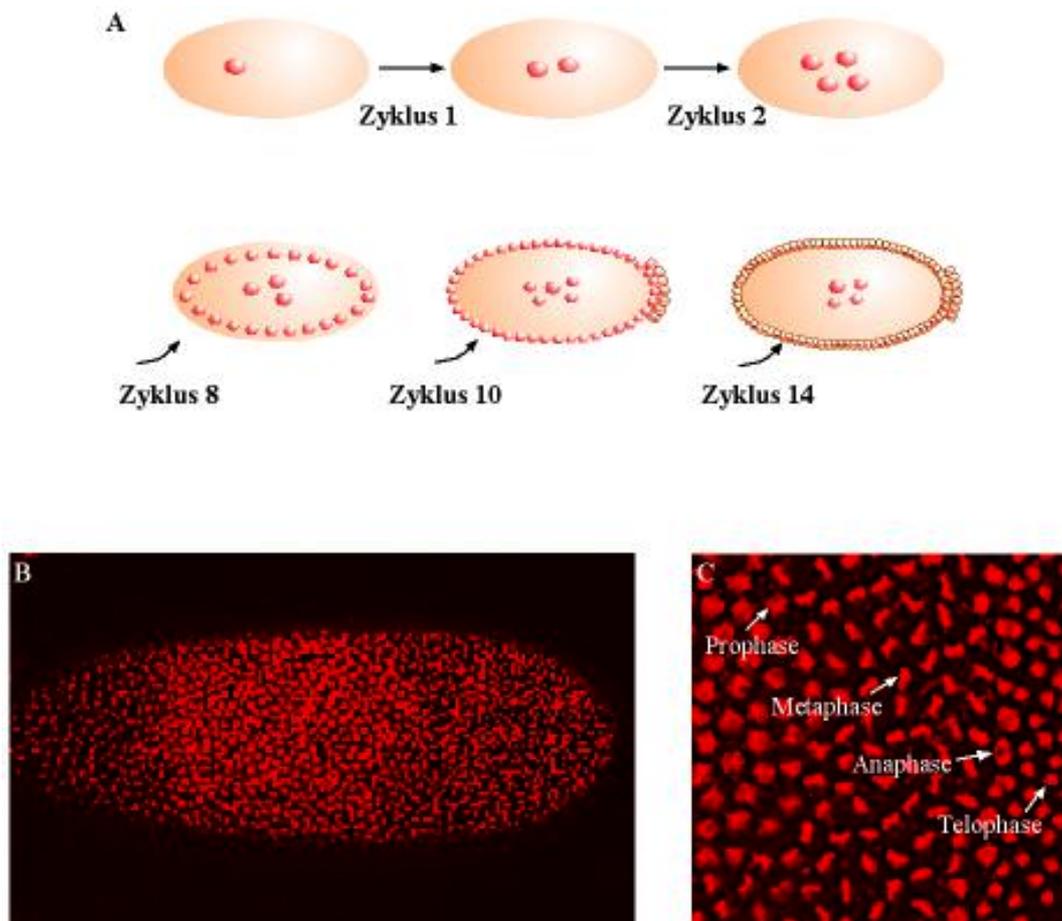


Abb. 2: Kernteilungen im synzytialen Blastoderm-Stadium

A) Nach der Vereinigung von männlichem und weiblichem Vorkern erfolgen in der Zygote von *Drosophila melanogaster* 13 Kernteilungen, welche nicht durch Zytokinese abgeschlossen werden. Somit entsteht zunächst das synzytiale Blastoderm-Stadium. Ab dem achten Zyklus beginnt die Mehrzahl der Kerne in Richtung Eioberfläche zu wandern, welche sie im zehnten Zyklus erreichen. Zu diesem Zeitpunkt werden die Urkeimzellen am posterioren Pol sichtbar differenziert und als erste zellularisiert. Nach insgesamt 13 synzytialen Teilungen der somatischen Kerne beginnt die Zellularisierung ausgehend von der Eioberfläche und ist im frühen 14. Zyklus abgeschlossen, wodurch das zelluläre Blastodermstadium erreicht ist, welchem sofort die Gastrulation folgt.

B) Wildtypembryo, DNA in rot. Nach Ankunft der somatischen Kerne an der Eioberfläche erfolgen die Kernteilungen leicht asynchron, mitotische Wellen breiten sich von den Polen in Richtung Eiaquator aus. C) Ausschnitt aus B).

Oozyte eingelagert. Durch diese „maternale Expression“ bestimmter Gene können z.B. schon vor der Befruchtung Determinanten zur Ausbildung der späteren Körperachse (Nüsslein-Volhard, 1991) asymmetrisch in der Oozyte verteilt werden. Aber auch andere nicht lokalisierte Faktoren werden in der Oozyte deponiert, um eine schnell einsetzende Entwicklung nach der Befruchtung ohne zygotische Transkription zu ermöglichen (Edgar und O'Farrell, 1989).

Nach Eindringen des Spermiums in die anterior angelegte Mikropyle der centrolecithalen Oocyte bildet sich die Zygote durch das nur teilweise Verschmelzen von männlichem und weiblichem haploiden Vorkern (Foe *et al.*, 1993). Im Anschluss folgen mehrere Kernteilungen innerhalb von kurzer Zeit (Abb. 2A). Diese Teilungen unterscheiden sich von anderen Zellzyklen (siehe Kap. 1.2) durch das Fehlen der so genannten G1- und G2-Phasen (O'Connell and Nurse, 1994). Außerdem folgen den Kern- keine Zellteilungen, so dass ein plasmoidaler Embryo entsteht. Im achten Teilungszyklus beginnt der größte Teil der bis dahin zentral liegenden Kerne, in Richtung Oberfläche zu wandern (Foe *et al.*, 1983). Nur einige Kerne bleiben im Dotter zurück, werden polyploid und entwickeln sich im weiteren Verlauf der Entwicklung zu Vitellophagen. Im frühen Stadium des zehnten Zyklusses haben die Kerne die Oberfläche des Blastodermembryos erreicht und ordnen sich in einer einkernigen Schicht unterhalb der Cytoplasmamembran an (Foe *et al.*, 1983). In diesem Stadium differenzieren sich am posterioren Pol die Urkeimzellen (Polzellen), die in Cytoplasmataschen oberhalb der ansonsten einschichtigen Kerne durch Zellularisierung abgetrennt werden (Foe *et al.*, 1983).

Die somatischen Kerne durchlaufen drei weitere asynchrone Teilungen. Dabei verlaufen mitotische Wellen von den Polen in Richtung Äquator (Abb. 2B). In der ersten Hälfte des 14. Teilungszyklusses findet die Zellularisierung der somatischen Energiden (Kern + Zytoplasma) statt (Schweisguth *et al.*, 1991), wobei die Cytoplasmamembran von der Eioberfläche nach innen einwandert und die einzelnen Kerne mitsamt zugehörigem Zytoplasma voneinander trennt. Somit geht das so genannte „synzytiale“ in das zelluläre Blastodermstadium

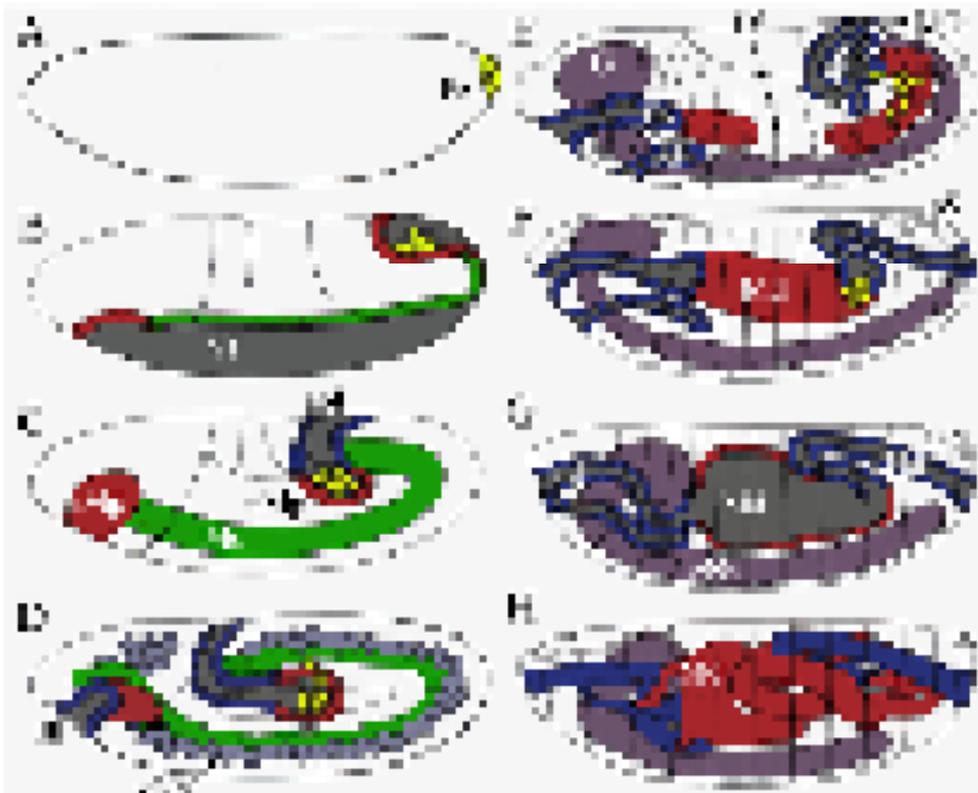


Abb. 3: Schematische Darstellung der Embryogenese von *Drosophila melanogaster*

A) Stadium 5: Zelluläres Blastoderm mit Polzellen (Pz).

B) Stadium 6: Gastrulation durch Invagination des entstehenden Mesoderms in die Ventralfurche (Vf).

C) Stadium 8: Ausstrecken des Keimstreifes, amnioproktodeale Invagination (apI), das Mesoderm (Ms) erstreckt sich vom anterioren (aMp) bis zum posterioren Mitteldarm-primordium (pMp).

D) Stadium 10: Invagination des Stomodeums (stI), Segregation der ventralen Neuroblasten (vNb).

E) Stadium 12: Keimstreifverkürzung, die epidermale Segmentierung wird sichtbar. Ausbildung von Ganglion (G), Malpighischen Gefäßen (MG), Proventrikulus (Pv), Speicheldrüsen (Sd) und trachealen Vertiefungen (tV).

F) Stadium 14: Beginn von Kopfinvolution und Dorsalschluss, Entstehung der posterioren Spirakel (pS) und Fusion des Mitteldarmes (Md).

G) Stadium 15: Vorderdarm (Vd) und Hinterdarm (Hd) bilden zusammen mit dem Mitteldarm (Md) ein durchgehendes Darmrohr, das zentrale Nervensystem (zNs) hat sich ausgebildet.

H) Stadium 17: Nach Beendigung der Kopfinvolution, Bildung von Darmwindungen, Ausbildung des Kopfskeletts und Sezernierung einer Kutikula hat sich die schlupffreie Larve entwickelt.

(nach Hartenstein, 1993)

über. Im Anschluss an die Zellularisierung finden Mitosen nur in bestimmten Domänen und in definierter zeitlicher Abfolge statt (Hartenstein und Campos-Ortega, 1985), d.h. die Teilungen erstrecken sich nicht mehr über den gesamten Embryo. In diesem Stadium sind bereits die Vorläuferzellen somatischer und extraembryonaler Gewebe angelegt.

Eine Zusammenfassung der Entwicklung eines *Drosophila*-Embryos im Anschluss an das Blastoderm-Stadium ist schematisch in Abbildung 3 dargestellt. Gleich nach Abschluss der Zellularisierung (Abb. 3A) beginnt die Gastrulation, bei der die drei Keimblätter differenziert werden. Durch Einwanderung von Zellen in die sich ausbildende Ventralfurche wird das spätere Mesoderm gebildet (Abb. 3B). Gleichzeitig streckt sich der Keimstreif und wandert mit seinem posterioren Ende dorsalwärts nach anterior, wo durch Ausbildung der so genannten Kopffalte die Entstehung der Kopffregion sichtbar wird (Abb. 3C,D). Während der Keimstreifstreckung bilden sich außerdem durch Invagination die anterioren (Stomodäum) und posterioren (Proctodäum) Mitteldarmprimordien aus (Abb. 3C), die im weiteren Verlauf der Entwicklung aufeinander zuwachsen (Abb. 3E). Im Zuge der Bildung des hinteren Darmabschnittes wandern auch die Polzellen ins Innere des Embryos, wo sie später in die mesodermalen Anteile der Gonadenanlagen gelangen (Abb. 3F).

Im Stadium der maximalen Keimstreifstreckung sind bereits die Anlagen vieler somatischer Gewebe, wie z.B. das viscerale und somatische Mesoderm sowie das Zentralnervensystem (Abb. 3D), erkennbar. Außerdem lässt sich der metamere Aufbau des Embryos an äußerlich sichtbaren Segmentabgrenzungen erkennen (Abb. 3E). Im Verlauf der anschließenden Keimstreifverkürzung beginnen sich die späteren larvalen Gewebe immer stärker auszudifferenzieren. Nach Abschluss der Verkürzung wächst das Ektoderm dorsal zusammen (Abb. 3F), wobei sich das Herz ausbilden kann. Als einer der letzten Vorgänge wird die Kopfinvolution abgeschlossen und der Embryo hat sich zu einer schlupffreien Larve entwickelt (Abb. 3H).

1.2 Zellzyklus und Chromatin

Für die Entstehung eines vielzelligen Organismus aus einer einzelnen Zelle ist die Teilung von Zellen von großer Bedeutung. Eine solche Zellteilung ist vor allem durch die korrekte Verteilung des zuvor komplett replizierten Genoms der Zelle gekennzeichnet. Es muss sicher gestellt sein, dass die vollständige genetische Information eines Individuums an die beiden Tochterzellen weitergegeben wird.

In *Drosophila* sind die ersten Zellzyklen stark verkürzt und auch in späteren Entwicklungsstadien je nach Gewebe unterschiedlich ausgeprägt (Abb. 4).

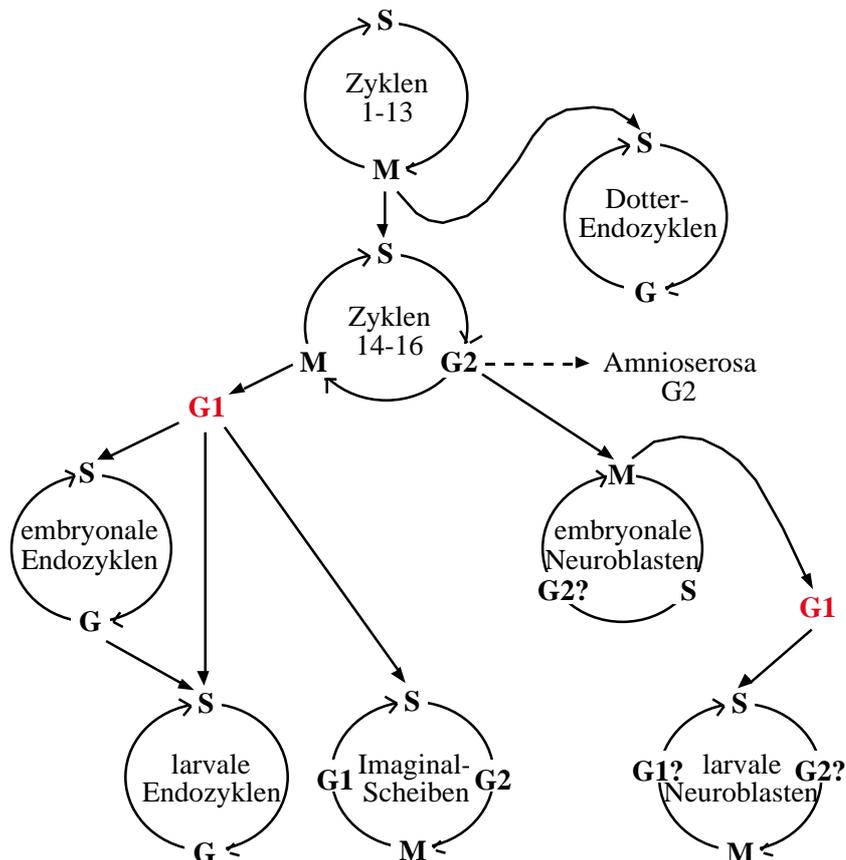


Abb. 4: Schematische Darstellung der verschiedenen Zellzyklen in unterschiedlichen Geweben und Entwicklungsstadien (nach Foe et al., 1993).

Generell lassen sich jedoch vier mögliche Stadien des Zellzyklusses beschreiben. In der G1-Phase liegt das Chromatin im dekontensierten Zustand vor und ist transkriptionell aktiv. Zellen, die sich nicht weiter teilen, bleiben in dieser Phase des Zellzyklus. Soll jedoch eine Teilung erfolgen, dann treten die Zellen in die S-Phase ein, in der die Synthese neuen Chromatins stattfindet, d.h. die DNA wird repliziert und zusammen mit speziellen Proteinen werden neue Chromatinstränge ausgebildet. Anschließend folgt die G2-Phase, in der ebenfalls Transkription stattfindet bevor die Zelle in die M-Phase, in der die Kernteilung stattfindet, eintritt (O`Connell and Nurse, 1994). Diese M-Phase lässt sich ebenfalls in verschiedene definierte Phasen unterteilen (Abb. 5A-F). Sie beginnt mit der Prophase (Abb. 5B), in der die Kondensation des Chromatins einsetzt. Die Kernmembran wird aufgelöst, die Centriolen verdoppeln sich und wandern auseinander. In der Metaphase (Abb. 5C) sind die Chromosomen am stärksten kondensiert und ordnen sich am Zelläquator an, ein Spindelapparat aus Zytoskelettkomponenten hat sich zwischen den Centriolen und den Centromeren der einzelnen zuvor replizierten Chromosomen ausgebildet. In der anschließenden Anaphase (Abb. 5D) werden die jeweiligen Schwesterchromatiden durch Strukturveränderungen der Mikrotubuli an gegenüberliegende Pole transportiert. In der Telophase (Abb. 5E) beginnt sich das Chromatin zu dekontensieren und die Kernmembranen werden wieder aufgebaut. Bis auf spezielle Ausnahmen wird die Mitose durch eine Zytokinese abgeschlossen, d.h. nach der Kern- erfolgt auch eine Zellteilung (Abb. 5F). Im Anschluss daran gehen die Zellen wieder in die G1-Phase über, in der sie ihre individuelle Aufgabe übernehmen können. Die Regulation von Zellzyklen wird vor allem durch die differenzierte Expression von Cyclinen (Lehner und Lane, 1997) in Verbindung mit verschiedenen Zellzyklusregulatoren, wie zum Beispiel den cdc- bzw. cdk-Faktoren ermöglicht (Follette und O`Farrell, 1997). Die Entwicklung von *Drosophila* beginnt mit einem verkürzten Zellzyklus. Dieser durchläuft nur die S- und M-Phase, Zytokinese findet nicht statt (Foe *et al.*, 1983). Somit wird ein möglichst rasches Wachstum im Sinne von Kernvermehrung zu Beginn der Embryogenese gewährleistet. Die verkürzten

Zyklen, ohne G1-Phase und ohne Transkriptionsaktivität, werden durch die Einlagerung von maternal produzierten Transkripten und Proteinen in die Oozyte, die für die ersten Entwicklungsprozesse benötigt werden, ermöglicht (Edgar und O'Farrell, 1989).

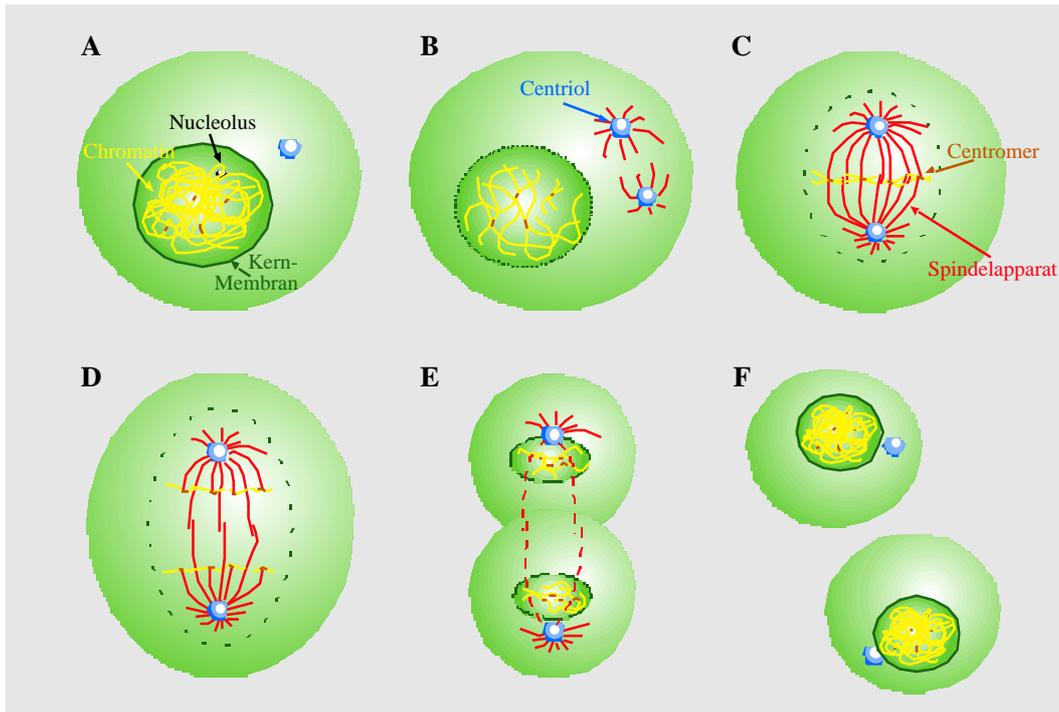


Abb. 5: Schematische Darstellung der Mitose.

A) Interphase: Chromatin dekondensiert, der Nucleolus ist sichtbar. B) Prophase: Das zuvor replizierte Chromatin beginnt sich zu kondensieren. Zwischen den verdoppelten Centriolen bildet sich ein Spindelapparat aus, der Nucleolus hat sich aufgelöst. C) Metaphase: Stärkste Kondensation des Chromatins, Anordnung in der Äquatorialplatte, Ansatz der Mikrotubuli am jeweiligen Kinetochor des Centromers, Kernmembran ist weitestgehend aufgelöst. D) Anaphase: Auseinanderweichen der Schwesterchromatiden. E) Telophase: Beginnende Dekondensation des Chromatins, die Kernmembran bildet sich wieder aus, beginnende Zytokinese. F) Interphase. (nach Alberts *et al.*, 1995)

Die größten Veränderungen während des Zellzyklus erfährt das Chromatin, welches in der Lage sein muss, sich zu duplizieren und unterschiedlich stark zu kondensieren (Abb. 6), was durch eine Vielzahl von molekularen Modifikationen im Chromatin (Patterton *et al.*, 1996) reguliert wird.

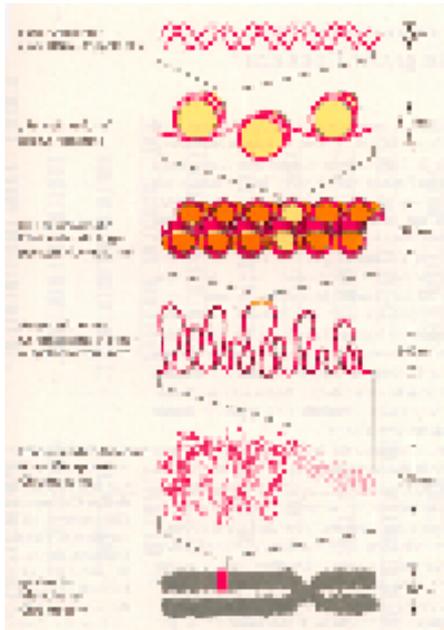


Abb. 6: Schematische Darstellung der Kondensation des Chromatins.

Die DNA windet sich um ein Histon-Oktamer, Nucleosomen werden gebildet. Im Anschluss entstehen durch weitere Kondensation so genannte 30nm-Fibrillen. Diese Fibrillen ordnen sich in Schleifen an der Chromosomenachse an und können während der Metaphase maximal kondensiert werden (nach Alberts *et al.*, 1995).

Im Zustand der stärksten Kondensation während der Metaphase der Mitose findet man neben Histonen vor allem große Mengen von Topoisomerase II, um DNA-Brüche während der Kondensation zu verhindern (Sikorav *et al.*, 1998), und von Condensin-Komplexen (Hirano *et al.*, 1997). Der Condensin-Komplex besteht aus zwei Untereinheiten, den SMC-Proteinen (**structural maintenance of chromosome**) und den Cnd-Proteinen (**Condensin**). Mutationen dieser Faktoren führen zu einer unzureichenden Kondensation von Chromatin während der Mitose, was zu Problemen in der Segregation von Schwesterchromatiden in der Anaphase führt (Steffensen *et al.*, 2001). Dieser Phänotyp lässt sich in *Drosophila* z.B. an Mutanten des Cnd2-Homologs Barren (Bhat *et al.*, 1996) und des SMC4-Homologs Gluon (Steffensen *et al.*, 2001) beobachten. In diesen Mutanten ist die Gesamtlänge der Chromosomen jedoch ähnlich der im Wildtyp-Embryonen. Dies ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass der Condensin-Komplex nicht für die Achsenverkürzung

der Chromosomen, sondern für die Kondensation der Chromatinschleifen mitverantwortlich ist (Bhat *et al.*, 1996; Steffensen *et al.*, 2001).

Zeitgleich mit der Bindung von Condensin an die DNA wird auch die Phosphorylierung von Histon H3 (Hans *et al.*, 2001) beobachtet, was häufig als Marker für Chromatin-Kondensation verwendet wird (Schmiesing *et al.*, 2000). Wie kürzlich gezeigt wurde, wird bei *Drosophila* für beide Prozesse die Kinase Aurora B benötigt (Giet *et al.*, 2001). Dass der Condensin-Komplex nur eine Komponente in einer großen Anzahl zur Chromatin-Kondensation benötigten Faktoren darstellt, lässt sich auch an einem anderen Beispiel erkennen. So ist Condensin mit Proteinen der Polycomb-Gruppe (Lupo *et al.*, 2001) an sogenannten „Polycomb response elements“ kolokalisiert. Dies sind Regionen im Chromatin, die die Transkription benachbarter Regionen durch Ausbildung von heterochromatin-ähnlichen Strukturen inhibieren können (Zink und Paro, 1995). Polycomb-Proteine werden allerdings nicht nur zur Transkriptionskontrolle benötigt (zur Übersicht: Simon und Tamkun, 2002), sondern spielen auch eine Rolle in der Kondensation von Chromatin während der Mitose, was anhand von Mutationen des Proteins Polyhomeotic gezeigt werden konnte (Lupo *et al.*, 2001).

In stark kondensiertem Zustand können weder Transkription noch Replikation erfolgen. Dies hat zur Folge, dass DNA-Bereiche zur Transkription oder Replikation entwunden werden müssen, damit RNA- bzw. DNA-Polymerasen an den Nukleinsäurestrang ansetzen können (Stack *et al.*, 2001). Somit sind Veränderungen in der Chromatinstruktur außer für die Transkriptionsregulation auch für die Replikationskontrolle von Bedeutung.

1.3 Ausbildung der somatischen Muskulatur

Mitosen ermöglichen die Entwicklung einer befruchteten Eizelle zu einem vielzelligen Organismus, in dem verschiedene Zellen oder Zellverbände unterschiedliche Funktionen übernehmen. Die korrekte Differenzierung der einzelnen Gewebe ist essentieller Bestandteil der Embryogenese, was hier am Beispiel der Myogenese dargestellt werden soll.

Nach Determinierung der dorso-ventralen Körperachse werden durch den ventral kernlokalisierten Transkriptionsfaktor Dorsal die mesodermspezifischen Gene *twist* und *snail* aktiviert (Ferguson und Anderson, 1982), welche ebenfalls für Transkriptionsfaktoren kodieren. Nach Synthese dieser beiden Faktoren bildet sich das Mesoderm durch Invagination medio-ventral gelegener Zellen des blastodermalen Embryos aus (Leptin *et al.*, 1990). Diese migrieren, vermittelt durch den FGF-Rezeptor Heartless, (Michelson *et al.*, 1998) weiter dorsalwärts entlang der inneren ektodermalen Oberfläche.

Im Anschluss an seine Bildung lässt sich ein visceraler (Splanchnopleura) und ein somatischer (Somatopleura) Anteil des Mesoderms unterscheiden. Aus dem dorso-lateral liegenden visceralen Mesoderm entwickeln sich Herz und Darmmuskulatur, ein Prozess der vor allem durch die Genprodukte der Homöobox-Gene *tinman* und *bagpipe* kontrolliert wird (Bodmer *et al.*, 1990; Azpiazu und Frasch, 1993; Bodmer, 1993). Im Gegensatz dazu differenzieren sich die ventral dem Neuroektoderm aufliegenden somatischen Mesodermzellen zu Vorläufern der späteren Körperwandmuskulatur (zur Übersicht: Bate *et al.*, 1993).

Über die Grenzen der Keimblätter spielen auch ektodermale Faktoren eine wichtige Rolle bei der Determination des Mesoderms (Cossu *et al.*, 1996). Die parasegmentale Gliederung der Epidermis (Martinez-Arias, 1985) überträgt sich auf das Mesoderm, d.h. aus den anterioren Bereichen entwickeln sich die Anlagen für viscerales Mesoderm und Fettkörper, während aus den posterioren die für Herz und somatisches Mesoderm hervorgehen (Barkowski *et al.*, 1995). So fehlen z.B. als Folge von Mutationen im Gen *even-skipped* viscerales und im

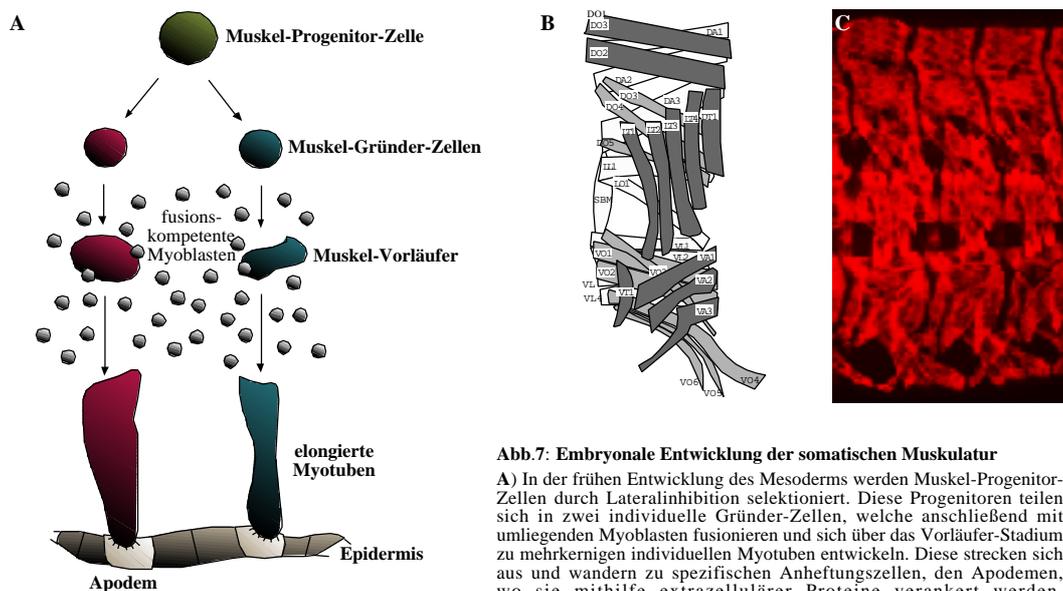


Abb.7: Embryonale Entwicklung der somatischen Muskulatur

A) In der frühen Entwicklung des Mesoderms werden Muskel-Progenitor-Zellen durch Lateralinhibition selektioniert. Diese Progenitoren teilen sich in zwei individuelle Gründer-Zellen, welche anschließend mit umliegenden Myoblasten fusionieren und sich über das Vorläufer-Stadium zu mehrkernigen individuellen Myotuben entwickeln. Diese strecken sich aus und wandern zu spezifischen Anheftungszellen, den Apodemen, wo sie mithilfe extrazellulärer Proteine verankert werden.
 B) Im Abdomen von *Drosophila*-Embryonen lassen sich pro Hemisegment 30 individuelle Muskeln in drei Lagen angeordnet finden, die sich in Größe, Form, Orientierung und Innervierung unterscheiden.
 C) Darstellung der somatischen Muskulatur in drei Hemisegmenten *in vivo* mittels -MHC-Antikörperfärbung.

Falle des Genes *sloppy-paired* somatische mesodermale Strukturen (Riechmann *et al.*, 1997). Neben dieser anterior-posterioren Gliederung des Mesoderms durch ektodermale Faktoren findet auch eine Beeinflussung in dorso-ventraler Ausrichtung statt wie zum Beispiel durch den Gradienten des TGF β -Homologen Decapentaplegic (DPP) in der Epidermis statt (Staebling-Hampton *et al.*, 1994; Frasch, 1995).

Die Larven von *Drosophila melanogaster* zeigen ein spezifisches stereotypes Muster von 30 Muskeln pro Hemisegment in den abdominalen Segmenten A2 bis A7 (Crossley, 1978; Campos-Ortega und Hartenstein, 1985). Jeder dieser Muskeln besitzt eine strukturelle Individualität, d.h. die distinkten Myotuben unterscheiden sich durch Größe, Orientierung, Position und Innervation. Eine Erklärung für diese Individualität bietet die Gründerzelltheorie (Bate, 1990).

Im Stadium der Keimstreifstreckung werden aus mesodermalen Zellen mit hoher Expression des Proneuralgens *lethal of scute* (Carmena *et al.*, 1995) durch Lateralinhibition, vermittelt durch die neurogenen Gene *Notch* und

Delta, die so genannten Muskelprogenitorzellen selektioniert (Abb. 7A). Diese Progenitoren teilen sich analog zur Neurogenese asymmetrisch in zwei Muskelgründerzellen. Im Gegensatz zu den Gründerzellen des Grashüpfers sind diese bei *Drosophila* morphologisch nicht zu erkennen, zeichnen sich jedoch durch eine individuelle Expression von bestimmten Markergenen aus. Als solche sind z.B. *Krüppel* (Ruiz-Gomez *et al.*, 1997), *S59/slouch* (Dohrmann *et al.*, 1990; Knirr *et al.*, 1999), *even-skipped* (Frasch *et al.*, 1987), *nautilus* (Michelson *et al.*, 1990; Paterson *et al.*, 1991), *apterous* (Bourgouin *et al.*, 1992) und *vestigial* (Bate *et al.*, 1993) bekannt. Durch die ektopische Expression solcher Markergene lässt sich die Transformation eines spezifischen Muskels in einen anderen erzeugen (Ruiz-Gomez *et al.*, 1997), d.h. sie sind an der Spezifizierung der Muskelidentität beteiligt.

Die Gründerzellen stellen die Basis eines späteren Muskels dar und besitzen bereits die Informationen, die zur individuellen Entwicklung eines jeden Muskels notwendig sind (Bate, 1990). Entsprechend der späteren Anzahl der Muskeln werden 30 embryonale Gründerzellen pro Hemisegment festgelegt. Durch Fusion mit benachbarten fusions-kompetenten Myoblasten, welche durch die Expression der Transkriptionsfaktoren *Lame duck* (Duan *et al.*, 2001) und *Myoblast incompetent* (Ruiz-Gomez *et al.*, 2002) gekennzeichnet sind, entstehen die Muskelvorläufer. Im Verlauf dieses Fusionsprozesses lagern sich die Myoblasten an die Gründerzellen an und bilden einen Präfusionskomplex aus korrespondierenden Vesikeln. Diese gehen in eine dichte, plaqueförmige Struktur über, die Membranen vesikulieren und werden schließlich abgebaut. Anhand der Charakterisierung einer zunehmenden Zahl von an der Myoblastenfusion beteiligten Genen, wie zum Beispiel *rolling pebbles* (Rau *et al.*, 2001; Menon und Chia, 2001), *dumpfounded* (Ruiz-Gomez *et al.*, 2000), *sticks-and-stones* (Bour *et al.*, 2000), *myoblast city* (Rushton *et al.*, 1995; Erickson *et al.*, 1997), *blown fuse* (Doberstein *et al.*, 1997) oder *rolling pebbles* (Paululat *et al.*, 1997) lässt sich dieser Prozess immer detaillierter beschreiben (zur Übersicht: Doberstein *et al.*, 1997; Paululat *et al.*, 1999). Im Anschluss an die Bildung der Muskelvorläufer entwickeln sich durch weitere

Fusionsereignisse synzytiale Myotuben, die sich ausstrecken und mithilfe von Filopodien (Bate, 1990) über die innere Oberfläche der Epidermis auf spezielle Anheftungszellen, die Apodeme, zuwandern. Nach Erreichen der Apodeme werden die Myotuben zum Abschluss der Myogenese an diesen ektodermalen Zellen mithilfe extrazellulärer Matrixmoleküle verankert (zur Übersicht: Bate, 1990).

1.4 Apodementwicklung und gerichtetes Wachstum von Myotuben

Nicht nur die Determination von Mesoderm und somit auch von somatischer Muskulatur, sondern auch das gerichtete Auswachsen von Muskeln zu ihren Verankerungszellen wird durch ektodermale Faktoren beeinflusst. So konnte zum Beispiel bei dem Käfer *Tenebrio molitor* durch Transplantationsexperimente ein Einfluss ektodermaler Signalgradienten auf das Muskelwachstum nachgewiesen werden (Williams, 1980). Auch bei *Drosophila* scheinen zumindest die epidermalen Segmentgrenzen regulierend auf das Auswachsen von Myotuben zu wirken, was am veränderten Muskelmuster in Segmentpolaritätsmutanten zu erkennen ist (Volk *et al.*, 1994). Ähnliches gilt auch für Mutanten anderer Gene, die an den Segmentgrenzen exprimiert werden, wie z.B. *Toll* (Halfon *et al.*, 1995) oder *rhomboid* (Bier *et al.*, 1990).

Ein Marker für die epidermalen Muskelanheftungszellen und ihre Vorläufer ist das für einen EGR-homologen Transkriptionsfaktor kodierende Gen *stripe* (Frommer *et al.*, 1996). Zum Zeitpunkt der Determination der Muskelvorläufer beginnt die Expression von *stripe* in den Segmentgrenzen und in zwei intrasegmentalen Domänen. Da diese frühe Expression von *stripe* auch in *twist*-Mutanten, die kein Mesoderm ausbilden, zu beobachten ist (Becker *et al.*, 1997), lässt sich schließen, dass die Determination der Apodemvorläufer

unabhängig vom Mesoderm verläuft. In späteren Entwicklungsstadien wird die Expression auf immer weniger Zellen beschränkt. Nach Anheftung der Muskeln an die Epidermis ist Stripe nur noch in den Apodemen nachweisbar (Volk, 1999). In *stripe*-mutanten Embryonen sind abgerundete und scheinbar falsch orientierte Muskeln zu beobachten, da diese vermutlich aufgrund der fehlerhaften Ausbildung der Apodeme nicht an der Epidermis verankert werden können. In diesem Fall wandern die Myotuben weiter entlang der Epidermis bis sie sich nach Einsetzen der Muskelkontraktionen abrunden (Frommer *et al.*, 1996). Allerdings lassen sich auch schon in frühen Stadien fehlgeleitete Muskeln noch vor ihrer Verankerung beobachten. Die Apodemvorläuferzellen sind also vermutlich auch aktiv an dem gerichteten Wachstum von Muskeln beteiligt. Im Gegensatz zu der „loss-of-function“-Situation, d.h. dem teilweisen oder vollständigen Fehlen der jeweiligen Proteinfunktion, kann durch ektopische Expression von *stripe* die Differenzierung von epidermalen Zellen zu Apodemen und das Wachstum von Muskeln zu diesen Zellen induziert werden (Vorbrüggen *et al.*, 1997; Becker *et al.*, 1997).

Durch die Bindung der Muskeln an Apodeme werden diese weiter differenziert, was sich durch das Aufrechterhalten der *stripe*- und *groovin* (Becker *et al.*, 1997)-Expression sowie dem Anschalten weiterer Apodem-Marker wie $\beta 1$ -*tubulin* (Buttgereit *et al.*, 1991), *delilah* (Armand *et al.*, 1994) und α PS1-Integrin (Martin-Bermudo *et al.*, 1997) erkennen lässt. Tatsächlich kann durch einen ektopischen Muskel *stripe*-Expression in zusätzlichen Epidermiszellen induziert werden kann, was sich mithilfe des Neuregulin-homologen Vein erklären lässt. Vein wird von den auf die Apodeme zuwachsenden Myotuben sekretiert und induziert, vermittelt über den EGF-Rezeptor und den RAS-RAF-Signalweg, die Expression von *stripe* und anderen Apodemmarkern in den korrespondierenden Anheftungszellen (Yarnitzky *et al.*, 1997).

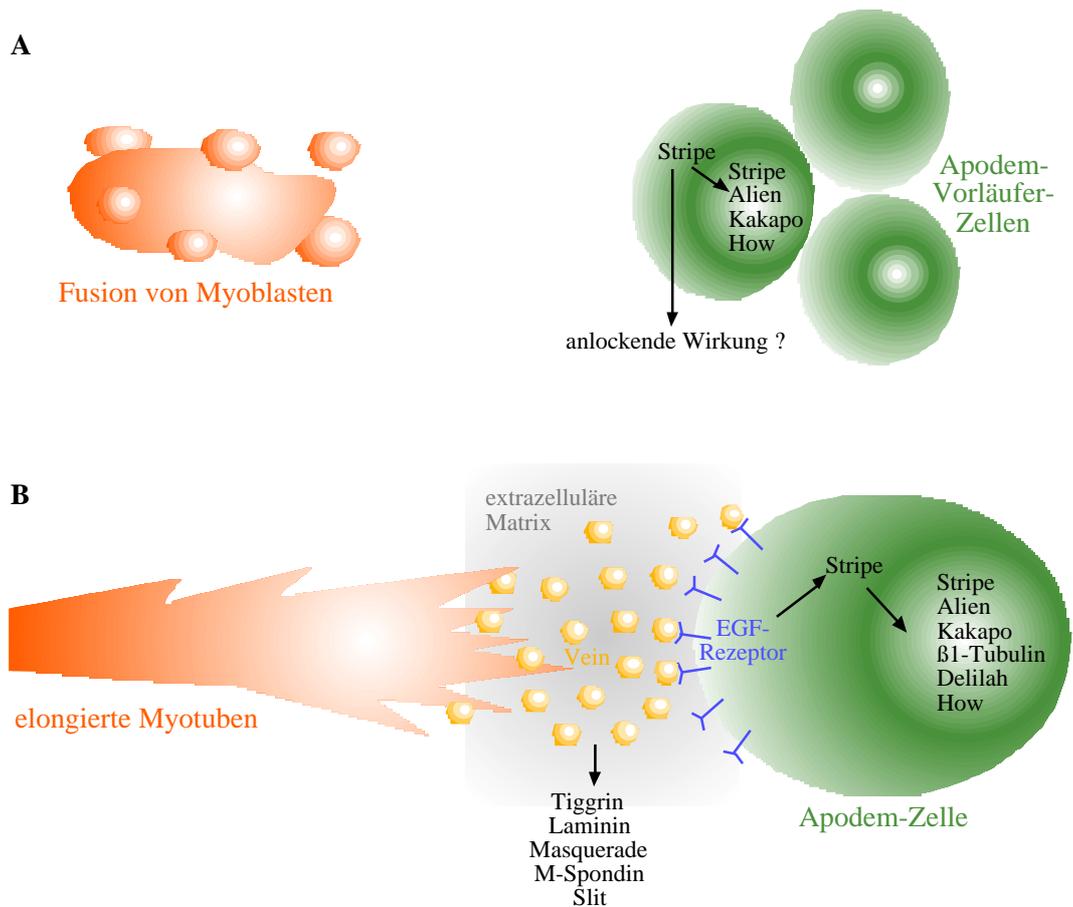


Abb. 8: Darstellung der Apodem-Muskel-Wechselwirkungen

A) Stripe induziert in den Apodem-Vorläufer-Zellen spezifisch Gene und sorgt evtl. bereits in diesem Stadium für eine Muskel anlockende Wirkung. **B)** Die sich nähernden Myotuben sekretieren den Liganden Vein, welcher an den EGF-Rezeptor der Apodemzellen bindet. Dadurch wird eine erneute starke Expression von Stripe erzielt, was wiederum andere apodemspezifische Faktoren induziert. In der extrazellulären Matrix finden sich ebenfalls spezifische zur Verankerung der Muskeln notwendige Proteine (nach Volk, 1999).

Wichtig für die abschließende Verankerung der Muskeln an den Apodemen sind die als Oberflächenrezeptoren fungierenden und als Heterodimere vorliegenden Integrine (Gotwals *et al.*, 1994). So kommt es beispielsweise in Mutanten von *mysospheroid*, der in Muskeln und Apodemen exprimierten Integrin- β -Untereinheit, zu abgerundeten Muskeln (Brown, 1994). Die

Integrine binden an Komponenten der extrazellulären Matrix und vermitteln auf diese Weise die Adhäsion von Muskeln an die Epidermis. Als Komponenten der extrazellulären Matrix zwischen Muskeln und Apodemen sind in *Drosophila* z.B. das Dystrophin-Homolog MSP-300 (Rosenberg-Hasson *et al.*, 1996), die Serin-Protease Masquerade (Murugasu-Oei *et al.*, 1995), Laminin A (Yarnitzky *et al.*, 1995) oder M-Spondin (Umemiya *et al.*, 1997) bekannt.

1.5 „Misexpression-Screen“

Um die Funktion bestimmter Proteine untersuchen zu können, ist es von großem Vorteil, Organismen mit Mutationen für das kodierende Gen untersuchen zu können. Für den diploiden Modellorganismus *Drosophila melanogaster* lassen sich mittels verschiedener Methoden Mutationen erzeugen und in vielen Fällen stabil weitervererben.

Eine große Gruppe dieser Mutationen werden durch P-Element-Insertionen verursacht. Bei diesen Mutationen wird eine zufällige Insertion eines transposablen P-Elementes in das Genom induziert (Spradling *et al.*, 1980). In vielen Fällen integrieren diese P-Elemente unmittelbar in transkribierten Bereichen oder auch in Kontrollregionen für die Expression von Genen, wodurch die Herstellung des Genproduktes quantitativ und qualitativ unterschiedlich stark beeinflusst werden kann. Diese Beeinträchtigung führt oft im Verlauf der Entwicklung zur Ausprägung von so genannten mutanten Phänotypen, die dann im Rückschluss Auskunft über die Funktion des betroffenen Proteins geben.

Außer dem Ausschalten bestimmter Genfunktionen kann auch die übermäßige bzw. falsch lokalisierte Expression eines Proteins zu einem mutanten Phänotypen führen, der im Idealfall gegensätzlich zu dem durch das Fehlen des

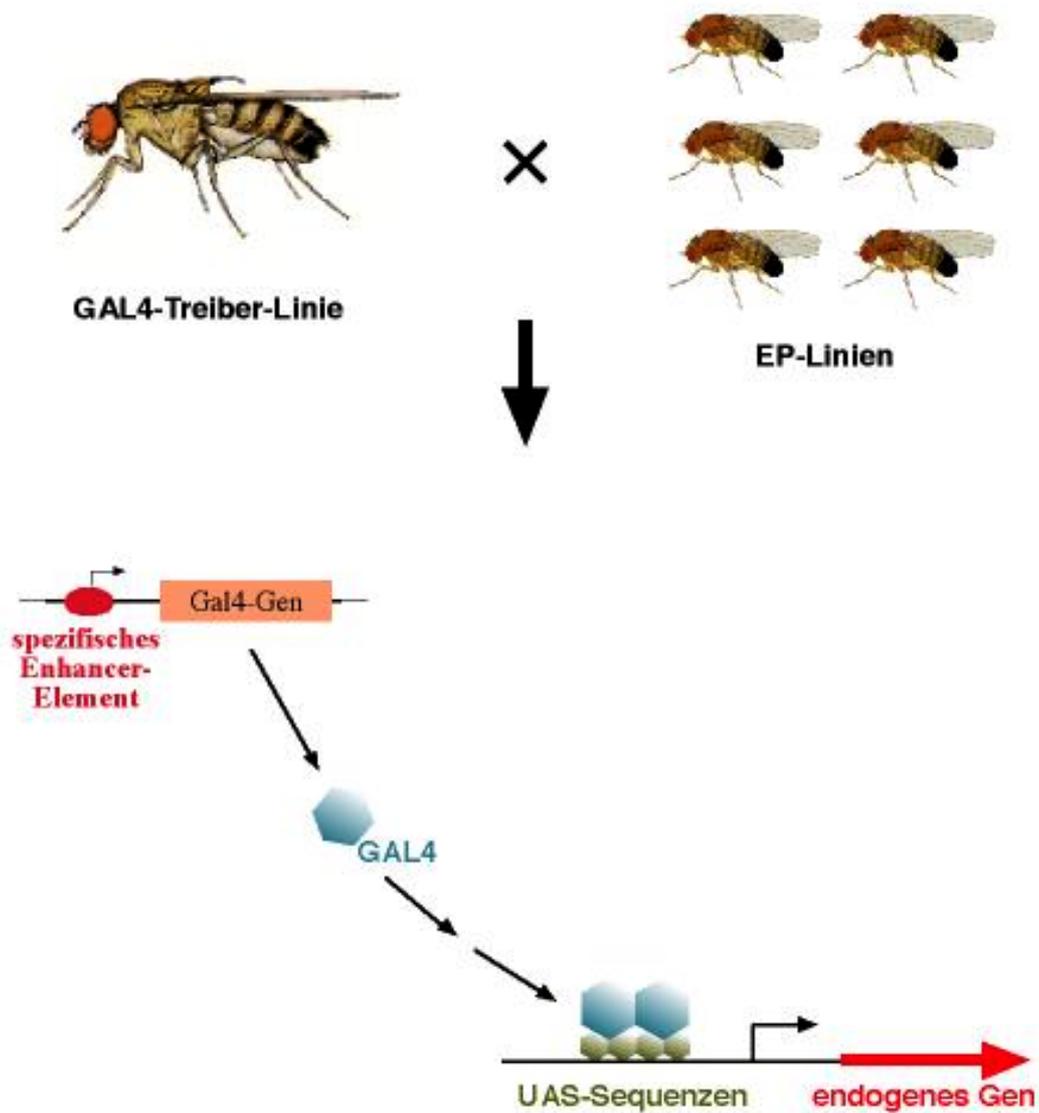


Abb. 9: Schematische Darstellung eines EP-Screens

Die so genannte Treiber-Linie enthält die kodierende Sequenz des Hefe-Proteins Gal4 unter der Kontrolle eines spezifischen Enhancer-Elementes. Nach Kreuzung von Jungfrauen der Treiber-Linie mit Männchen der EP-Linien kann das Gal4-Protein an die UAS-Sequenzen des EP-Elementes (siehe Abb. 4.3.14) binden. Somit kann die Transkription mit Hilfe eines Basalpromotors der 3' vom EP-Element gelegenen genomischen DNA-Sequenzen erfolgen. Im Falle der Integration des EP-Elementes im 5'UTR einer kodierenden Sequenz kann die Transkription dieses endogenen Genes in Abhängigkeit des Enhancer-Elementes der Treiber-Linie erfolgen.

Genproduktes hervorgerufenen Phänotyps ausgeprägt ist. Ektopische Expression lässt sich mithilfe des UAS/Gal4-Systems (Fischer *et al.*, 1988) aus der Hefe erzeugen. Um das Genom von *Drosophila* mittels ektopischer Expression unbekannter Proteine auf bestimmte, veränderte Phänotypen hin zu durchsuchen, wurden so genannte EP-Elemente hergestellt (Rorth *et al.*, 1996). Diese speziellen P-Elemente enthalten außer einem Basispromotor und einem für Plasmid-Rescue-Experimente (Kap. 4.3.14) notwendigem Vektoranteil UAS-Sequenzen („upstream-activation-sites“; siehe Abb. 4.3.14), an denen der Hefe-Transkriptionsfaktor Gal4 bindet und über den Promotor des EP-Elementes Gene aktivieren kann. Theoretisch sollte so die Transkription des dem EP-Element 3' anschließenden („downstream“) genomischen DNA-Bereiches induziert werden (Abb. 9). Mittlerweile stehen mehrere tausend verschiedener Fliegenlinien zur Verfügung, bei denen jeweils einzelne EP-Elemente zufällig im Genom integriert sind. Somit lassen sich systematisch Misexpression-Screens mit einer Vielzahl von Genen durchführen (Rorth, 1996).

In der vorliegenden Arbeit wird ein solcher Misexpression-Screen vorgestellt, der zunächst auf die Identifikation neuer Faktoren des gerichteten Wachstums von Zellen ausgerichtet war. Als Modell für diesen entwicklungsbiologischen Prozess wurde die embryonale Myogenese von *Drosophila* verwendet. Wie bereits in den Kapiteln 1.2 und 1.3 erwähnt, sind die meisten der abdominalen somatischen Muskeln im *Drosophila*-Embryo an den Segmentgrenzen verankert. Die sich entwickelnden Apodeme sekretieren wahrscheinlich auf die Myotuben anlockend wirkende Signale, um das gerichtete Wachstum der Myotuben zu ihren individuellen Anheftungsstellen an der Epidermis zu vermitteln. Umgekehrt ist jedoch auch eine zusätzliche von anderen ektodermalen Zellen ausgehende abstoßende Wirkung denkbar. Um beide Gruppen von Signalen mit einer einzigen Treiberlinie aufspüren zu können, wurde eine Fliegenlinie verwendet, in der das Gal4 unter der Kontrolle des *sr239 pan*-Enhancerfragmentes (Piepenburg *et al.*, 2000) exprimiert wird. Auf diese Weise konnte das Hefe-Protein an den Segmentgrenzen und zusätzlich in

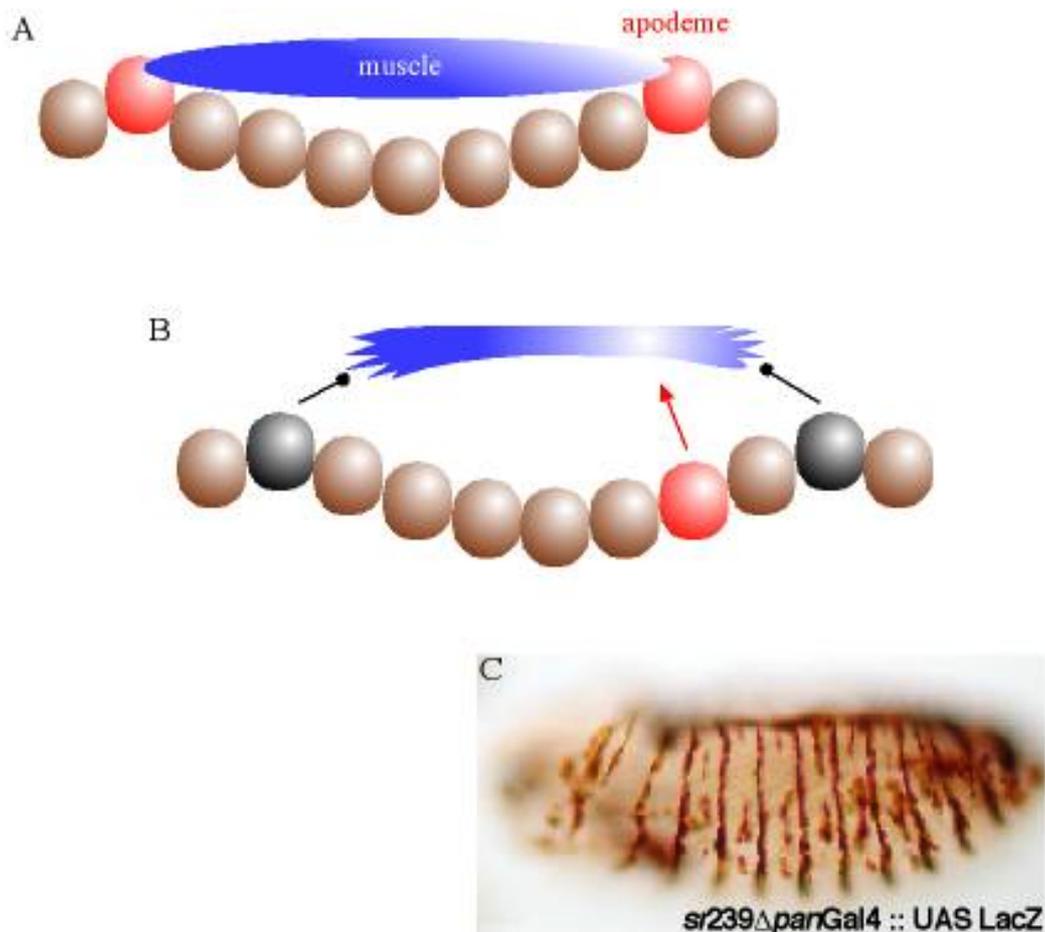


Abb. 10: Darstellung der im EP-Screen verwendeten Treiber-Linie

A) Schematische Darstellung im Wildtyp-Embryo. Ein Großteil der 30 Muskeln eines abdominalen Hemisegmentes sind in anterior-posterior Richtung über das gesamte Segment ausgestreckt, d.h. die diesen Muskeln zugehörigen Apodeme sind Bestandteil der epidermalen Segmentgrenzen. Diese Zellen müssen somit den spezifischen Muskeln anlockende Faktoren exprimieren während die intrasegmentalen Zellen den Muskel eher abstoßen sollten.

B) Mithilfe der im Screen verwendeten Treiberlinie sollen unbekannte Gene in den Zellen der Segmentgrenzen und zusätzlich in einigen Zellen anterior der Segmentgrenze ektopisch exprimiert werden. Somit sollten Faktoren mit anlockender (→) oder abstoßender (→●) Funktion auf Muskeln aufgrund des resultierenden Muskelphänotyps isoliert werden können.

C) Darstellung der Expressionsdomänen der verwendeten Treiberlinie *sr239ΔparGal4* *in vivo* mittels Anti-LacZ-Antikörperfärbung.

einem schmalen mehr oder weniger streifenförmigen Muster innerhalb des Segmentes exprimiert werden (Abb. 10). Mehr als 4000 EP-Element-Linien wurden mit dieser Treiberlinie gekreuzt und die Nachkommen auf embryonale Letalität hin untersucht. Eines der so identifizierten Gene wurde zur genaueren Analyse ausgewählt. Wie sich im Verlauf der Untersuchung herausstellte ist dieser neue Faktor in die Gruppe von Faktoren des Zellzyklusses einzuordnen, die ebenfalls in diesem Screen identifiziert werden konnten.

2. Ergebnisse

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, Faktoren zu identifizieren, welche das gerichtete Muskelwachstum während der Embryogenese beeinflussen. Durch systematische Misexpression von Genen in Epidermiszellen sollten Faktoren identifiziert werden, die entweder direkt oder indirekt mit den auswachsenden Myotuben wechselwirken (Kap. 1.5). Die ektopische Expression solcher Faktoren bewirkt ein aberrantes Muskelmuster, welches durch fehlerhaftes Anheften der Muskeln an die Apodeme charakterisiert ist. Auch Faktoren, die das Substrat der Wegstrecke, wie zum Beispiel die Innenseite der Epidermis, beeinflussen, sollten bei dieser Art der Mutagenese identifizierbar sein. Im folgenden werden zum einen die Ergebnisse des Screens und eine vertiefte Analyse eines identifizierten Gens, welches die Kernteilung beeinflusst, beschrieben.

2.1 Der „Misexpression-Screen“

Zur Identifizierung neuer Faktoren des gerichteten Muskelwachstums wurde ein „Misexpression-Screen“ mit EP-Fliegenlinien durchgeführt (Kapitel 1.5). Die verwendete Treiber-Linie exprimiert das aus der Hefe stammende Gal4-Protein an den embryonalen Segmentgrenzen und in einer weiteren Domäne innerhalb des Segmentes unter der Kontrolle des *sr239 pan*-Enhancerfragmentes (Piepenburg *et al.*, 2000). Somit konnte in diesen Domänen die ektopische Expression genomischer DNA im 3' anschließenden Bereich des jeweiligen EP-Elementes (Rorth *et al.*, 1996) durch die Bindung des Gal4-Proteins an die im EP-Element enthaltenen UAS-Sequenzen induziert werden (siehe Abb. 9 und Abb. 4.3.14). Dies hatte die theoretische Grundlage, dass durch ein verändertes Muskelmuster nach ektopischer Expression von auf Myotuben anziehend wirkenden Faktoren in der intrasegmentalen Domäne

oder von auf Myotuben abstoßend wirkenden Faktoren an den Segmentgrenzen beide Kategorien von Signalen mit einer Gal4-Treiber-Linie identifiziert werden konnten (siehe Abb. 10).

Insgesamt wurden die Männchen von 4058 verschiedenen EP-Linien mit Jungfrauen der Treiber-Linie gekreuzt. Anschließend wurden die Linien, die nach dieser Kreuzung bei 29°C letale Nachkommen erzeugten (503 EP-Linien, 12,4%), in einem so genannten „Rescreen“ erneut mit der Treiber-Linie gekreuzt, um die induzierte Letalität zu verifizieren. Der Phänotyp der embryonalen Letalität wurde als erstes Auswahlkriterium verwendet, da bei einem gestörten Muskelmuster der Embryo nicht aus seiner Eihülle schlüpfen kann und somit nicht zu einer funktionsfähigen Larve heranreift.

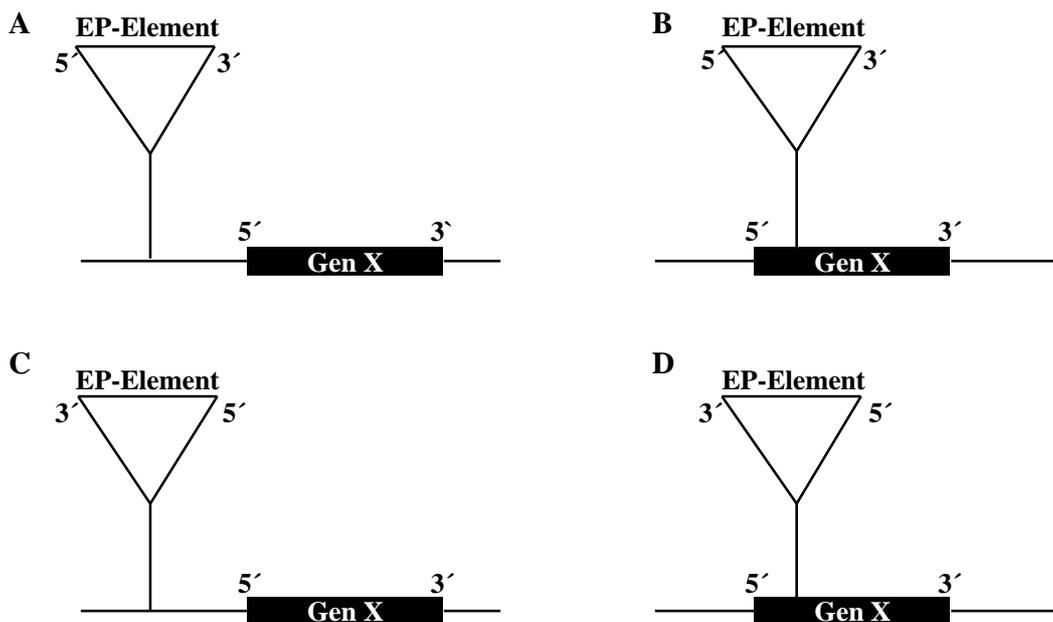


Abb. 11: Integration und Orientierung der EP-Elemente in den Kandidaten-Linien.

A) EP in 5'-sense-Orientierung vor GenX; 36 Linien, 55%. B) EP in 5'-sense-Orientierung integriert in GenX; 21 Linien, 32%. C) EP in 3'-antisense-Orientierung vor GenX; 3 Linien, 5%. D) EP in 3'-antisense-Orientierung integriert in GenX; 5 Linien, 8%.

Nach dieser erneuten Kreuzung wiesen die Nachkommen in 65 Fällen (1,6%) Letalität auf. Diese EP-Linien werden im folgenden als Kandidaten-Linien bezeichnet und sind in Tabelle 1 aufgeführt. Da zu einem Großteil der verwendeten EP-Element-Linien noch keine Sequenz-Informationen bezüglich der Insertionsstelle des EP-Elementes vorlagen, wurde mittels der Plasmid-Rescue-Technik bzw. inverser PCR (Kap. 4.3.13) die Lokalisation des EP-Elementes innerhalb des Genoms bestimmt. Beim größten Teil dieser Linien (57 Linien, 87%) ist das EP-Element entweder im 5´-Bereich (36 Linien, 55%) oder in der kodierenden Sequenz eines Gens (21 Linien, 32%) in 5´ 3´-Orientierung (sense Orientierung) inseriert. Nur in wenigen Fällen (8 Linien, 13%) ist das EP-Element in antisense Orientierung in (5 Linien, 8%) oder vor (3 Linien, 5%) einem ORF inseriert (Abb. 11). Die Lage aller 65 EP-Elemente in Bezug zur jeweils nächstgelegenen Transkriptionseinheit ist in Tabelle 1 zusammengefasst.

Unter diesen möglicherweise durch das EP-Element beeinflussten Genen ist eine Großzahl von annotierten Genen (Berkeley *Drosophila* Genome Project = BDGP, www.fruitfly.org; GadFly, www.fruitfly.org/annot/index.html), die keine Homologien zu bereits bekannten Genprodukten aufweisen (Abb. 12). Die größte Gruppe unter den bereits bekannten Proteinen stellen Enzyme (27,7%) dar. Etwa eine gleich große Gruppe (23,1%) umfaßt allgemeine Regulatoren der Transkription bzw. der Translation und des Zellzyklusses, sowie Rezeptoren und spezielle Transkriptionsfaktoren. Die Verteilung der Kandidatengene in die oben angeführten Gruppen ist in Abb.12 dargestellt.

EP-Nummer	theoretisch beeinflusste Transkriptionseinheit
0447	5´inseriert in Orphan-Rezeptor
0613	5´vor <i>twine</i> = <i>Dcdc 25</i> , 5´inseriert in <i>clot 604</i>
0969	antisense inseriert in Elongations-Initiations-Faktor-UE3
1074	5´inseriert in Glutathion-S-Transferase
1173	5´inseriert in RAN GTPase-Aktivator
1218	5´inseriert in CG1733
1232	5´vor CG 3600; EG:BACH6115.1
1244	5´vor CG14757

1319	antisense inseriert in <i>easily shocked</i> = Ethanolamin-Kinase
1344	5´vor CG12701, Zink-Finger-Protein
1460	5´vor CG14052
2092	5´integriert in <i>des1</i> = Meiose-Initiations-Faktor
2104	5´integriert in <i>gutfeeling</i> = Ornithine-Decarboxylase-Inhibitor
2159	5´integriert in <i>escargot</i> , Transkriptionsfaktor
2160	5´vor Pka-C1, inseriert in <i>polo</i> = Serin-/Threonin-Kinase, Funktion in Mitose
2220	5´vor LD44795
2269	5´inseriert in SD0913, EP-hot spot
2281	5´vor ribL18a
2360	5´vor rdgB = Phosphatidylinositol-Transporter
2392	5´inseriert in CG17292 = Triacylglyceryl-Lipase
2441	5´inseriert in Retrotransposon
2470	5´vor CG15078, antisense zu CG15092
2646	5´vor Monocaboxylat carrier, inseriert in BcDNA
3024	5´vor Mikrotubuli-Motor-Protein
3093	5´vor CG11033, Zink-Finger-Protein
3127	5´vor CyclinB3
3186	5´vor CG3768 (Kalzium-bindungs-Protein), inseriert in CG5555
10906	antisense vor CG9009 = CoA-Ligase
10912	5´vor CG1417 = Prolin-Dehydrogenase
10913	5´vor CG9742 = Sliceosom-Faktor
10919	5´vor CG8915 = RNA-Helikase
20080	5´inseriert in 33E1 = Translations-Elongations-Faktor
20290	antisense vor CG10106; integrales Membran-Protein
20692	5´inseriert in CG9075, eIF-4A = Translations-Initiations-Faktor
21140	5´inseriert in CG 10497, <i>syndecan</i> (Proteoglycan)
21143	5´inseriert in Pabp2 = PolyA-bindendes Protein
25812	5´inseriert in CG1782, Uba1 = Ubiquitin-aktivierendes Enzym
25871	antisense in <i>chico</i> = Insulin-like-growth-factor-receptor-binding
25585	antisense inseriert in CG 25585
25866	5´vor <i>schnurri</i> (Transkriptionsfaktor)
26140	5´vor CG17059
26450	5´vor CG10685 = RNA-Polymerase-Untereinheit
26462	5´vor CG12128
26650	5´inseriert in CG11788
30838	5´inseriert in CyclinA
32155	5´vor CG17146 = Adenylat-Kinase
32189	5´vor GNBP3, bindet Gram-negative Bakterien
32202	5´vor CG10685, RNA-Polymerase
32235	5´vor CG11857, Vesikel-Transport
32278	5´inseriert in <i>effete</i> , involviert im Ubiquitin-Zyklus

35012	5´vor CG6968
35047	5´vor B52, SR-Splicingfaktor
35048	5´vor RE53394
35059	5´vor CG 4963, Mitochondrialer Carrier
35064	5´vor CG12078
35098	5´insetiert in CG6854, CTP-Synthase
35117	antisense insetiert in CG9763, Gyanylat-Cyclase
35124	5´vor Molybden-Kofaktor-Synthese-Schritt1-ProteinA
35125	5´vor clot14343
35134	5´vor CG14873
35141	5´vor CG14713
35161	antisense vor <i>sufateless</i> = Heparin-N-Deacetylase/ N-sulfotransferase
35180	5´vor CG1271, integriert in CG11005, beide zur Dehydrogenase/Reduktase-Familie SDR
36553	5´insetiert in CG14648, RNA-bindendes Protein
36772	5´insetiert in <i>toll</i> = Transmembran-Rezeptor

Tab. 1: Liste der Kandidaten-Linien und den zugehörigen betroffenen Genen.

Die in Tabelle 1 aufgeführten Kandidaten wurden erneut, diesmal mit einer größeren Anzahl von Individuen, mit Fliegen der Treiber-Linie gekreuzt. Die Nachkommen dieser Kreuzungen wurden mittels einer Anti-MHC-Antikörperfärbung (Kap. 4.7) auf Veränderungen im embryonalen Muskelmuster hin überprüft. In 14 Fällen (ca. 22%) war bei den Nachkommen dieser Kreuzungen kein embryonaler Muskelphänotyp zu erkennen, während die übrigen Nachkommen ein unterschiedlich stark beeinflusstes Muskelmuster aufwiesen. Unter diesen war bei den Nachkommen von 22 Kreuzungen (ca. 34%) ein sehr stark ausgeprägter Phänotyp zu erkennen, der nicht nur die Muskeln, sondern auch andere Bereiche der embryonalen Entwicklung beeinflussten.

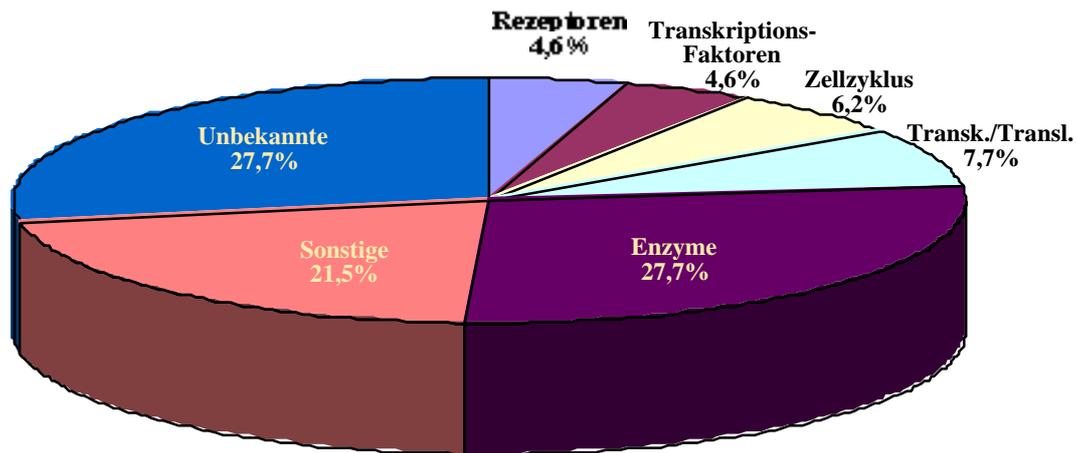


Abb.12: Gruppierung der in den Kandidaten-Linien betroffenen Genprodukte aufgrund ihrer nachgewiesenen bzw. vorhergesagten Funktion.

Aufgrund der verwendeten Treiberlinie, welche das Gal4-Protein an der Segmentgrenze in der *stripe*-Domäne und in einem weiteren intrasegmentalen Streifen exprimiert (Einleitung, Abb. 10), sind verschiedene Muskelphänotypen zu erwarten, die in Abb. 13 schematisch dargestellt sind. Ein Wildtyp-Muskel, der an Apodemen der Segmentgrenzen inseriert ist, ist in Abb. 13A zu sehen. Bei ektopischer Expression eines Faktors für gerichtetes Auswachsen wären zum Beispiel fehlgeleitete Muskeln zu erkennen, die evtl. an falscher Stelle an der Epidermis anheften (Abb. 13B). Da sie möglicherweise aber an diesen Zellen nicht verankert werden können, runden sie sich am Ende der Embryogenese ab, wenn die kontraktiellen Elemente der Muskeln aktiviert werden. Ein Beispiel für einen solchen Faktor, welcher in diesem Screen gefunden wurde, ist der Ornithine-Decarboxylase-Inhibitor Gutfeeling (Salzberg *et al.*, 1996). Ein vergleichbarer Phänotyp abgerundeter Muskeln ist auch im Falle der unmittelbaren Beteiligung eines Kandidaten-Gens an der Anheftung und Verankerung (Abb. 13C) von Muskeln zu erwarten. Als Beispiele für diese Gruppe lassen sich die in dem Screen gefundenen Gene *syndecan* (Spring *et al.*, 1994) und *toll* nennen (Halfon *et al.*, 1998). Außerdem werden bei dieser Art von Screen auch Faktoren selektioniert, die im Zellzyklus eine Rolle spielen. In diesem Falle könnten Apodemzellen aufgrund

von Inhibition der Zellteilung oder durch Apoptose gar nicht ausgebildet werden oder im Gegenteil theoretisch auch vermehrt auftreten (Abb. 13D). Diese Störung der epidermalen Struktur würde ebenfalls einen Phänotypen von fehlgeleiteten und abgerundeten Muskeln erwarten lassen. Als Beispiele dieser Gruppe lassen sich *Dcdc25* (Edgar und O'Farrell, 1989) und *cyclinB3* (Sigrist *et al.*, 1995) nennen.

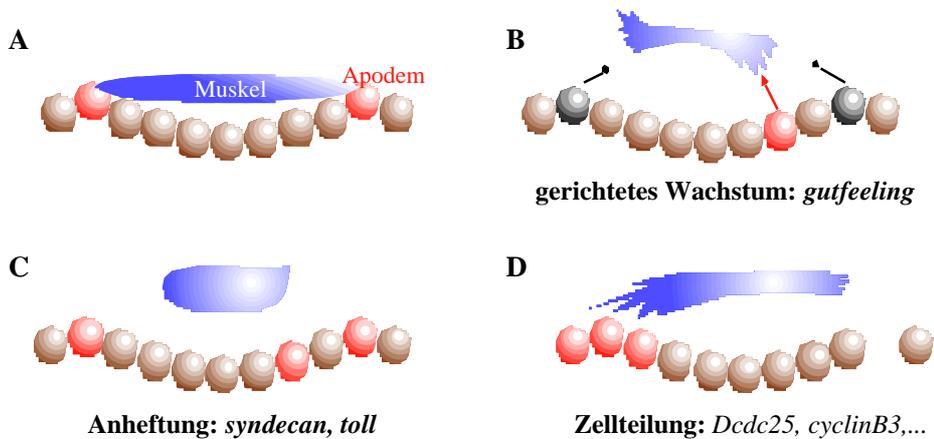


Abb.13: Schematische Darstellung von theoretisch zu erwarteten Muskelphänotypen.

A) Wildtyp. B) Fehlgeleitete Muskeln durch ektopische Expression von anlockenden oder abstossenden Signalen. C) Abgerundete Muskeln aufgrund von Problemen bei der Anheftung und Verankerung an der Epidermis. D) Fehlgeleitete oder nicht angeheftete Muskeln durch ektopische Expression von Zellzyklus-Komponenten. Für die einzelnen Gruppen wurden Beispiele unter den bereits bekannten Kandidatengenen gefunden.

Beispiele für falsch ausgebildete Muskelmuster aufgrund ektopischer Expression mit dem Screen-Treiber sind in Abbildung 14 A-E gezeigt. Neben dem Muskelphänotypen durch ektopische Expression von *gutfeeling* (Abb. 14 B) sind auch durch die ektopische Expression bisher unbekannter Gene verursachte Muskelmuster zu sehen (Abb. 14 C-E).

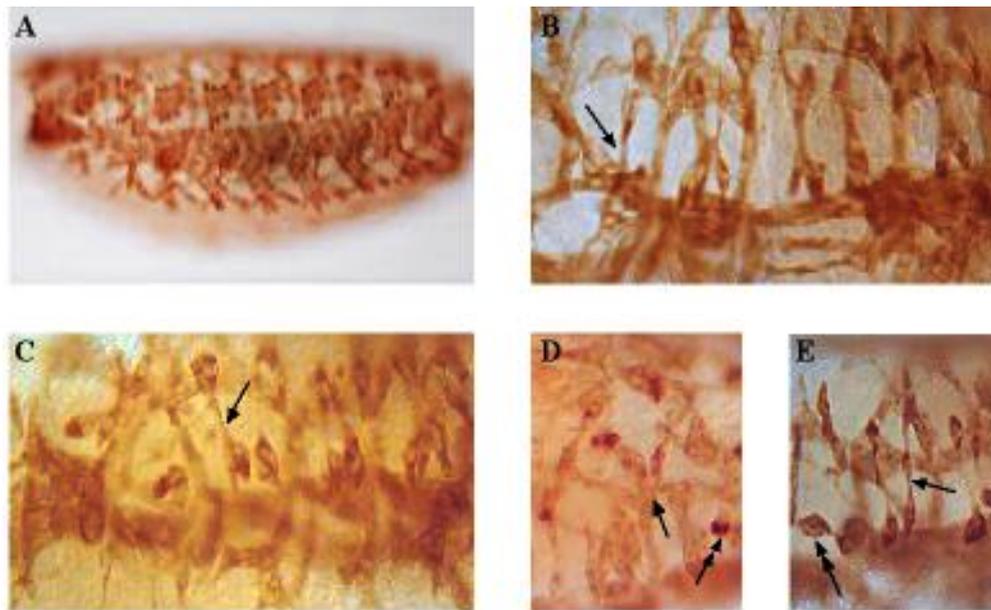


Abb.14: Beispiele für Muskelphänotypen nach ektopischer Expression.
 Kreuzung der EP-Linien mit *sr239Δpan*/Gal4, Beispiele für fehlgeleitete (Pfeile) und abgerundete (Doppelpfeil) Muskeln sind markiert, MHC-Antikörperfärbungen.
 A) Wildtyp-Übersicht. B) EP2104 integriert in *gutfeeling*. C) EP3093 integriert vor CG11033, einem F-Box-Gen D) EP1344 integriert vor CG12701, wahrscheinlich Funktion im Zellzyklus. E) EP447 inseriert in einem Orphan-Rezeptor.

Aufgrund der individuellen Muskelphänotypen und der Verfügbarkeit von cDNA-Klonen, wurden einige Gene ausgewählt, um deren Expressionsmuster zu bestimmen. Neben vielen unterschiedlichen Verteilungsmustern (Ergebnisse nicht gezeigt) der Transkripte wiesen einige der Kandidaten auch Expressionsmuster auf, in denen die mRNA in segmentalen Streifenmustern in älteren Embryonen vorlagen (Abb. 15). Außer dem für ein Proteoglycan kodierenden Gen *syndecan* (Spring *et al.*, 1994; Abb. 15A) sind diese derartig exprimierte Kandidaten-Gene bisher nicht genauer untersucht (Abb. 15B-D). Solche Expressionsmuster an den Segmentgrenzen, lassen auf die Möglichkeit einer Beteiligung dieser Faktoren an dem gerichteten Auswachsen von Muskeln schließen.

Im folgenden Teil dieser Arbeit soll eines der Kandidatengene detaillierter vorgestellt werden. Nach Kreuzung der *sr239 pan*-Treiber-Linie mit der EP-

Linie 1344 wiesen die Nachkommen ein stark defektes Muskelmuster auf (Abb. 14D), in dem viele fehlgeleitete Muskeln in einem sehr engen Bereich an der Epidermis inseriert sind (Pfeil), während sich andere Muskeln offenbar aufgrund einer fehlerhaften Verankerung abrunden (Doppelpfeil). Wie im folgenden dargestellt, ist das betroffene Gen der ebenfalls in diesem Screen als Kandidaten zu erwarteten Gruppe von Faktoren, die an dem koordinierten Ablauf des Zellzyklusses beteiligt sind, zuzuordnen.

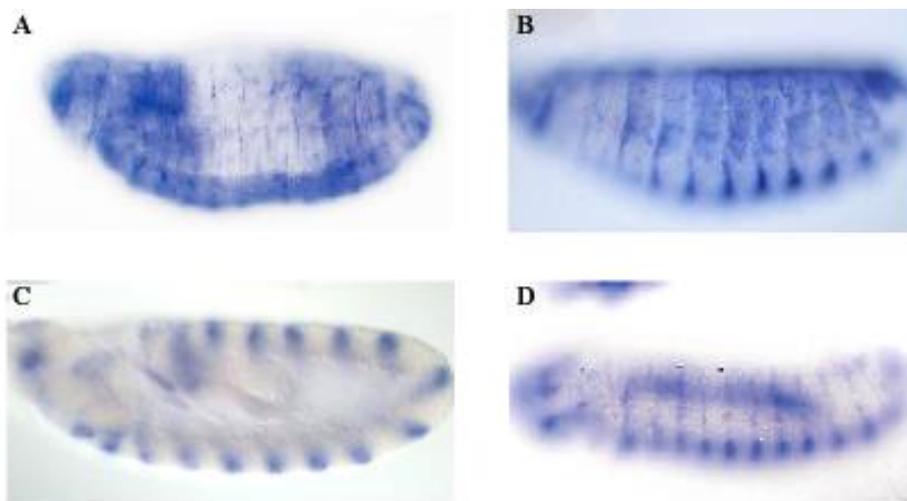


Abb.15: Beispiele von Kandidaten-Genen, die in segmentalen Streifen exprimiert sind.

A) In der Linie HD21140 ist das EP-Element in *syndecan* integriert, das für ein Proteoglycan kodiert und dessen Rolle in Anheftungsprozessen beschrieben ist. Expression in den Apodemen Stadium 17. B) In der Linie HD35048 ist das EP vor einem nicht annotierten Gen inseriert, Expression des Klonen RE53393 in Stadium 14 an den Segmentgrenzen und in einer zusätzlichen intrasegmentalen Domäne.

C+D) Integration des EP vor dem unbekanntem CG14873, Expression des Klonen RE13319 in Streifen an den Segmentgrenzen in Stadium 11 (C) und Stadium 13 (D).

2.2 Die Insertionsstelle von EP 1344

Durch Plasmid-Rescue-Experimente (Kap. 4.3.14) war es möglich, flankierende DNA-Bereiche des EP-Elementes der Linie 1344 zu isolieren und zu sequenzieren und somit die Integrationsstelle des EP-Elementes innerhalb des Genoms von *Drosophila* zu lokalisieren.

Die Sequenz des 321bp langen Plasmid-Rescue-DNA-Fragmentes zeigt, dass das EP-Element der Fliegenlinie EP1344 in das X-Chromosom (Region 18F) inseriert ist. Dort ist es im 5'UTR eines bisher unbekanntes Genes integriert. Dieses annotierte Gen erhielt den Namen CG12701 in der BDGP-Datenbank (www.fruitfly.org/cgi-bin/annot/gene?CG12701). Ich habe es aufgrund des Phänotypes von Mutationen *vielfältig* genannt.

Durch Northern-Blot-Untersuchungen (Kap. 4.4) wurde nachgewiesen, dass der transkribierte Bereich von *vielfältig* sich über eine Länge von mehr als 7.4 kb (größte Markerbande) erstreckt (Abb. 17I), 7,73 kb der Transkriptionseinheit sind durch cDNA-Klone abgedeckt. Es scheint sehr wahrscheinlich, dass der 5'UTR sich über einen größeren Bereich erstreckt, da mehrere Promoter-Sequenzen (BDGP, Promoter-Prediction, www.fruitfly.org/seq_tools/other.html) noch vor dem am weitesten 5'gelegenen cDNA-Klon vorhergesagt sind.

Neben der semiletalen EP-Linie standen neun letale P-Element-Linien zur Verfügung („Göttingen-X-Chromosom-Projekt“, Peter *et al.*, 2002), bei denen das P-Element ebenfalls in allen Fällen im 5'UTR des *vielfältig*-Transkriptes inseriert ist. In Abb. 16A sind drei dieser P-Element-Linien exemplarisch dargestellt. Mittels dieser Fliegenlinien ließen sich Studien zur möglichen Funktion von *vielfältig* durchführen (Kap. 2.6-2.8, 2.10).

vielfältig-mRNA enthält einen durchgehenden ORF von 4788 bp und codiert somit für ein Protein von 1596 AS. Mittels Computer-Analysen (NCBI; Smart-Program, www.smart.embl-heidelberg.de) zum Auffinden von bekannten Protein-Domänen wurden neben einem NLS (**n**uclear **l**ocalisation **s**ignal) sechs so genannte Zink-Finger-Motive (Parraga *et al.*, 1988) entdeckt. Zwei singuläre

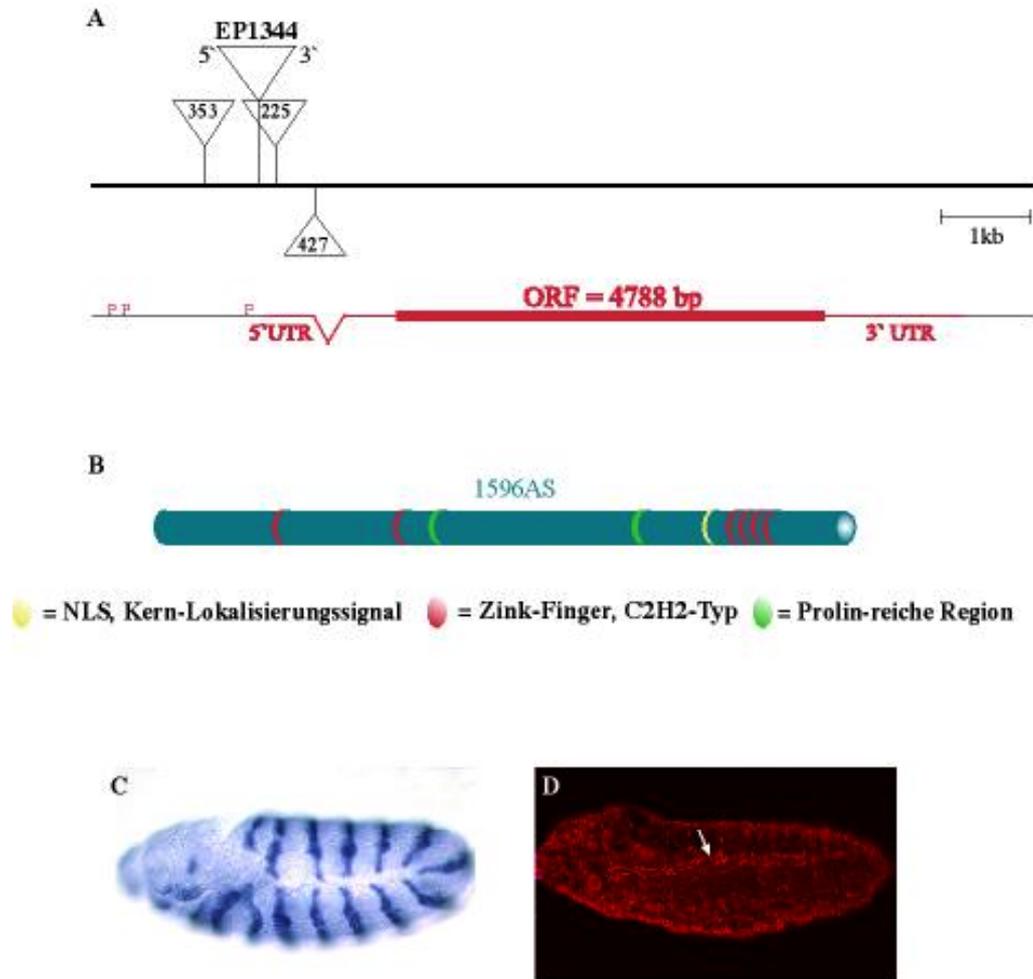


Abb. 16: Schematische Darstellung der genomischen Region von CG12701/ *vielfältig* und der Proteinarchitektur.

A) EP1344 ist auf dem X-Chromosom an Position 18F integriert. Ausserdem standen mehrere letale Fliegenlinien zur Verfügung, in denen ein P-Element nur wenige bp von der Integrationsstelle des EP-Elementes lokalisiert ist. Dieser P-Element-hotspot liegt in der 5'-Region eines relativ grossen bisher unbeschriebenen Gens, CG12701. Der gesamte ORF sowie 3'- und 5'-UTR sind durch cDNA-Klone bestätigt. Durch P sind Positionen in der DNA markiert, an denen sich laut Computervorhersage Promotersequenzen befinden können. Somit ist der 5'-UTR möglicherweise etwas länger als dargestellt, wodurch die P-Element-Integrationsstellen in diesem Fall im 5'UTR von CG12701 liegen würden.

B) Darstellung des CG12701-Proteins mit Angabe von Proteindomänen laut Computervorhersage.

C) Die Transkription von CG12701 = *vielfältig* lässt sich durch EP1344 induzieren. Nachweis der mRNA nach Kreuzung mit einer *enGal4*-Treiber-Linie.

D) TR-Gal4::EP1344, zum Nachweis der Translation wurde eine Anti-Vielfältig-Antikörperfärbung durchgeführt, das Protein wird ektopisch im Tracheensystem exprimiert.

Zink-Finger bilden sich in der N-terminalen Hälfte des Vielfältig-Proteins und eine Gruppe von vieren dieser Motive in der C-terminalen Hälfte. Alle sechs Zink-Finger-Motive sind vom so genannten C₂H₂-Typ (Iuchi, 2001), welcher vor allem durch seine Bindungsaffinität zu DNA bekannt ist (Stanojeviv *et al.*, 1989). Außer diesen Motiven lassen sich in der AS-Sequenz auch zwei Prolinreiche Bereiche entdecken, welchen häufig eine nicht näher definierte Funktion zugesprochen wird. Eine schematische Übersicht des Proteins und seiner Domänen ist in Abb. 16B gezeigt.

Da das EP-Element in der Linie EP1344 im 5'-Bereich von *vielfältig* inseriert ist und die UAS-Sequenzen in Transkriptionsrichtung orientiert sind, sollte theoretisch eine Induktion der Transkription von *vielfältig*-mRNA möglich sein. Um dies experimentell nachzuweisen, wurde die Linie EP1344 mit einer *engrailed*Gal4-Treiber-Linie (Kornberg *et al.*, 1985) gekreuzt und die *vielfältig*-mRNA mittels einer *in-situ*-Hybridisierung (Kap. 4.8) mit DIG-markierten RNA-Proben detektiert. Wie in Abbildung 16C zu erkennen ist, lassen sich die Transkripte von *vielfältig* ektopisch in den Expressionsdomänen der Treiber-Linie, das heißt in einer Serie von Streifen entlang der Längsachse des Embryos, nachweisen. Dass es sich dabei tatsächlich um eine ektopische und nicht um die im Wildtyp-Embryo ausgeprägte Expression handelt, wird in Kapitel 2.3, welches das natürliche Expressionsmuster von *vielfältig* behandelt, deutlich. Um sicher zu stellen, dass außer der Transkription der mRNA auch die Translation induziert werden kann, wurde mittels eines Anti-Vielfältig-Antikörpers (Kap. 4.5) am Beispiel des im Tracheensystem exprimierten TR-Gal4-Treibers nachgewiesen (Abb. 16D). Somit ist das EP-Element 1344 bzw. der in ihm enthaltene Promotor nach Aktivierung durch das ebenfalls ektopisch exprimierte Gal4-Protein in der Lage, die Expression von *vielfältig*-mRNA zu induzieren, welche anschließend auch nachweisbar translatiert wird.

2.3 Das Expressionsmuster der *vielfältig*-mRNA

Die Verteilung der *vielfältig*-mRNA wurde mittels *in situ*-Hybridisierungen (Kap. 4.8) an Embryonen verschiedener Stadien ermittelt. Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 17 bis 19 zusammengefasst.

Die Transkripte von *vielfältig* werden bereits in der Oogenese gebildet und in die Oocyte eingelagert (nicht gezeigt), wodurch im frühen Embryo eine sehr hohe Konzentration der mRNA nachweisbar ist (Abb. 17A). Nach Degradation der maternalen mRNA im Stadium der Zellularisierung (nicht gezeigt) ist eine schwächere zygotische Expression kurz nach Einsetzen der Gastrulation detektierbar (Abb. 17B). Im weiteren Verlauf der Entwicklung ist *vielfältig* zunächst ubiquitär verteilt und wird später zunehmend auf das sich entwickelnde Nervensystem beschränkt (Abb. 17C-E). Am Ende der Embryogenese sind die Transkripte in den Spirakeln (nicht gezeigt), dem Bolwig-Organ und vor allem im gesamten Zentralnervensystem in einem gepunkteten Muster, d.h. nicht in allen neuronalen Zellen, nachweisbar (Abb. 17F). Im dritten Larvalstadium lassen sich *vielfältig*-Transkripte in den Imaginalscheiben detektieren. In der Flügelimaginalscheibe (Abb. 17G) findet man die Transkripte vor allem im Bereich des späteren Flügelrandes. In der Augenimaginalscheibe (Abb. 17H) ist die mRNA in Bereichen der Optischen Furche erkennbar. Diese Expressionsmuster entsprechen wie im Embryo teilungsaktiven Bereichen.

Mithilfe einer Northern-Blot-Analyse (Kap. 4.4) lässt sich der zeitliche Verlauf der Expression von *vielfältig*-Transkripten ebenfalls darstellen (Abb. 17F). Die mRNA ist wegen ihrer maternalen Komponente stark in sehr jungen Embryonen erkennbar, bleibt aber auch im weiteren Verlauf der Embryonalentwicklung sowie im gesamten Lebenszyklus von *Drosophila* erhalten.

Da offenbar nicht alle Zellen des Nervensystems *vielfältig*-Transkripte exprimieren (siehe Abb. 17 E, F), war von Interesse, welche Zellen des ZNS durch die Färbung markiert waren. Mithilfe einer Doppelfärbung wurde parallel zur *vielfältig*-mRNA auch das Protein Repo mittels eines Anti-Repo-

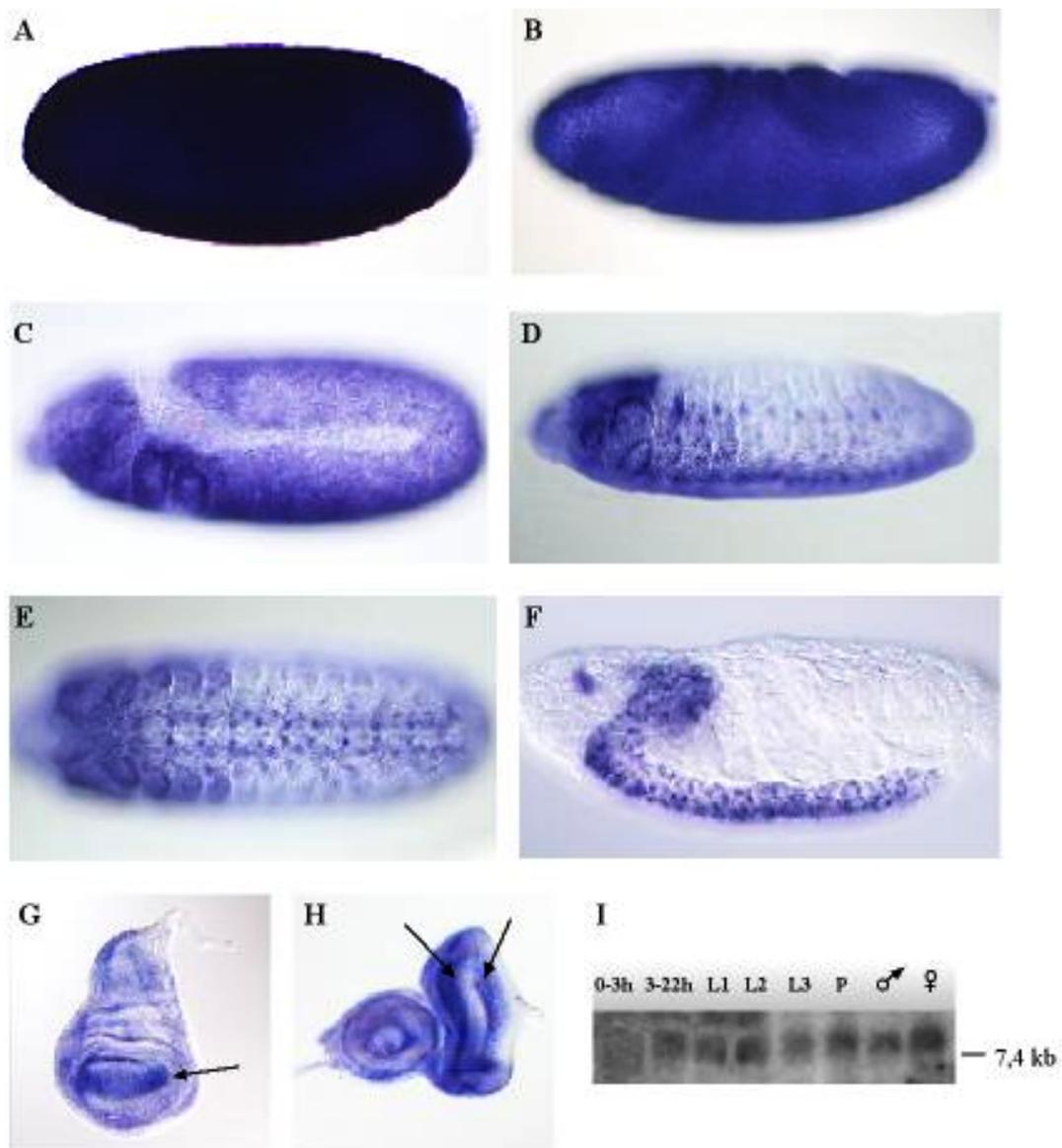


Abb. 17: Verteilung der mRNA von *vielältig*.

A) Stadium 4, ubiquitäre Verteilung der maternalen Transkripte im gesamten Embryo mit Ausnahme der Polzellen. B) Stadium 6, zygotische Expression zunächst ebenfalls ubiquitär, jedoch etwas schwächer ausgeprägt. C) Stadium 11, das mRNA-Muster wird im Verlauf der Entwicklung immer stärker auf die Ventralseite und die Kopffragmente restriktiert. D) Stadium 13, das zukünftige ZNS ist markiert, ausserdem werden kleine laterale segmentale Cluster erkennbar, möglicherweise die Bereiche der späteren Spirakel. E) Ventralansicht von D, nicht alle Zellen des sich entwickelnden ZNS exprimieren die Transkripte. F) Stadium 16/17, *vielältig*-mRNA in gepunktetem Muster im ZNS und Bolwig-Organ erkennbar. G) Flügelimaginalscheibe, Färbung vor allem im späteren Flügelrand (Pfeil). H) Augenimaginalscheibe, Transkripte unter anderem in der optischen Furche benachbarten Bereichen (Pfeile). I) Northern-Blot mit antisense RNA-Sonde, *vielältig* ist im gesamten Lebenszyklus von *Drosophila* exprimiert.

Antikörper nachgewiesen. Repo dient als Markerprotein für alle Gliazellen des ZNS (Xiong *et al.*, 1994). Eine Kolokalisation von Repo-Protein und *vielfältig*-Transkripten war nicht festzustellen (Abb. 18 A, B). Dies lässt den Schluss zu, dass *vielfältig*-mRNA in Nerven- und nicht in Gliazellen des ZNS akkumuliert wird. Allerdings ist die mRNA auch nicht in allen Nervenzellen des ZNS zu finden, was an anderen Doppelfärbungen mit einem Nervenzellmarker wie FasII (Grenningloh *et al.*, 1991) deutlich wird (Abb. 18 C, D). *vielfältig* wird also in einer Untergruppe von Neuronen, deren Identität noch näher charakterisiert wurde, exprimiert.

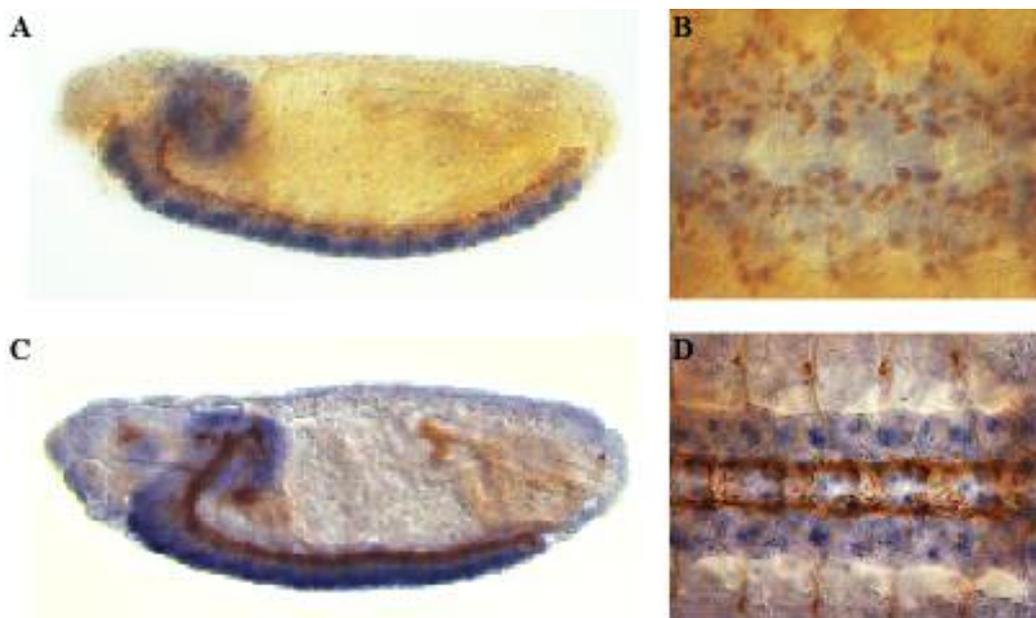


Abb.18: *vielfältig* ist nur in einem Teil des Zentralnervensystems exprimiert.

A+B) *vielfältig*-mRNA in blau, Repo-Protein in braun. *vielfältig* ist nicht in den Gliazellen des Zentralnervensystems exprimiert. C+D) *vielfältig*-mRNA in blau, FasII-Protein in braun. Die Transkripte sind nicht in FasII-positiven Zellen zu detektieren.

Mithilfe von konfokaler Mikroskopie und FISH (fluoreszenter *in situ* – Hybridisierung, Kap. 4.8) lässt sich eine genauere Verteilung bzw. Lokalisierung der *vielfältig*-mRNA darstellen. Die ubiquitäre Verteilung der Transkripte im Blastoderm-Stadium in Abb. 19A ist auf das Zytoplasma des

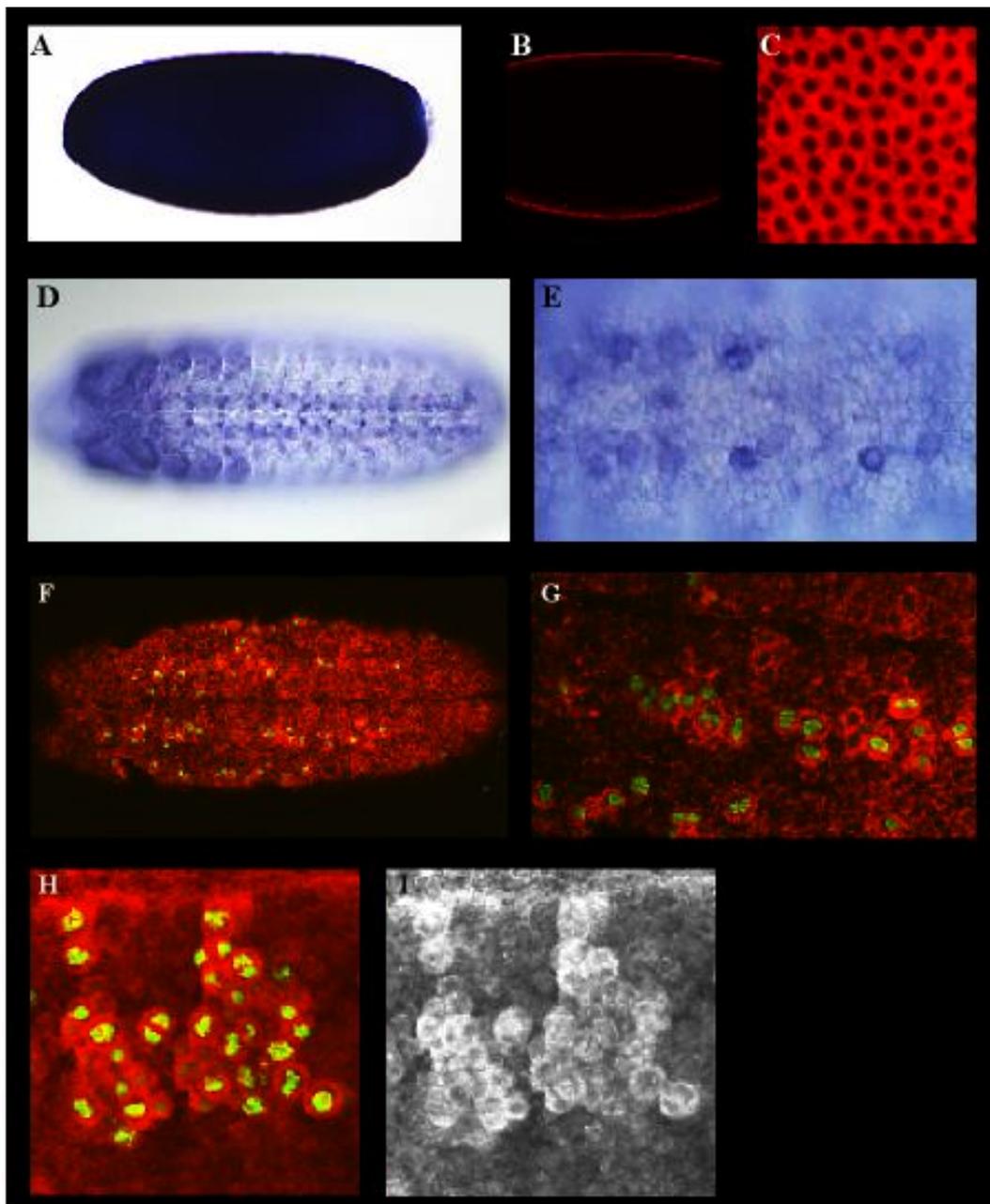


Abb. 19: Fluoreszente *in situ* Hybridisierung von *vielfältig*.

A) Ubiquitäre Verteilung der maternalen Transkripte mit Ausnahme der Polzellen.
 B+C) Mithilfe von konfokaler Mikroskopie lassen sich die Transkripte an der Oberfläche des Embryos lokalisieren, die Kerne werden ausgespart. D+E) Stadium 13, die m-RNA ist in einem gepunkteten Muster in einigen Zellen des ZNS zu sehen. F-H) *vielfältig* in rot, H3-P in grün. *vielfältig* ist in allen Zellen zu sehen, scheint jedoch in H3-P-positiven Zellen in größeren Mengen vorzuliegen. H) Ausschnittsvergrößerung eines Embryos in Stadium 13, die m-RNA ist verstärkt in mitotischen Zellen exprimiert. I) Transkriptnachweis von H) in schwarz/weiß-Darstellung, *vielfältig* ist deutlich in H3-P-positiven Zellen stark exprimiert.

Embryos beschränkt, was durch die fehlende Färbung des Dotterbereichs (Abb. 19B), des interplasmatischen Raumes und der Kerne (Abb. 19C) gezeigt werden kann.

In den Abbildungen 19D und 19E ist die *vielfältig*-mRNA in einigen Zellen des Zentralnervensystems akkumuliert. Mithilfe von *vielfältig*-FISH (Kap. 4.8) und dem parallelen Nachweis von phosphoryliertem Histon H3 lassen sich diese Zellen genauer beschreiben. Histone werden im Verlauf des Zellzyklusses durch unterschiedliche biochemische Reaktionen modifiziert (Patterton *et al.*, 1996). So liegt das Histon H3 im kondensierten Chromatin im phosphorylierten Zustand vor (Schmiesing *et al.*, 2000; siehe auch Einleitung Kapitel 1.4). Somit lassen sich mithilfe eines Antikörpers, der spezifisch phosphoryliertes Histone 3 erkennt, Zellen markieren, deren Chromatin kondensiert ist. Verwendet man den Anti-Phospho-H3-Antikörper als Marker für sich teilende Kerne, ist interessanterweise zu erkennen, dass *vielfältig*-mRNA in mitotischen Zellen stark akkumuliert ist (Abb. 19F-I).

2.4 Das Expressionsmuster des Vielfältig-Proteins

Das Vielfältig-Protein ist ähnlich wie die mRNA bereits sehr früh im Embryo mittels eines Antikörpers (Kap. 4.5) nachweisbar, jedoch erst ca. ab dem zehnten Kernteilungszyklus. Vielfältig ist deutlich in den Kernen des Blastodermstadiums erkennbar (Abb. 20A). Im Verlauf einer Kernteilung ist das Protein jedoch in Meta- und Anaphase nicht mit der DNA kolokalisiert, sondern liegt in benachbarten Strukturen vor. Mit Beginn der Telophase, wenn sich die Kernmembran neu gebildet hat, ist Vielfältig wieder klar im Kern lokalisiert (Abb. 20B). Dieser Wechsel zwischen Chromatin und angrenzenden Arealen im Verlauf des Kernteilungszyklusses lässt sich besonders anschaulich an Embryonen in Stadien des synzytialen Blastoderms beobachten. Zu diesem

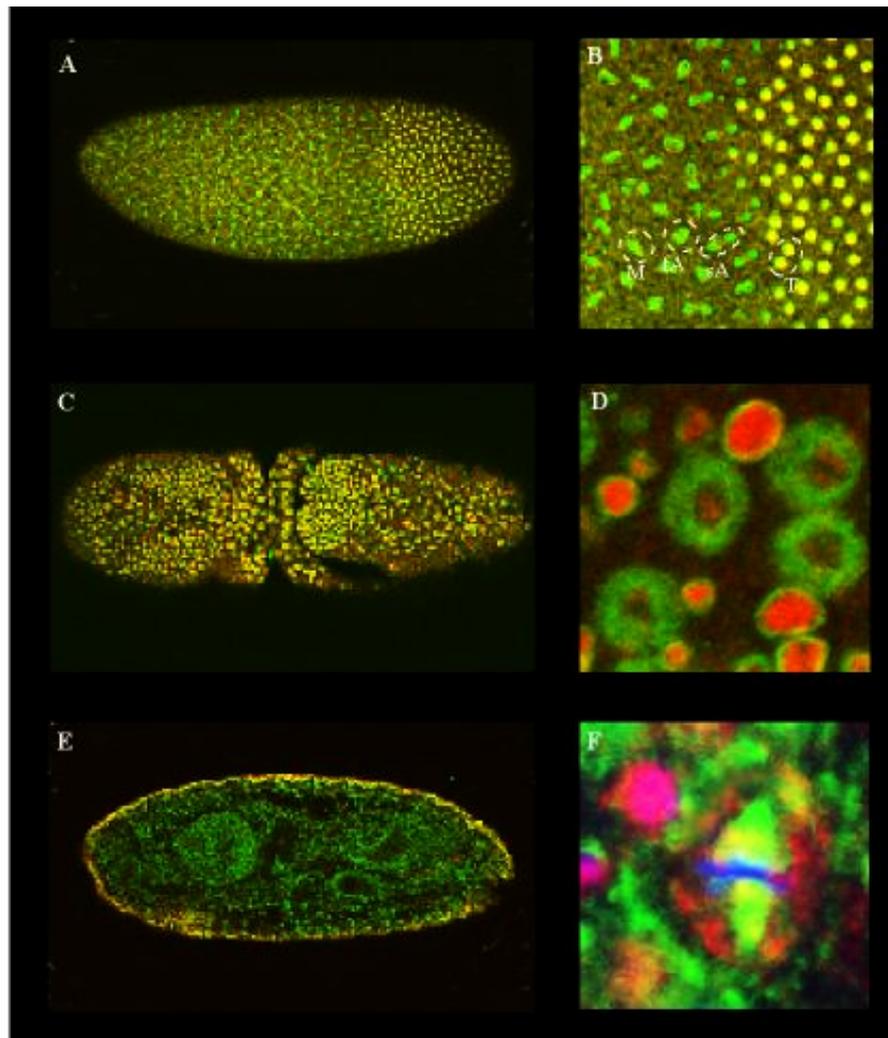


Abb. 20: Lokalisation von Vielfältig während der Embryogenese.

A-F) Wildtyp-Embryonen. In A-C, E) ist Vielfältig rot und DNA grün dargestellt. A) Vielfältig ist schon sehr früh im synzytialen Blastoderm-Embryo nachweisbar. Während der Teilungsphasen ist es nicht mit der DNA kolokalisiert, jedoch mit Beginn der Telophase ist das Protein wieder eindeutig im Kern nachweisbar. B) Ausschnittsvergrößerung aus A. C) Stadium 9/10, Dorsalansicht, Vielfältig ist in allen Interphase-Kernen des gastrulierenden Embryos im Kern zu erkennen, während der Kernteilung ist das Protein nicht an Chromatin gebunden. D) Stadium 9, ventrale Detailansicht, Vielfältig in rot, Lamin in grün. Mithilfe einer Anti-Lamin-Antikörperfärbung wird die Kernmembran markiert. Während der Kernteilung ist Lamin im Cytoplasma verteilt, Vielfältig-Protein verteilt sich innerhalb des früheren Kernbereiches. E) Stadium 16, Dorsalansicht. Auch in späten Stadien der Embryogenese ist Vielfältig noch nachweisbar, allerdings liegt es nur noch in allen Kernen der Epidermis vor. F) Stadium 9, laterale Detailansicht, Vielfältig in rot, DNA in blau, Tubulin in grün. Die DNA ist in der Metaphase maximal kondensiert, der Spindelapparat hat sich ausgebildet, Vielfältig verteilt sich im Bereich um den Spindelapparat, scheint aber nicht komplett zu diffundieren. Im Kern links oben ist Vielfältig im Kern zu erkennen.

M=Metaphase, fA=frühe Anaphase, sA=späte Anaphase, T=Telophase.

Zeitpunkt kann man in einigen Embryonen aufgrund einer leichten zeitlichen Asynchronie der Kernteilungen mehrere unterschiedliche Phasen der Mitose erkennen (Abb. 20A,B).

Im weiteren Verlauf ist das Protein ebenfalls in allen Kernen der Epidermis, die sich nicht gerade im Prozess der Teilung befinden, nachzuweisen (Abb. 20C). Am Ende der Embryogenese ist das Vielfältig-Protein in den Kernen des Ektoderms lokalisiert (Abb. 20E), obwohl die mRNA in diesen Stadien in Ektodermzellen nicht mehr nachweisbar ist. Diese Diskrepanz lässt auf ein stabiles Protein schließen.

Da Vielfältig während der Teilungsschritte nicht mit der DNA kolokalisiert ist, besteht die Möglichkeit, dass das Protein entweder in diesen Phasen in das Zytoplasma diffundiert oder im Kern degradiert wird.

Schaut man sich Embryonen an, in denen außer Vielfältig auch andere Komponenten dargestellt sind (Abb. 20D,F), lässt sich erkennen, dass das Protein nicht degradiert wird. Solange die Kernhülle intakt ist, lässt sich Vielfältig konzentriert im Kern nachweisen. Löst sich die Kernmembran jedoch während der Mitose auf, was bei *Drosophila* nur teilweise geschieht (Foe und Alberts, 1983), ist Vielfältig immer noch im Kernbereich nachweisbar, liegt aber in diffuserer Form vor (Abb. 20D). Betrachtet man die Verteilung in der Metaphase (Abb. 20F), so ist Vielfältig in der Nachbarschaft der Teilungsspindel nachweisbar.

2.5 Auswirkungen der ektopischen Expression von *vielfältig*

Oft führt nicht nur die fehlende Expression eines Genes zu einem Phänotyp, sondern auch die ektopische Expression kann häufig zu einer Fehlentwicklung führen. Da *vielfältig* aufgrund eines Misexpression-Screens durch ektopische Expression in bestimmten Zellen der Epidermis gefunden wurde und mithilfe

der EP-Element-Linie die Möglichkeit einer induzierbaren Expression gegeben war, wurde die Auswirkung ektopischer *vielfältig*-Expression in verschiedenen Geweben untersucht.

Exprimiert man *vielfältig* in einem Großteil des sich entwickelnden Nervensystems, d.h. in mehr Zellen als im Wildtypen, so wird eine korrekte Ausbildung des Nervensystems unterbunden (Abb. 21A-D). Es werden dann nur noch wenige Nervenzellen ausgebildet, welche oft auch in ihrer Morphologie nicht der des Wildtyps entsprechen. Außerdem lassen sich in diesen Embryonen Probleme beim Rückzug des Keimstreifs feststellen (Abb. 21C).

In den Larven von *Drosophila* befinden sich so genannte Imaginalscheiben, aus denen sich während des Puppenstadiums adulte Strukturen entwickeln (zur Übersicht: Bate und Martinez-Arias, 1993; Kap. 13). Exprimiert man Genprodukte ektopisch in diesen Imaginalscheiben, so lassen sich die Auswirkungen dieser Expression im adulten Tier beobachten. Im Falle von *vielfältig* kommt es zum Beispiel nach ektopischer Expression in den Flügelimaginalscheiben nach Kreuzung der EP-Linie mit einer *apterous*-Gal4-Linie zu starken Defekten (Abb. 21E-G): Die Flügel sind meist nicht flach, sondern ballonartig aufgebläht, d.h. die Epithelien der Dorsal- und Ventralseite des Flügels sind nicht miteinander verbunden. Desweiteren lassen sich auch Defekte in der Ausbildung von Flügelvenen und anderen Merkmalen der Flügel wie die Verteilung von Borsten in unterschiedlichen Kompartimenten des Flügels beobachten. Nach Expression von *vielfältig* in den Augenimaginalscheiben mithilfe von *eyeless*-Gal4 ist zu beobachten, dass ca. 75% der Fliegen, die das Gal4-Gen und das EP-Element tragen, gar nicht aus der Puppenhülle schlüpfen. Bei den Individuen, die sich zu adulten Fliegen entwickeln sind auch Abnormalitäten in den Augen zu finden: Die normalerweise zwischen den Ommatiden befindlichen Borsten sind oft nicht zu detektieren und die Ommatiden selbst scheinen nicht ganz die regelmäßige sechseckige Form des Wildtypen auszubilden (nicht gezeigt). Neben den hier exemplarisch vorgestellten ektopischen Expressionen wurden zusätzlich andere

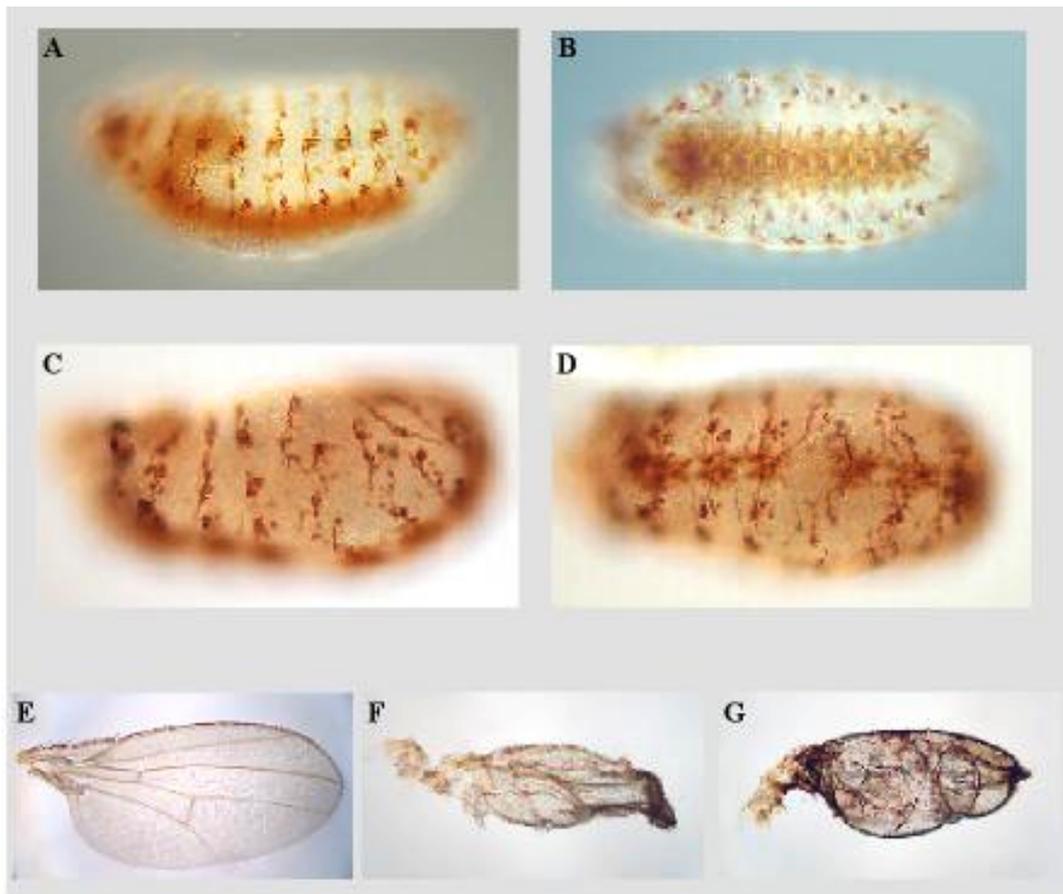


Abb. 21: Ektopische Expression von *vielältig*.

A+B) Wildtyp, Stadium 16, 22C10-Färbung. A) Lateralansicht B) Ventralansicht
 C+D) *ftzNG-Gal4::EP1344*, 22C10-Färbung. Der Keimstreif ist zwar noch nicht komplett zurückgezogen, aber aufgrund der Ausbildung des PNS befindet sich dieser Embryo wahrscheinlich in Stadium 15/16 der Embryonalentwicklung. Das gesamte Nervensystem ist in seiner Entwicklung stark beeinträchtigt, viele Nervenzellen scheinen vollständig zu fehlen. C) Lateralansicht D) Ventralansicht.

E) Wildtyp-Flügel. F+G) *apGal4::EP1344*, die Entwicklung der Flügel ist stark beeinflusst, meist sind ballonförmige Flügel zu beobachten, d.h. beide Flügelepithelien sind nicht miteinander verbunden.

Treiberlinien verwendet (siehe Kap. 4.2.3.1). Allgemein ließ sich feststellen, dass in den meisten Fällen starke Defekte in der Ausbildung der jeweiligen Gewebe beobachtet werden konnten. Dies deutet auf eine allgemeine Funktion von *vielältig* in sich teilenden Zellen hin.

2.6 Analyse der Kutikula von *vielfältig*-Mutanten.

Da die Integration von P-Elementen im 5'UTR von *vielfältig* (Abb.22) zu embryonaler Letalität führt, wurden die hemizygoten *vielfältig*-P-Elementmutanten Embryonen auf sichtbare Phänotypen hin untersucht, die möglicherweise auf die Funktion von *vielfältig* schließen lassen.

Da in diesen hemizygoten Embryonen allerdings nur die zygotische Expression beeinträchtigt ist, stellen sie aufgrund der starken maternalen Expression keine Nullmutanten dar, auch wenn die maternale Dosis aufgrund der Heterozygotie der Mütter reduziert ist. Dieses Problem ließe sich theoretisch mit dem Erzeugen von experimentell induzierten Keimbahnklonen mittels des FRT/FLP-Systems (Chou und Perrimon, 1996) umgehen. Da jedoch *vielfältig* sehr nah am Centromer des X-Chromosoms von *Drosophila* lokalisiert ist, stand keine geeignete FRT-Fliegenlinie zur Verfügung, die zur Identifikation der Schwesterklone eine Mutation des *ovoD*-Genes (Pauli *et al.*, 1995) trägt.

Einer der ersten beobachteten Phänotypen von *vielfältig*-P-Element-Mutanten war eine defekte Kutikula. In schlupffreien Larven der Linie PX 427 war eine Fusion von ventralen Kutikulazähnen-Bändern, eine Störung der Prozesse des Keimstreifrückzuges und der Kopfeinfaltung zu beobachten (Abb. 22 A,B). Außer Larven, die eine Mutation von *vielfältig* aufgrund der Insertion eines P-Elementes zeigen, wurden auch Embryonen erzeugt, bei denen *vielfältig*-Aktivität experimentell reduziert wurde.

Zu diesem Zweck wurde der Mechanismus der „RNA-interference“ (RNAi) genutzt. Es hat sich in verschiedenen Organismen gezeigt, dass doppelsträngige RNA (dsRNA) sequenzspezifisch die Translation einer mRNA unterbinden kann (Sharp, 2001). Im Falle von *Drosophila* wird die dsRNA (Kap. 4.9) durch Injektion appliziert (Kap. 4.10). Durch diese Methode können allerdings keine stabilen Mutationen generiert werden, d.h. die Phänotypen lassen sich nur an den jeweils injizierten Embryonen verfolgen und sie können unter anderem durch unterschiedliche Mengen an injizierter dsRNA mehr oder weniger stark

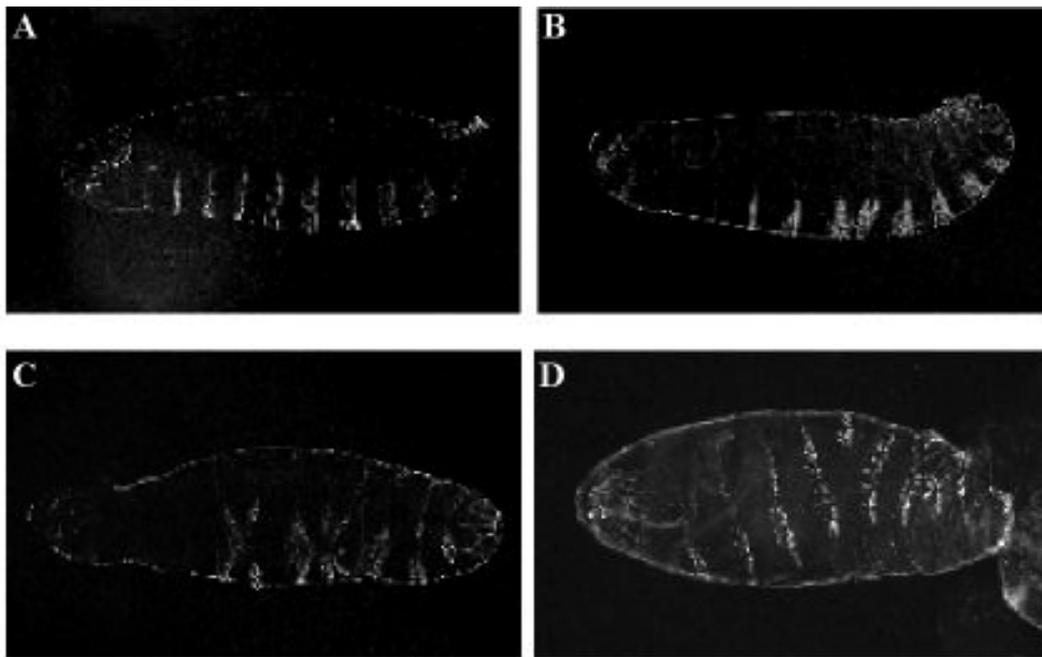


Abb. 22: Kutikula-Präparation von *vielfältig*-mutanten Embryonen.

A) Wildtyp. B) + C) PX 427, viele Embryonen zeigen einen unvollständig verkürzten Keimstreif, zwei oder mehrere Zähnchenbänder sind fusioniert, der Prozess der Kopfeinfaltung ist gestört. D) „RNAi-Embryonen“, denen dsRNA von *vielfältig* injiziert wurde, zeigen in einigen Fällen ähnliche Phänotypen wie die PX-Linien, einigen fehlen große Teile von Zähnchenbändern, jedoch der Großteil scheint gar keine Kutikula zu entwickeln.

variieren. Der genaue Wirkmechanismus ist bereits in vielen Ansätzen beschrieben (Tuschl *et al.*, 2001), aber noch nicht vollständig erklärt.

Kutikulapräparationen von schlupfreifen Larven, denen doppelsträngige *vielfältig*-mRNA in den ersten 30 Minuten der Embryonalentwicklung in der Nähe der Polregionen injiziert wurde (Kap. 4.10), zeigen außer den den P-Element-Mutanten ähnlichen Phänotypen von fusionierten Bändern auch stärkere Defekte wie das Fehlen von Zähnchenbändern und somit offenbar auch von ganzen Segmenten (Abb. 22C,D). Außerdem haben ca. 80% dieser Embryonen keine Kutikula ausgebildet, was auf einen sehr frühen Letalitätszeitpunkt solcher Individuen während der Embryogenese hindeutet.

2.7 Untersuchung der Anordnung von Zellkernen in *vielfältig*- Embryonen.

Wie in Abb. 2 der Einleitung dargestellt wandern die Zellkerne im plasmoidalen Zustand des frühen *Drosophila*-Embryos an die Oberfläche, wo sie sich in einer einkernigen Schicht anordnen. Schaut man sich die Kerne von *vielfältig*-P-Element-mutanten Embryonen im Blastoderm-Stadium mit unterschiedlichen Markern an, lassen sich mehrere Unregelmäßigkeiten in der Größe und Anordnung der Kerne erkennen. In den Abbildungen 23 A-C wird das Krüppel-Protein (Preiss *et al.*, 1985) mittels einer Antikörperfärbung nachgewiesen, wodurch einige Kerne des Embryos markiert sind. Im Wildtyp-Embryo (Abb. 23A) lässt sich gut die regelmäßige Anordnung von Kernen gleicher Größe in einer einzigen Schicht erkennen. Im Vergleich dazu scheinen die Kerne des *vielfältig*-Embryos (Abb. 23B,C) unterschiedliche Größe aufzuweisen und im Durchschnitt einen größeren Radius bei gleicher Vergrößerung als die Kerne des Wildtyps zu besitzen. In den Abbildungen 23B und 23C ist der gleiche Ausschnitt eines Embryos in zwei unterschiedlichen fokalen Ebenen dargestellt. In beiden Ebenen lassen sich Kerne erkennen, was darauf hinweist, dass die Kerne in diesem Embryo nicht in einer gleichmäßigen Monoschicht angeordnet sind.

In den Abbildungen 23D,E sind *vielfältig*-Embryonen mit einem Antikörper gegen das Crumbs-Protein (Tepass *et al.*, 1990) inkubiert worden, um eine mögliche Veränderung der apikal-basal-Ausrichtung von Epithelzellen zu untersuchen. In diesen Beispielen lässt sich erkennen, dass neben den Kernen an der Oberfläche der Embryonen Reihen von Zellen im Inneren lokalisiert sind. Da Crumbs in den apikalen Zellbereichen lokalisiert ist, sind nicht nur Kerne sondern auch die zugehörigen Zytoplasmen ektopisch im Inneren der Blastoderm-Embryonen lokalisiert. Eine Veränderung der apikal-basal-Ausrichtung der Zellen konnte nicht festgestellt werden.

Mithilfe von konfokaler Mikroskopie lassen sich in *vielfältig*-P-Element-Mutanten ebenfalls ein oder mehrere Einfaltungen in Blastoderm-Embryonen

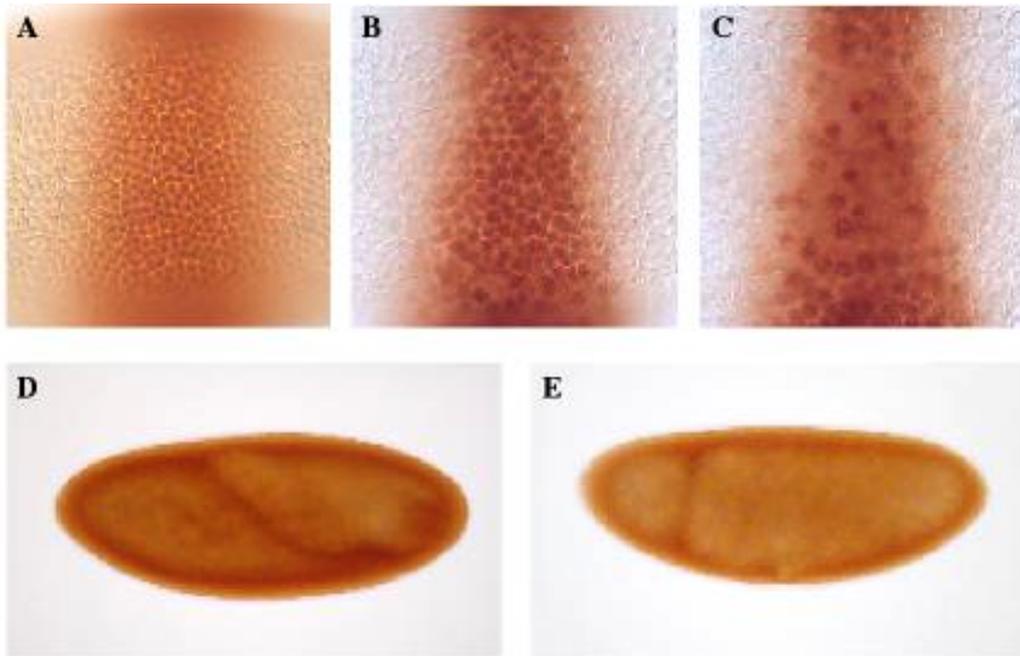


Abb. 23: In vielfältig-Blastoderm-Embryonen sind die Kerne unregelmässig angeordnet.

A) - C) Anti-Krüppel-Antikörperfärbungen, Stadium 4/5, lateraler Ausschnitt der Krüppel-Expressionsdomäne A) Wildtyp B) + C) PX 427, im Gegensatz zum Wildtypen sind in *vielfältig*-Embryonen die Kerne unregelmässig in ihrer Größe und Anordnung. In B) und C) ist der gleiche Ausschnitt eines Embryos in zwei verschiedenen fokalen Ebenen dargestellt. In beiden Ebenen sind Kerne zu erkennen. Dies zeigt, dass die Kerne nicht in einer gleichmäßigen Monoschicht vorliegen, möglicherweise bedingt durch eine Zunahme der Kerngröße.

D) + E) Anti-Crumbs-Antikörperfärbung, Stadium 5: Im Blastoderm-Stadium von *Drosophila* sind die somatische Kerne inklusive ihres individuellen Zytoplasmas in einer Schicht unterhalb der Oberfläche angeordnet. In *vielfältig*-mutanten Embryonen lassen sich zusätzliche Zellreihen innerhalb des Embryos erkennen, was hier mittels einer Antikörper-Färbung gegen das für Zellpolarität wichtige Protein Crumbs dargestellt ist, welches im apikalen Bereich epithelialer Zellen lokalisiert ist.

beobachten (Abb. 24A-C). Bei dieser Darstellung wird deutlich, dass offenbar die Oberfläche ins Innere des Embryos eingestülpt wird (Abb. 24C). Dies hat möglicherweise physikalische Gründe zur Ursache: Da viele Kerne unverhältnismässig groß sind, finden wahrscheinlich nicht alle Kerne einen Platz an der limitierten Oberfläche des Embryos (Abb. 24D). Wird der „Druck“ zu groß, weichen die Kerne an einer Stelle in das Innere zurück und ziehen aufgrund der Verbindung über Zytoskelett-Komponenten benachbarte Bereiche mit sich. In einigen älteren Embryonen lassen sich ebenfalls sehr große Kerne sowie Bereiche mit mitotischen Aktivitäten beobachten (Abb. 24E), wobei die

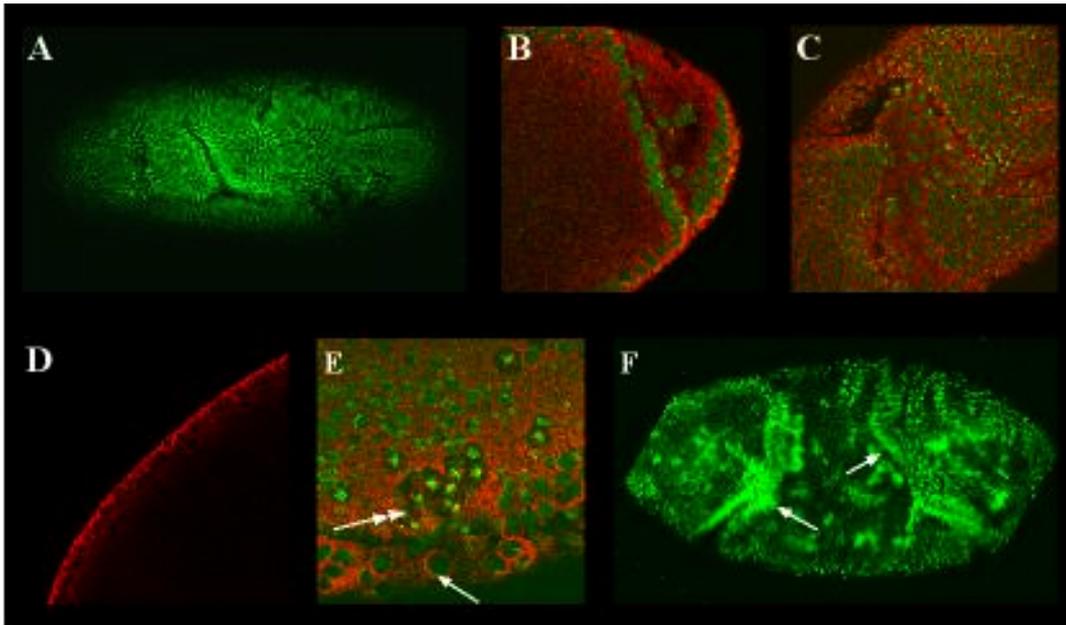


Abb. 24: vielfältig-Embryonen bilden ektopische Falten aus.

DNA in grün, Tubulin in rot. A-D) PX427. A) In homozygoten P-Element-mutanten Blastoderm-Embryonen von *vielfältig* lassen sich Einfaltungen der an Zellkernen reichen Oberfläche beobachten. B) Zusätzliche Reihen von Kernen sind deutlich, im Innern zu beobachten. C) In dieser Ausschnittsvergrößerung lässt sich gut erkennen, dass der normal an der Oberfläche liegende Verband von Kernen und Zytoskelett teilweise nach innen gestülpt wird. D) Dieser optische Querschnitt zeigt, dass der Platz an der Oberfläche des Embryos für eine gleichmäßige Verteilung in einer einzelnen Schicht nicht ausreichend zu sein scheint. E) Latero-ventrale Ausschnittsvergrößerung eines gastrulierenden Embryos. Sehr große Kerne (Pfeil) und ein Verband von sich teilenden Kernen, die scheinbar nicht durch Zytokinese voneinander getrennt sind (Doppelpfeil), sind in diesem Beispiel eines P-Element-mutanten Embryos zu beobachten. F) Der in A gezeigte Phänotyp lässt sich durch die Injektion des Antikörpers gegen Vielfältig kopieren. Der Embryo hat zwar bereits mit der Gastrulation begonnen, weist aber trotzdem zu viele Kerne im Inneren des Embryos auf (Pfeil).

Zellen nicht eindeutig durch Zytokinese voneinander getrennt werden. Um diesen „Einfaltungs-Phänotyp“ zu bestätigen bzw. um stärkere Effekte beobachten zu können, wurde der Anti-Vielfältig-Antikörper in Embryonen injiziert (Kap. 4.10). Der Antikörper bindet an das Protein und behindert es so in seiner Funktion. Der dem der P-Element-Mutanten ähnliche Phänotyp der ektopischen Einfaltung von Kernen in das Innere des Embryos wiesen diese Embryonen ebenfalls auf (Abb. 24F). Stärkere Effekte konnten mit dieser Methode nicht beobachtet werden.

2.8 Auswirkungen auf die Kondensation von Chromatin in *vielfältig*-mutanten Embryonen.

Wie bereits in Kapitel 2.3 erwähnt, lässt sich kondensiertes Chromatin mithilfe eines Antikörpers gegen phosphoryliertes Histon H3 erkennen.

Normalerweise liegen alle Kerne in fixierten Blastoderm-Embryonen entweder im gleichen Stadium des Kernteilungszyklusses vor oder man kann wie bereits erwähnt so genannte „mitotische Wellen“ erkennen, die über den Embryo laufen und somit eine mehr oder weniger zeitliche Abfolge der verschiedenen Mitosestadien erkennen lassen (Foe *et al.*, 1983; Abb. 25A). Als Folge lässt sich auch kondensiertes Chromatin abhängig vom Mitosestadium der einzelnen Kerne in einem Embryo in einer solchen Wellenbewegung erkennen (nicht gezeigt).

Bei P-Element-mutanten Embryonen von *vielfältig* lassen sich unterschiedliche Phänotypen erkennen. In vielen Fällen findet man Embryonen mit übergroßen Kernen und Arealen, in denen einige Kerne kondensiert sind und benachbarte nicht (Abb.25B). Die mithilfe des Anti-Phospho-HistonH3-Antikörpers markierten Kerne scheinen sich in dieser bildgebenden Darstellung morphologisch nicht von den übrigen Kernen zu unterscheiden, das heißt sie befinden sich nicht sichtbar im Prozess der Teilung, was sich zum Beispiel an einem Meta- oder Anaphasestadium erkennen ließe. Die kondensierten Zellen treten zwar in Verbänden von mehreren Kernen auf, aber es lassen sich an unterschiedlichen Stellen des Embryos mehrere dieser Cluster erkennen, was einer wellenförmigen Ausbreitung der Mitose widerspricht. In einigen anderen Fällen scheinen die „mitotischen Wellen“ nicht in horizontaler Richtung zu verlaufen. In Abbildung 25C ist eine „mitotische Welle“ gezeigt, welche auf einen Endpunkt zuläuft, der lateral zwischen Äquator und Pol des Embryos liegt. Es ist bei einem solchen Verlauf davon auszugehen, dass auch der Startpunkt nicht an einem der Pole lag. Solche Abweichungen im horizontalen Verlauf von „mitotischen Wellen“ in Blastoderm-Embryonen ist gelegentlich auch im Wildtypen zu beobachten, da der Ausgangspunkt dieser Wellen auch

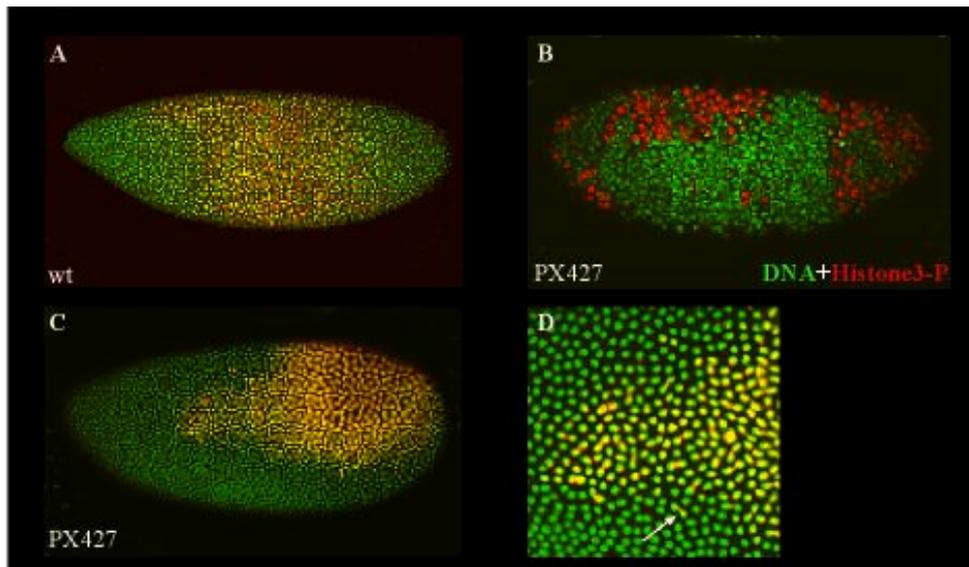


Abb. 25: Kondensation und Segregation von Chromatin sind beeinflusst in *vielfältig*-P-Element-mutanten Embryonen.

A-D) Blastoderm-Embryonen. A) „Mitotische Wellen“ ausgehend von den Polen zur Übersicht. B) In P-Element-Mutanten liegt die Verteilung von Phospho-Histon-H3 oft nicht in einer wellenförmigen Ausbreitung vor, sondern in einzelnen Zellen oder Clustern. C) In gezeigtem Embryo ist zwar eine „mitotische Welle“ zu beobachten, diese verläuft jedoch nicht horizontal. D) Ausschnitt aus C, manche Kerne bleiben nach der Teilung über Chromatinbrücken verbunden (Pfeil).

von äußeren Faktoren wie der Temperatur beeinflussbar ist (Foe *et al.*, 1993). In einer Ausschnittsvergrößerung (Abb. 25D) lassen sich jedoch auch andere Unregelmäßigkeiten bei der Kernteilung entdecken. So lassen sich in diesem Beispiel sehr dünne Chromatinbrücken (Pfeil) zwischen einigen der gerade getrennten Kerne nach Abschluß der Kernteilung erkennen (Abb. 25C,D). Zusammengefaßt zeigt es sich, dass in P-Element-Mutanten von *vielfältig* außer einer übermäßigen Größe der Kerne (siehe Kap. 2.7) auch Störungen im Kondensationsverhalten von Chromatin während des Blastodermstadiums zu beobachten ist. Diese Effekte scheinen im Zusammenhang mit Unregelmäßigkeiten in der Verteilung des Chromatins während der Kernteilung zu stehen. Durch Beeinflussung der Ausprägung der maternalen Komponente von *vielfältig* lassen sich diese Effekte genauer beobachten (Kap. 2.9).

2.9 Analyse von *vielfältig*-dsRNA behandelten Embryonen

Wie bereits erwähnt (Kap. 2.6) handelt es sich bei den *vielfältig*-P-Element-mutanten Phänotypen um zygotische Effekte. Das heißt die Embryonen sind mit maternaler mRNA ausgestattet, die zu Beginn der Entwicklung auch die Funktion von *Vielfältig* gewährleistet. Erst nachdem die maternalen Transkripte degradiert worden sind, werden die Auswirkungen des Fehlens zygotischer *vielfältig*-Aktivität erkennbar. Es ist somit davon auszugehen, dass man weitere bzw. stärkere Phänotypen erwarten kann, wenn neben der zygotischen auch die maternale Transkription unterbunden werden kann. Normalerweise lässt sich dieses Problem durch die Herstellung von Keimbahnklonen lösen (siehe Kap. 2.6), die im vorliegenden Fall nicht direkt zu erzeugen waren.

Um trotzdem die maternale RNA von *vielfältig* zumindest teilweise, in ihrer Aktivität zu limitieren, wurde der Mechanismus der „RNA-interference“ (RNAi) zur Herstellung von Phänokopien verwendet (siehe Kapitel 2.5). Im Fall von *vielfältig* lassen sich Defekte in den in Blastoderm-Embryonen stattfindenden Kernteilungen erkennen. In einigen Fällen sind die Kerne nach der Teilung immer noch über mehr oder weniger stark ausgeprägte Chromatinbrücken verbunden (Abb. 26A-C, Pfeil). Außerdem lassen sich Verbindungen von bis zu vier Kernen erkennen (Abb. 26A, Doppelpfeil), was möglicherweise durch eine erneute Teilung bereits verbundener Kerne bedingt ist.

Beobachtet man die Kernteilungen an lebenden Embryonen, denen *vielfältig*-dsRNA injiziert wurde und deren Histon 2A durch eine GFP-Fusion markiert ist (Abb. 26D-M), lässt sich in einigen Fällen feststellen, dass Kerne während der Anaphase auseinander weichen, aber stets durch eine Chromatinbrücke miteinander verbunden bleiben (Abb. 26K). Durch diese Verbindung scheint die vollständige Trennung der Schwesterchromatiden nicht mehr möglich zu sein, die beiden bereits voneinander gewichenen Chromatinanteile werden wieder zusammengeführt (Abb. 26L), so dass ein vergrößerter Einzelkern

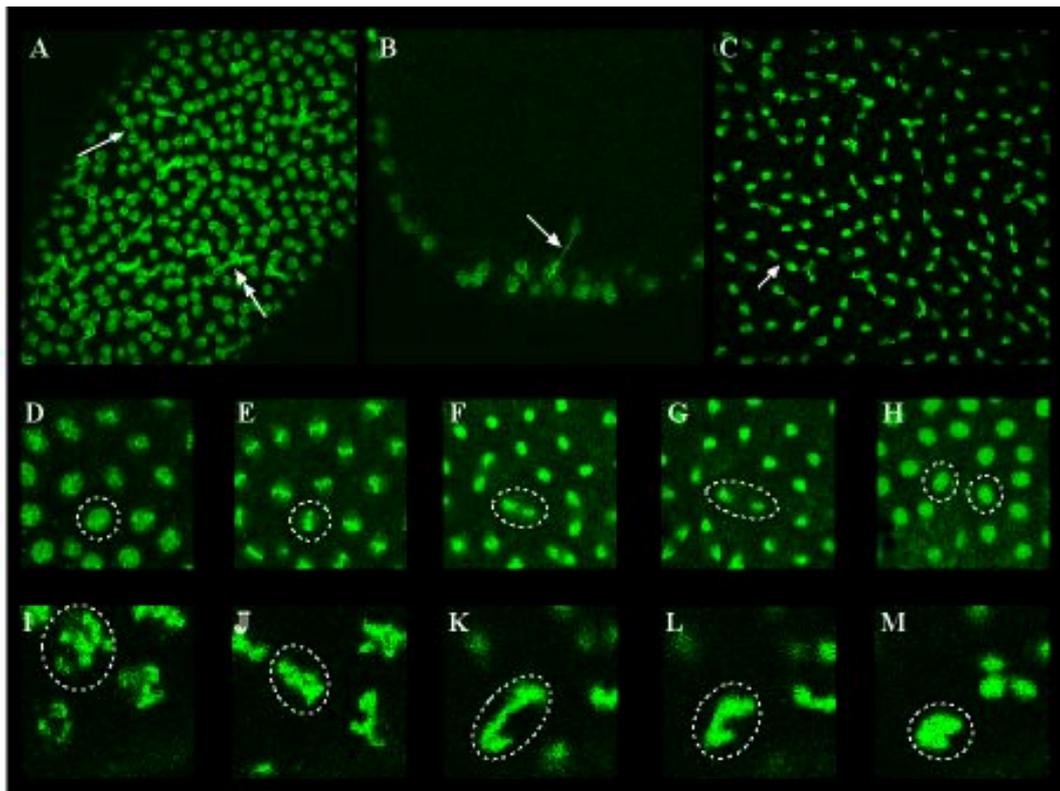


Abb. 26: In „*vielfältig*-RNAi-Mutanten“ ist die Segregation des Chromatins beeinflusst. A-C) *vielfältig*-dsRNA behandelte Wildtyp-Embryonen, DNA in grtn. Nach Injektion von doppelsträngiger *vielfältig*-RNA sind in Blastoderm-Embryonen, Kerne zu beobachten, die durch Chromatin-Brücken miteinander verbunden sind (Pfeile). Diese Kerne scheinen jedoch in der Lage zu sein, erneut in die Mitose einzutreten, wonach sich Verbände von mehreren Kernen ergeben können (Doppelpfeil). D-M) Timelaps-Aufnahmen an lebenden Embryonen. D-H) Embryonen mit Histon H2a-GFP-Fusion. I-M) *vielfältig*-dsRNA behandelte Histon H2a-GFP-Embryonen. D-H) Im Normalfall schließt die Kernteilung mit der kompletten Trennung des zuvor verdoppelten Chromatins in zwei separate Kerne ab. D) Prophase. E) Metaphase. F) Anaphase. G) Telophase. H) Interphase. I-M) Nach Injektion von ds-RNA wird das markierte Chromatin (I) nach Ausbildung einer Metaphase (J) in der Anaphase(K) zunächst teilweise voneinander getrennt, bleibt aber durch eine Chromatinbrücke stets verbunden. Nachdem die Aufrennung in die beiden Tochterkerne nicht erfolgen kann (L), werden die zuvor schon räumlich voneinander getrennten Chromatinanteile wieder zusammengeführt (M), so dass wieder ein Kern mit erhöhtem Chromatingehalt zu erkennen ist.

erhalten bleibt (Abb. 26M). In anderen Fällen scheinen sich Kerne nicht einmal teilweise zu trennen. Auf der Ebene des Blastodermembryos kommen „mitotische Wellen“ zum Stillstand und sehr stark vergrößerte Kerne sind aufgrund der teilweisen oder vollständigen vorangegangenen Replikation zu erkennen (nicht gezeigt).

2.10 Untersuchung der Inkorporation von BrdU in *vielfältig*-mutanten Embryonen.

In den Kapiteln 2.8 und 2.9 konnte gezeigt werden, dass durch die Beeinträchtigung des Genproduktes von *vielfältig* die korrekte Segregation des Chromatins während der Kernteilung beeinflusst wird. Dies ließe sich zum Beispiel durch eine unzureichende Kondensation des Chromatins aufgrund von Replikationsstörungen erklären. Eine unzureichende oder vermehrte Replikation der DNA in der Synthese-Phase kann die Verteilung der Schwesterchromatiden beeinflussen (Krause *et al.*, 2001). Um zu überprüfen, ob eine solche Störung in *vielfältig*-Mutanten vorliegt, wurden lebende Embryonen in einer Lösung mit dem Tymidin-Analogon 5-Bromo-2-desoxyuracil (BrdU) Minuten inkubiert (Kap. 4.9). Somit wurde in diesen Embryonen teilweise anstelle von Thymin das BrdU-Analog in die während der Replikation neu synthetisierte DNA eingebaut. Mithilfe eines Antikörpers, welcher spezifisch BrdU erkennt, konnte im Anschluss das eingebaute BrdU im Embryo nachgewiesen werden.

Im Blastoderm-Stadium sollte normalerweise die Inkorporation von BrdU aufgrund der schnellen sich wellenförmig über den gesamten Embryo ausbreitenden Kernteilungen (Abb. 27A) je nach Fixierungszeitpunkt in bestimmten Domänen bzw. im gesamten Embryo zu erkennen sein (nicht gezeigt). Bei P-Element-Mutanten von *vielfältig* finden sich nur vereinzelt Kerne im Embryo, bei denen eine große Menge an BrdU-Inkorporation zu detektieren ist (Abb. 27B), während in den meisten Kernen nur kleine Mengen von BrdU inkorporiert wurden. Die Kerne mit der geringen Menge an BrdU sind in der Lage sich zu kondensieren, was an der Detektion von Phospho-Histon H3 zu erkennen ist (Abb. 27 C, D). Im Gegensatz dazu lässt sich in den Kernen mit den großen Mengen an eingebautem BrdU keine phosphorylierte Form des Histons H3 erkennen.

Durch ektopische Expression von *vielfältig* sind (siehe Kap. 2.5) ebenfalls starke Defekte in der Embryonalentwicklung zu beobachten. In den

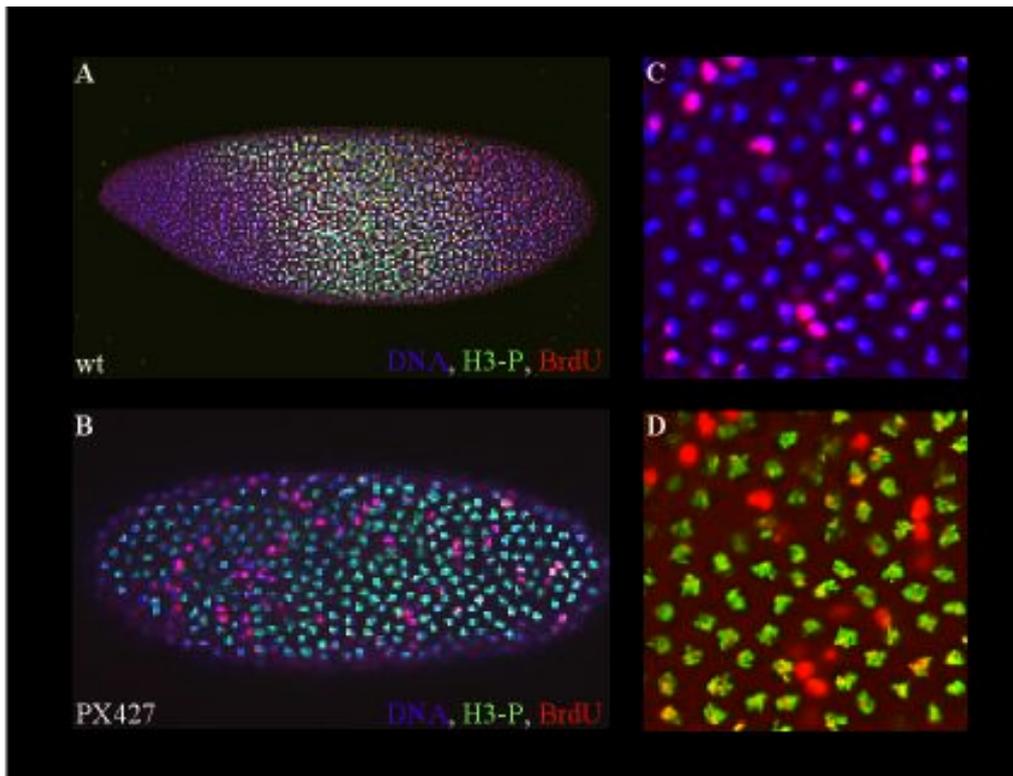


Abb. 27: P-Element-Mutanten von *vielfältig* zeigen eine erhöhte Replikationsaktivität.
 A-D) DNA in blau, H3-P in grün, BrdU in rot. A) Wildtyp-Embryo, „mitotische“ Welle. B) PX427; In einem sehr unregelmäßigen Muster lassen sich Kerne mit erhöhter Inkorporation von BrdU erkennen. C) Ausschnitt aus B, nur DNA- und BrdU-Färbung gezeigt. Die meisten Kerne zeigen geringe Inkorporation von BrdU, einige sind jedoch sehr stark markiert. D) Gleicher Ausschnitt wie in C, jedoch BrdU- und H3-P-Färbung gezeigt. Kerne mit hohen Mengen an BrdU zeigen keinen Marker für die Kondensation des Chromatins.

Abbildungen 28 A-F ist das Chromatin von Embryonen gezeigt, in denen *vielfältig* mit maternalen Treibern exprimiert wurde. Der Mitosemarker Phospho-Histon H3 ist in älteren Embryonen ähnlich wie im Blastoderm-Stadium (Abb. 25B) sehr unregelmäßig verteilt (Abb. 28 A,B), das Chromatin weicht in den meisten Kernen von der kreisrunden Form ab (Abb. 28C), die Größe der einzelnen Kerne variiert stark. Im Blastodermstadium lassen sich ebenfalls unregelmäßige Anordnungen der Kerne erkennen (Abb. 28D). Das scheinbare Fehlen von Kernen in diesem Stadium wird möglicherweise durch eine zu geringe Replikation verursacht. Inkubiert man diese Embryonen mit ektopischer Expression von *vielfältig* ausreichend lange mit BrdU, um im

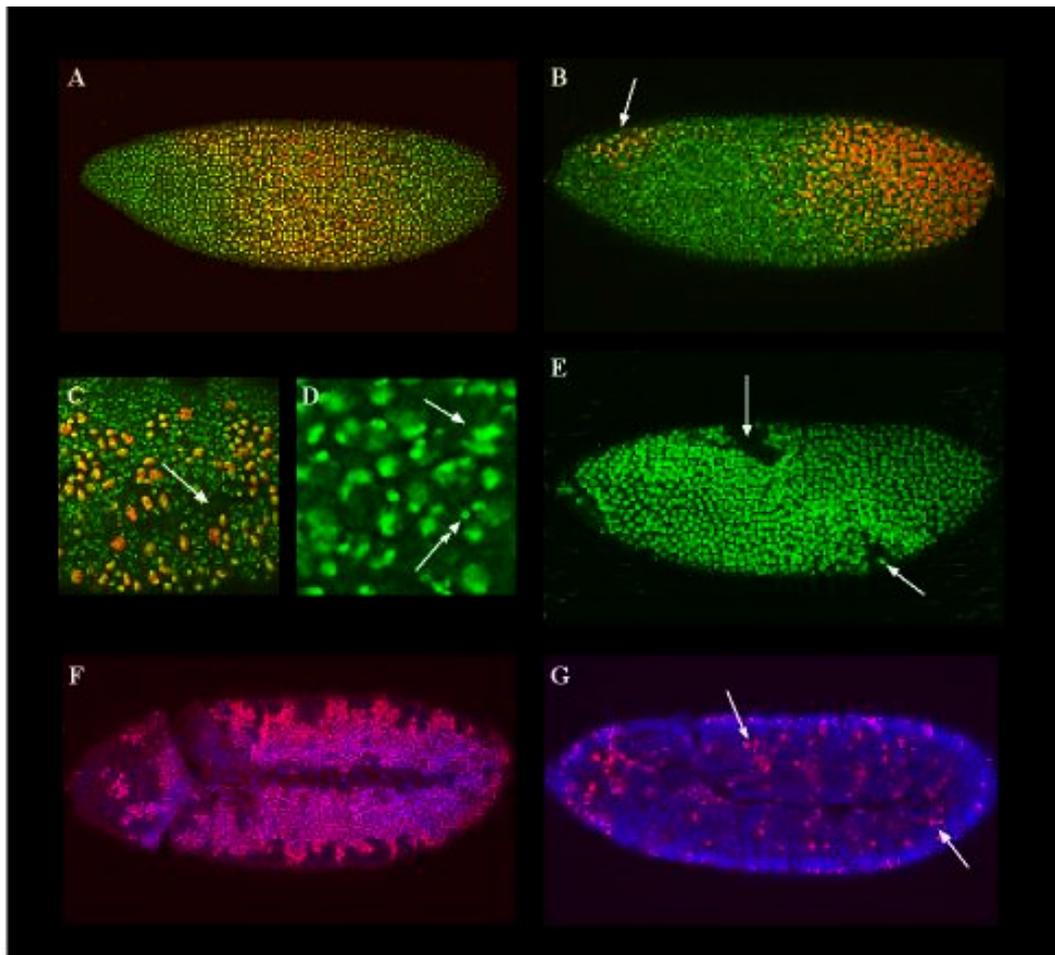


Abb. 28: Auswirkung der ektopischen Expression von *vielfältig* auf die Morphologie und Replikation des Chromatins.

A-C) DNA in grün, H3-P in rot. A) Wildtyp, mitotische Wellen ausgehend von beiden Polen, H3-P-markiertes Chromatin unterscheidet sich deutlich in seiner Morphologie von unmarkierter DNA. B-D) *nanos-Gal4::EP1344*. B) Eine mitotische Welle startet vom posterioren Pol, dorsal des anterioren Poles sind nur wenige Zellen mit H3-P zu sehen. Der in die DNA interkalierende Farbstoff zeigt keine klar voneinander abgegrenzten Kerne, das H3-P-markierte Chromatin ist nicht deutlich in seiner Morphologie von der unmarkierten DNA zu unterscheiden. C+D) Detailvergrößerungen eines Embryos Stadium 9. C) Die Neuroblasten in der Nachbarschaft der ventralen Mittellinie (Pfeil) zeigen den Marker für kondensiertes Chromatin. Es sind jedoch keine eindeutigen Teilungsphasen zu erkennen, die einzelnen Kerne unterscheiden sich morphologisch sehr stark. D+E) DNA in grün. D) In dieser stärkeren Vergrößerung sind deutlich die extrem unterschiedliche Ausprägung des Chromatins der einzelnen Kerne zu sehen, was von einer sehr kleinen runden Form (Doppelpfeil) bis zu sehr großen unförmigen Gebilden (Pfeil) reicht. E) *NGT40-Gal4::EP1344*, auch bei der ektopischen Expression von *vielfältig* mit diesem maternalen Treiber sind in einigen Fällen sehr frühe Effekte wie Lücken in der ansonsten gleichmäßigen Verteilung von Kernen an der Oberfläche von Blastoderm-Embryonen zu beobachten (Pfeile). F+G) DNA in blau, BrdU in rot. F) Verteilung des Einbaus von BrdU im Wildtypen, Stadium 10/11. G) *paired-Gal4::EP1344*, im Vergleich zum Wildtypen ist weniger Einbau von BrdU in die DNA zu beobachten. Lediglich in einigen Streifen zwischen den *paired*-Expressionsdomänen ist BrdU nachweisbar, aber auch diese Kerne zeigen eine unregelmäßige Form (Pfeile).

Blastoderm-Stadium zumindest eine komplette S-Phase zu durchlaufen, findet man im Anschluss nur geringe Mengen an inkorporiertem BrdU (Abb. 28E,F).

Durch ektopische Expression in späteren Stadien der Embryogenese lassen sich ebenfalls Defekte in der Inkorporation von BrdU beobachten, was in den Abbildungen 28 G und H am Beispiel des *actin*-Gal4-Treibers gezeigt ist. Vergleicht man diese Embryonen im Stadium der maximalen Keimstreifstreckung, ist im Wildtypen in vielen Zellen der Epidermis Replikation zu beobachten. Im Falle der ektopischen Expression von *vielfältig* sind zu diesem Zeitpunkt allerdings nur geringe Mengen an BrdU zu detektieren (Abb. 28G.H). Diese geringere Proliferation hat unter anderem auch Auswirkungen auf die Kopfentwicklung, was deutlich am Fehlen der Kopffalten zu erkennen ist.

3. Diskussion

Die Entwicklung zu einem lebensfähigen Organismus besteht aus einem Netzwerk komplizierter, ineinander greifender Prozesse. Die kontrollierte Teilung von Zellen spielt dabei eine ebenso wichtige Rolle wie das gerichtete Auswachsen von Zellen, Zellverbänden oder Synzytien. In der vorliegenden Arbeit wird ein Mutagenese-Screen zur Selektion von Faktoren des gerichteten Wachstums von Myotuben während der embryonalen Myogenese beschrieben und die Charakterisierung eines neuen in den Kernteilungszyklus involvierten Genes vorgestellt und diskutiert.

3.1 Können Faktoren des gerichteten Wachstums mithilfe eines Misexpression-Screens identifiziert werden?

Der in Kapitel 1.5 vorgestellte Misexpression-Screen macht sich das UAS/Gal4-System (Fischer *et al.*, 1988) zunutze. Durch Verwendung der *sr239 panGal4*-Linie konnten nach Kreuzung mit unterschiedlichen EP-Linien UAS-markierte Gene in Streifen an den Segmentgrenzen und in einem zusätzlichen intrasegmentalen Streifen exprimiert werden. In den meisten Linien, bei denen embryonale Letalität induziert werden konnte, ist wie zu erwarten das EP-Element in gleicher Orientierung vor oder im 5'-Bereich (57 Linien, 87%) eines ORF inseriert. Nur in wenigen Fällen ist das EP-Element in antisense-Ausrichtung (8 Linien, 13%) zum nächsten ORF integriert. Im Falle der gleichen Orientierung des EP-Elementes und eines naheliegenden Genes ist die teilweise oder vollständige ektopische Transkription dieses Genes zu erwarten. Dies konnte in vielen Fällen auch experimentell gezeigt werden (siehe Abb. 16 C, D) und erklärt das Auftreten der embryonalen Letalität sehr wahrscheinlich aufgrund einer „gain-of-function-Mutation“. Dass in einigen

Fällen der Phänotyp der embryonalen Letalität auch bei den Nachkommen der Kreuzungen des Treibers mit den EP-Linien, in denen das EP-Element in entgegengesetzter Orientierung zum nächstgelegenen Gen inseriert ist, zu beobachten ist, lässt sich theoretisch durch die Produktion einer antisense-RNA erklären, welche die endogene Genaktivität reduziert (Rosenberg *et al.*, 1985). Eine andere Möglichkeit besteht darin, dass EP-Elemente vielleicht auch in der Lage sind, die Transkription von Genen zu beeinflussen, die nicht unmittelbar in der Nachbarschaft der Insertionsstelle des EP-Elementes lokalisiert sind. Zu dieser Hypothese gibt es allerdings noch keine genaueren Untersuchungen. Festzuhalten ist jedoch, dass in einigen Kandidaten-Linien das EP-Element in der Nähe des 5'UTR einer Transkriptionseinheit inseriert ist, der ORF jedoch erst in einigen kb Entfernung beginnt. Somit könnten auch auf der Basis von „Open Reading Frames“ annotierte Gene (BDGP; GadFly, www.fruitfly.org/annot/index.html) weit entfernte UTR-Bereiche aufweisen, die in der Nähe einer EP-Element-Insertionsstelle liegen und als Transkriptionsstartpunkt dienen, jedoch noch unbekannt sind.

Die letalen Nachkommen der Kreuzungen wurden anschließend in Bezug auf das embryonale Muskelmuster untersucht. In ca. 75% der Fälle (51 Linien) waren Defekte, in der Myogenese zu erkennen. Diese waren oft (ca. 43%) mit weiteren Effekten im Embryo gepaart, so dass die Effekte bei den Muskeln sehr wahrscheinlich nicht primär, sondern in Folge anderer Defekte auftraten. Diese Beobachtung könnte darauf zurückzuführen sein, dass die ektopische Expression auch von allgemeinen, nicht organspezifischen Faktoren zu mutanten Effekten führt, die das Muskelmuster beeinflussen. So kodieren unter den ca. 72% bereits bekannten oder annotierten Genen (BDGP; GadFly, www.fruitfly.org/annot/index.html), die im Screen identifiziert wurden, der größte Teil (ca. 42% der Kandidaten-Gene) für allgemeine Regulatoren der Transkription und Translation, für Komponenten des Zellzyklusses und für unterschiedliche Enzyme (Abb.12). Bei der ektopischen Expression solcher Faktoren ist durchaus eine Störung, allgemeiner zellbiologischer Prozesse und folglich auch ein verändertes Muskelmuster durch die Beeinflussung der

korrekten Apodem-Entwicklung zu erwarten. Ziel des Screens war es jedoch, spezifische Faktoren der Myogenese zu identifizieren.

Unter den bereits bekannten Faktoren, die im Mutagenese-Screen identifiziert wurden, waren auch solche, deren Funktionen in Myogeneseprozessen beschrieben sind. So wurden zum Beispiel der Ornithine-Decarboxylase-Inhibitor Gutfeeling, dessen Mutanten Störungen in der Fusion von Myoblasten und der Differenzierung von Muskeln sowie Defekte in der Ausbildung des embryonalen Nervensystems aufweisen (Salzberg *et al.*, 1996), in diesem Screen gefunden. Außerdem befand sich der Rezeptor Toll unter den Kandidaten, dessen ektodermale Expression wichtig für die Differenzierung der Myotuben und Anheftung der Muskeln an die Apodeme ist (Halfon *et al.*, 1998). Dies lässt sich als starker Hinweis ansehen, dass sich unter den bisher unbeschriebenen Genen welche verbergen, die spezifische Prozesse während der Myogenese beeinflussen.

Inzwischen liegt die komplette Sequenz des Genoms von *Drosophila* (Adams *et al.*, 2000) vor und die Zahl der in den Datenbanken (BDGP, www.fruitfly.org) zugänglichen cDNA-Klone steigt kontinuierlich an. Damit wird die Beurteilung bezüglich der Spezifität und Funktion der Kandidatengene, ihrer Wirkung im Organismus und in zellulären Prozessen und somit auch der Gesamterfolg des vorgestellten Screens hinsichtlich der Primärwirkung der identifizierten Faktoren während der Myogenese zunehmend besser abschätzbar sein. Die vorliegenden Ergebnisse lassen derzeit den Schluss zu, dass neben der Sekretion von anlockenden oder abstoßenden Faktoren von Epidermiszellen auch andere Faktoren die Wegfindung der Muskeln beeinflussen. Die korrekte Differenzierung von Apodemzellen aus ihren Vorläufern in der Epidermis kann durch Störungen in Signalkaskaden, in enzymatischen Prozessen und der Ausbildung von Genprodukten durch Transkription und Translation behindert werden. Ein wichtiger Faktor ist auch die Kontrolle der epidermalen Zellproliferation bzw. des Zellzyklusses. Eines der Gene, die diesen Prozess betreffen, wurde im Rahmen der Arbeit näher charakterisiert.

3.2 *vielfältig*-mRNA ist in teilungsaktiven Zellen akkumuliert.

Zu Beginn der Entwicklung von *Drosophila* laufen die ersten Kernteilungsprozesse sehr schnell ab (Foe und Alberts, 1983), was nicht möglich wäre, wenn erst nach der Befruchtung alle benötigten Faktoren transkribiert würden. Auch muß beispielsweise bereits sehr früh die Achsendetermination des sich entwickelnden Embryos abgeschlossen sein, was zum Großteil schon vor der Befruchtung stattfindet (Nüsslein-Volhard, 1991).

Aus diesen Gründen ist es notwendig, schon vor der eigentlichen Embryonalentwicklung bestimmte Transkripte über die Oozyte ins Ei einzulagern, damit sie für die Embryonalentwicklung zur Verfügung stehen. Während der Oogenese produzieren die polyploiden Nährzellen (Mulligan *et al.*, 1985) diese benötigten Moleküle, welche über Zytoplasmaverbindungen zur Oozyte transportiert und dort eingelagert werden (Lin *et al.*, 1995).

vielfältig-mRNA gehört auch zu diesen maternal produzierten Transkripten, die bereits nach der Eiablage im Embryo zu detektieren sind. Da die Funktion von *vielfältig* wahrscheinlich im Zusammenhang mit dem Kernteilungszyklus steht, ist diese starke ubiquitäre maternale Expression verständlich, da gleich zu Beginn der Entwicklung 14 sehr schnelle Teilungszyklen im gesamten Embryo durchlaufen werden (Foe und Alberts, 1983). Die ersten Teilungen laufen in durchschnittlich ca. 8,5 Minuten (Foe *et al.*, 1993) ab und zeichnen sich durch das Fehlen einer G1- und G2-Phase aus. Ab dem zehnten Teilungsschritt verlangsamen sich die Kernteilungszyklen. So dauert der zehnte Zyklus ca. 8,8 Minuten (Foe *et al.*, 1983), die folgenden schon 12, 13 bzw. bis zu 17,5 Minuten (Warn und Magrath, 1982). Der anschließende 14. Zyklus ist der erste mit einer relativ langen Interphase (Foe *et al.*, 1993). Zu diesem Zeitpunkt findet auch die Zellularisierung der somatischen Kerne statt (siehe Kap. 1.1).

Nachdem die maternalen Transkripte von *vielfältig* ungefähr zum Zeitpunkt der Zellularisierung degradiert werden (nicht gezeigt), setzt die zygotische Expression des Gens zunächst ubiquitär ein. Im weiteren Verlauf der Entwicklung ist mithilfe sensitiver konfokaler Mikroskopie ein

Basaltranskriptionslevel in der gesamten Epidermis zu erkennen (Abb.19F-I), was evtl. auch durch eine unspezifische Hintergrundfärbung zu erklären wäre. Das hohe und deutlich detektierbare Expressionslevel beschränkt sich allerdings zunehmend auf das sich entwickelnde zentrale Nervensystem (Abb.17D-F). Durch Doppelfärbungen mit einem Antikörper, welcher phosphoryliertes Histon H3 (Goto *et al.*, 2002) erkennt, wird deutlich, dass es sich bei diesen Zellen mit erkennbar hoher *vielfältig*-Transkriptfärbung um mitotisch aktive Zellen handelt. Auch das Expressionsmuster der *vielfältig*-mRNA in Imaginalscheiben entspricht weitestgehend Bereichen mit mitotischen Aktivitäten (Audibert *et al.*, 1996).

Diese Befunde sind mit der Hypothese vereinbar, dass *Vielfältig* eine Rolle während des Zellzyklus von *Drosophila*-Zellen spielt und dass diese Rolle vor allem im Zusammenhang mit dem Prozess der Kernteilung zu sehen ist.

3.3 Die subzelluläre Lokalisation von *Vielfältig*-Protein ändert sich im Verlauf des Kernteilungszyklusses.

Vielfältig-Protein ist während der Oogenese nur in den Kernen von Follikelzellen und nicht in den Nährzellen zu detektieren (nicht gezeigt). Sollte *Vielfältig* beispielsweise eine Rolle als Inhibitor der Replikation spielen, ist die fehlende Lokalisation in den endoreplizierenden Nährzellen auch durchaus verständlich.

In jungen Embryonen ist *Vielfältig* ab dem 10. Kernteilungszyklus zu detektieren. Die ersten zehn Teilungszyklen sind durch einen schnellen Wechsel von S- und M-Phasen gekennzeichnet (Foe *et al.*, 1993). Zu diesem Zeitpunkt sind Kontrollfaktoren der G1- und G2-Phase, wie zum Beispiel Inhibitoren der Replikation, nicht notwendig. Außerdem muß erst die

Translation der maternalen *vielfältig*-mRNA stattfinden, da das Protein nicht maternal in die Oozyte eingelagert wird.

Wie in Kap. 3.2 ausgeführt verlangsamten sich die Teilungsschritte ab dem zehnten Zyklus zunehmend. Somit würde die Inhibition von übergangslosen Replikationszyklen ab dem zehnten Zyklus zunehmend notwendiger. Im Gegensatz zu den Transkripten scheint *Vielfältig* sehr stabil zu sein, da es in der Epidermis bis zum Ende der Embryogenese zu detektieren ist (Abb. 20E). In teilungsaktiven Zellen ist eine erneute Transkription und Translation von *vielfältig* notwendig, da in diesen Zellen das Genom verdoppelt wird und somit mehr Protein zur Inhibition benötigt wird. Ist die Teilungsaktivität komplett abgeschlossen, ist keine Neusynthese von *vielfältig*-mRNA mehr nötig, aber das Protein wird trotzdem in den Kernen zur Aufrechterhaltung des durch ihn verursachten teilungspassiven Zustand benötigt. Das Expressionsmuster des *vielfältig*-Gens während der Embryogenese und die Lokalisation des Proteins während der späten Interphase in den Kernen älterer Embryonen ist mit einer Funktion als direkter oder indirekter Inhibitor der Replikation vereinbar.

3.4 In *vielfältig*-mutanten Embryonen ist die Größe und Anordnung der Zellkerne gestört.

Aufgrund der zunehmend starken Akkumulierung von *vielfältig*-mRNA im ZNS wurde zu Beginn der Analyse die Ausbildung des Nervensystems in P-Element-Mutanten mit verschiedenen Nervenzellmarkern betrachtet (nicht gezeigt). In diesen Embryonen, denen die zygotische Expression von *vielfältig* fehlt und deren maternale *vielfältig*-Transkriptmenge möglicherweise aufgrund der Heterozygotie der Mütter reduziert ist, ließ sich allerdings nur ein stark reduziertes und degeneriertes Nervensystem feststellen. Aufgrund der Stärke dieser Effekte und auch anderer Beeinträchtigungen wie der oft sehr fehlerhaft

ausgebildeten Kutikula (Abb.22) konnte davon ausgegangen werden, dass der Nervensystemphänotyp sekundär war. Somit mussten die ursprünglichen Defekte in diesen Mutanten bereits früher in der embryonalen Entwicklung von *Drosophila* auftreten.

Mit Markern für die frühe Segmentierung von Embryonen konnten Defekte wie z.B. der teilweisen Fusion von Streifen des Expressionsmusters des Paarreglens *even-skipped* (Macdonald *et al.*, 1986) detektiert werden (nicht gezeigt). Markiert man einige an der Oberfläche von Blastoderm-Embryonen liegende Kerne mit einem Antikörper gegen das Lückengen *Krüppel* (Preiss *et al.*, 1985), so wird die unterschiedliche Größe von Kernen in *vielfältig*-mutanten Embryonen deutlich (Abb. 23 A-C). Diese Kerne unterscheiden sich außer in einer unterschiedlichen Größe auch morphologisch in dem Sinne voneinander, dass sie die normalerweise kreisrunde Form nur annähernd ausprägen. Dieser Befund lässt sich von den markierten Kernen auf den gesamten Embryo übertragen: Im Durchschnitt ist der Radius der Kerne in den Mutanten größer als der der Kerne in Wildtyp-Embryonen. Außerdem liegen diese Kerne nicht in einer Schicht unter der Oberfläche vor, was an der Detektion von Kernen in verschiedenen fokalen Ebenen der mutanten Embryonen deutlich wird. Dass dies möglicherweise auf den erhöhten Durchmesser der Kerne zurückzuführen ist, lässt sich auch durch einen anderen experimentellen Ansatz erkennen.

Inkubiert man mutante Embryonen mit einem Antikörper gegen das Crumbs-Protein (Tepass *et al.*, 1990), welches apikal in Epithelien lokalisiert ist, so lässt sich erkennen, dass ganze Reihen von Zellen auch im Inneren von Blastoderm-Embryonen vorliegen (Abb. 23 D, E). In diesem Stadium sollte sich allerdings nur eine einkernige Schicht unterhalb der Embryonenoberfläche befinden. Dieser Phänotyp lässt sich dadurch erklären, dass die Kerne in den ersten Schritten der Entwicklung in den Mutanten größer werden als im Wildtyp. Aus diesem Grund finden nicht mehr alle Kerne an der Oberfläche Platz und müssen aus physikalischen Gründen in das Innere des Embryos ausweichen. Im Verlauf des 14. Kernteilungszyklusses wird die größte Zahl

von Kernen im Blastoderm-Stadium an der Oberfläche angeordnet. Sind die Kerne im Durchschnitt nun größer als im Wildtyp, dann werden an Stellen, an denen der „Druck“ besonders stark ist, Kerne ins Innere des Embryos verschoben. Da die Energiden (Kern+zugehöriges Zytoplasma) in diesem Stadium durch eine Zellmembran voneinander getrennt und auch schon vorher über Zytoskelett-Komponenten in Kontakt standen, werden auch benachbarte Zellen mit in das Innere verlagert, was mithilfe konfokaler Mikroskopie deutlich erkennbar ist (Abb.24).

Dieser „Faltenphänotyp“ lässt sich durch die Injektion eines Antikörpers gegen das Vielfältig-Protein kopieren. Die Ausprägung einer Phänokopie des mutanten Phänotypes durch die Injektion des Anti-Vielfältig-Antikörpers ist schwächer als die durch Injektion von dsRNA. Dies lässt sich möglicherweise mit einer zu geringen Menge an injiziertem Antikörper erklären. Außerdem setzt in diesem Fall im Gegensatz zu RNAi, was ein effizienterer Mechanismus zu sein scheint, die Hemmung erst beim Translationsprodukt an. Wird das Protein nicht schnell genug vom Antikörper gehemmt, kann es seiner Funktion doch nachkommen und ist in diesem aktiven Zustand, nicht mehr vom Antikörper zu beeinflussen.

Die Ausbildung von größeren Kernen kann unter anderem vor allem durch Defekte in zwei unterschiedlichen Prozessen erklärt werden. Zum einen kann eine Abweichung des normalen Kondensationsgrades der DNA vorliegen, d.h. dass die DNA in der Interphase evtl. zu stark dekontensiert wird oder dass die Kondensation zu langsam bzw. unvollständig erfolgt. Zum anderen lassen sich größere Kerne auch durch eine erhöhte DNA-Menge erklären, die auf eine teilweise oder vollständige Endoreplikation zurückzuführen wäre. Auch in diesem Fall hätte dies Auswirkungen auf die Struktur des Chromatins.

3.5 *vielfältig* beeinflusst die Kondensation von Chromatin.

In der Interphase des Zellzyklusses liegt das Chromatin im dekontensiertem Zustand vor, um Replikations- und Transkriptionsprozesse an der DNA zu erlauben (Stack *et al.*, 2001). Während der Mitose ist das Chromatin stark kondensiert, um eine vollständige Trennung zuvor verdoppelter Schwesterchromatiden zu gewährleisten (Stack *et al.*, 2001). Um diese Kondensationsprozesse zu ermöglichen, werden verschiedene Faktoren des Chromatins im Verlauf des Zellzyklusses unterschiedlich modifiziert (Patterton *et al.*, 1996). Im kondensierten Zustand des Chromatins liegt beispielsweise das Histon H3 im phosphorylierten Zustand vor (Hans *et al.*, 2001). Mit einem Antikörper gegen die phosphorylierte Form von H3 lässt sich somit kondensiertes Chromatin detektieren.

Schaut man sich die DNA in Blastoderm-Embryonen von *vielfältig*-P-Element-Mutanten an, so lassen sich wie bereits erwähnt Abweichungen in der Morphologie und Größe im Vergleich zum Wildtyp erkennen. Der Marker für kondensiertes Chromatin ist in einigen der von *vielfältig*-Mutation betroffenen Kerne zu erkennen. Das Kernteilungsmuster ist nicht in einer mehr oder weniger horizontal verlaufenden Welle, sondern in einzelnen unabhängigen Clustern zu erkennen (Abb.25B). In dem gezeigten Beispiel sind die markierten Zellen in dieser Darstellung morphologisch nicht von den umliegenden Kernen zu unterscheiden, d.h. diese Kerne lassen sich zum Beispiel nicht mehr eindeutig als im Stadium der Meta- oder Anaphase befindlich erkennen. Dieser Effekt lässt Konformationsschwierigkeiten des Chromatins in den betroffenen Kernen vermuten. Allerdings kann nicht entschieden werden, ob die Kerne mit phosphoryliertem H3 evtl. ektopisch kondensiert sind bzw. sich nicht wieder dekontensieren lassen oder ob, im umgekehrten Fall, das Chromatin der umliegenden Kerne von der Wildtyp-Situation abweicht, indem es nicht in der Lage ist, kondensiert zu werden.

3.6 Die Segregation des Chromatins während der Mitose ist in *vielfältig*-dsRNA behandelten Embryonen stark beeinträchtigt.

Da die P-Element-Mutanten von *vielfältig* nur zygotische Mutanten sind und aufgrund der Lage des Gens im Chromosom keine direkte Möglichkeit der Herstellung von Keimbahnmutanten bestand, wurde durch die Anwendung der „RNAi-Technik“ (siehe Kap.2.6) versucht, die Aktivität der maternale, *vielfältig*-mRNA zumindest teilweise zu inhibieren.

Betrachtet man sich die DNA in mit dsRNA-injizierten Embryonen, so lassen sich häufig durch Chromatin-Brücken verbundene Kerne im Blastoderm-Stadium beobachten. In einigen Fällen stehen zwei Kerne nur durch einen dünnen Chromatinfaden in Kontakt, in anderen Beispielen sind bis zu vier Zellkerne miteinander durch Brücken verbunden. Diese Beobachtung lässt sich wahrscheinlich durch die Annahme erklären, dass zwei bereits unvollständig getrennte Kerne nochmals in die Mitose eintreten können, woraus sich ein solcher Verband ausbilden kann (Abb.26).

Mithilfe von Zeitraffer-Aufnahmen wurde das GFP-markierte Chromatin nach der Injektion von dsRNA an lebenden Embryonen im Vergleich zu unbehandelten Individuen beobachtet. Somit konnten weitere bemerkenswerte Beobachtungen gemacht werden. Es wurden mitotische Wellen in Blastoderm-Embryonen beobachtet, welche aufgrund der fehlenden Teilung von Schwesterchromatiden zum Stillstand kamen. In einigen dieser Kerne war anhand der zeitweiligen Morphologie zumindest der Versuch, eine Trennung einzuleiten zu beobachten (nicht gezeigt). Die meisten dieser Kerne zeigten nach der S-Phase keine Zellteilungs-Aktivitäten, so dass sie möglicherweise in einen Status der zumindest teilweisen Endoreplikation übergingen.

In anderen Beispielen zeigten Kerne den Eintritt in die Mitose durch Ausbildung von kondensierten Metaphase-Chromosomen. Nach Eintritt in die Anaphase blieben die Schwesterchromatiden jedoch teilweise miteinander verbunden, so dass keine vollständige Trennung erfolgen konnte und auch die

bereits voneinander getrennten Anteile sich wieder in einem großen Kern zusammenfanden.

Ein solcher die Segregation des Chromatins betreffender Defekt ließe sich durch folgende Ursachen erklären. Da in manchen Fällen nicht einmal der Übergang der Zellkerne in die Metaphase der Mitose zu beobachten war, lassen sich Anaphase-Defekte ausschließen. Somit haben die Kerne sehr wahrscheinlich bereits Schwierigkeiten bei der Kondensation des Chromatins. Dass Veränderungen im Kondensationsverhalten der DNA bereits in zygotischen P-Element-Mutanten zu beobachten waren, wurde bereits im vorangegangenen Abschnitt besprochen. Solche Defekte lassen sich zum einen auf Mutationen in direkt an der Kondensation beteiligten Komponenten des Chromatins wie beispielsweise dem Condensin-Komplex (siehe Einleitung Kap. 1.2; Bhat *et al.*, 1996; Steffensen *et al.*, 2001) erklären, andererseits besteht jedoch auch die Möglichkeit, dass die Kondensation des Chromatins durch Replikationsdefekte während der S-Phase erschwert wird. Daher wurde zum weiteren Verständnis der Effekte das Replikationsverhalten in *vielfältig*-Mutanten untersucht.

3.7 In *vielfältig*-Mutanten ist die Inkorporation von BrdU verändert.

Um das Replikationsverhalten von Zellen bzw. Kernen untersuchen zu können, besteht die Möglichkeit, markierte Nukleotide zum Einbau anzubieten und diese mithilfe eines Antikörpers zu bestimmen (Kap. 4.9). Je nach Länge der Inkubation während der S-Phase lässt sich das BrdU in allen Kernen nachweisen, die sich gerade im Prozess der Teilung befinden.

In *vielfältig*-P-Element-mutanten Embryonen ließen sich Kerne mit überhöhtem BrdU-Einbau neben Kernen mit einem normalem Level an BrdU-Einbau erkennen. Das Chromatin der Kerne mit den unverhältnismäßig großen

Mengen an BrdU lässt sich auch nicht mehr kondensieren (Abb.27). Dieser Befund korreliert mit dem Fehlen der phosphorylierten Form von Histon H3 (siehe 3.5).

Da die Färbung von Phospho-Histon H3 nur ein Marker für die Kondensation von Chromatin ist, besteht natürlich die Möglichkeit, dass lokale Kondensationsprozesse trotzdem in diesen Kernen stattfinden. Die Phosphorylierung von Histon H3 und die Bindung des Condensin-Komplexes (Hirano *et al.*, 1997) an die DNA werden vom gleichen Faktor reguliert (Giet *et al.*, 2001). Es ist also wahrscheinlich, dass zur Kondensation notwendige Elemente oder Faktoren in diesen Kernen fehlen oder nicht bzw. nur teilweise zum Einsatz kommen. Exprimiert man *vielfältig* ektopisch, so kommt es umgekehrt zu einer geringeren Replikationsrate (Abb.28H). Diese Ergebnisse legen den Schluß nahe, dass *vielfältig* indirekt über die Replikation oder direkt an der Kondensation des Chromatins beteiligt ist (Abb.28C). Ein über defekte Replikation verursachter Effekt auf Chromatinkondensation von *vielfältig* ist auch mit dem Befund in Einklang, dass mutante Replikationsfaktoren Kondensationsprobleme des Chromatins erzeugen können, wie für *Drosophila* an Mutanten von *Rfc* (Untereinheit 4 des Replikationsfaktor-C-Komplex) gezeigt wurde (Krause *et al.*, 2001). Betrachtet man die in „RNAi-Mutanten“ von *vielfältig* zu beobachtenden Phänokopie der fehlenden oder nur teilweise stattfindenden Segregation des Chromatins (Abb.26I-M) unter Berücksichtigung der veränderten Inkorporation von BrdU, so wird es sehr wahrscheinlich, dass diese Effekte tatsächlich auf eine erhöhte Replikationsrate in den betroffenen Kernen zurückzuführen sind.

3.8 Welche Funktion übernimmt Vielfältig während der Kernteilung?

Die Regulation von Kern- bzw. Zellteilungen ist vor allem während der Embryonalentwicklung eines Organismus von großer Bedeutung, da sich während dieser Phase aus einer einzelnen Zelle ein vielzelliges komplexes Individuum entwickeln muß. Die ersten Kernteilungen bei *Drosophila* laufen innerhalb weniger Minuten ohne Zytokinese ab (Foe *et al.*, 1993). Da in dieser Phase der Entwicklung keine Zeit für die Synthese von Transkripten bleibt (Edgar und O'Farrell, 1989), müssen die für die frühe Phase der Entwicklung notwendigen Genprodukte bereits maternal in die Oozyte eingelagert werden. Nach dem Übergang von synzytialen zu zellulärem Blastoderm finden in den meisten Geweben noch zwei weitere Mitosen zeitverschoben in bestimmten Clustern des Embryos statt (Foe *et al.*, 1993). Nur das embryonale Nervensystem bleibt während späterer Stadien der Embryonalentwicklung noch mitotisch aktiv (Hartenstein und Campos-Ortega, 1984).

vielfältig-Transkripte sind in allen teilungsaktiven Zellen des Embryos zu beobachten. Da sie ausschließlich in Zellen akkumuliert sind, in denen Histon H3 in phosphorylierter Form vorliegt, scheint das Genprodukt nicht zur Einleitung der Mitose benötigt zu werden. Würde das Vielfältig-Protein bereits zum Zeitpunkt der Initiation der Kernteilung benötigt werden, wäre nämlich eine Transkription von *vielfältig* bereits vor Eintritt in die Mitose zu erwarten. Auch dass das Vielfältig-Protein stabil in den Kernen nach ihrer Teilung noch zu beobachten ist, deutet eher darauf hin, dass es im Anschluss an die erfolgte Mitose benötigt wird. Möglicherweise besitzt es somit die Aufgabe, die Kerne in einen teilungsinaktiven Zustand übergehen zu lassen. Dieses Postulat wäre mit der Hypothese vereinbar, dass *vielfältig* die Replikation direkt oder indirekt inhibiert.

Kerne in *vielfältig*-P-Element-Mutanten zeichnen sich durch einen größeren Radius aus, was dann im Blastoderm-Stadium zu Ballungseffekten im Kortex und folglich zu Einfaltungen des Zellepithels führt. Mithilfe von

Pulsmarkierungen mit BrdU konnte gezeigt werden, dass dieser größere Durchmesser mit einer erhöhten Replikationsrate in diesen Kernen korreliert. In RNAi-Mutanten lassen sich starke Mitosedefekte beobachten, die von Kernverbindenden Chromatinbrücken bis zu einer völligen Unterlassung von Mitose reicht. Bei einem solchen Phänotypen bleibt jedoch die Frage, was die Ursache der Ausprägung ist. Einerseits besteht die Möglichkeit, dass das Chromatin Schwierigkeiten mit der korrekten Kondensation hat, da die Replikation vermehrt stattfindet. Andererseits könnte es evtl. auch zu einer erhöhten Replikationsrate aufgrund von *vielfältig*-abhängigen Konformationsänderungen im Chromatin kommen.

Die zweite Möglichkeit erscheint unwahrscheinlich. Denn würde Vielfältig erst nach einer Teilung benötigt, dann müßte es zur Dekondensation des Chromatins beitragen. Dies würde jedoch im Rückschluß heißen, dass durch ektopische Expression mehr dekondensiertes Chromatin und umgekehrt, bei Fehlen des Proteins, stärker kondensiertes Chromatin zu beobachten wäre. Dies konnte jedoch in beiden Fällen nicht bestätigt werden. Somit liegt es näher von der Annahme auszugehen, dass eine Störung in der Replikationsrate ursprünglich ist und dass dadurch in Folge das Kondensationsverhalten von Chromatin beeinflusst wird.

Das Vielfältig-Protein maternalen Ursprungs ist erst zu einem Zeitpunkt in den Kernen des Embryos zu detektieren, wenn diese an die Oberfläche wandern. Wäre Vielfältig wie postuliert in irgendeiner Weise an der Hemmung von Replikation beteiligt, dann wäre dieser Befund durchaus sinnvoll: Die ersten Teilungszyklen laufen schnellstmöglich ab, was durch die maternale Einlagerung von allen zur Teilung notwendigen Faktoren in die Oozyte gewährleistet wird (Edgar und O`Farell, 1989). Zu dem Zeitpunkt, an dem die Kerne an die Oberfläche wandern, sind jedoch die ersten Faktoren mehr oder weniger verbraucht bzw. limitiert (Edgar und O`Farell, 1989). Aus diesem Grund setzt nun die Translation ebenfalls maternal eingelagerter mRNA ein, was zur Folge hat, dass der Zellzyklus sich etwas verlangsamt, um diese Synthese zu ermöglichen. In diesem Stadium ist es somit zum ersten Mal

notwendig, die sofortige Replikation nach Abschluß der Kernteilung zu inhibieren. Die Kernteilungszyklen verlangsamten sich dadurch zunehmend, da bald auch die maternalen Transkripte degradiert werden und zygotische Transkription einsetzen muss. Die Transkripte von *vielfältig* sind in allen mitotisch aktiven Zellen zu finden. Dies ist mit der Annahme vereinbar, dass nach der Teilung neusynthetisiertes Protein zur Inhibition einer erneuten Replikation in beiden Tochterzellen benötigt wird. Ein weiterer Hinweis darauf, dass Vielfältig Replikation möglicherweise negativ reguliert, besteht darin, dass das Protein nicht in Kernen von endoreplizierenden Zellen zu finden ist, da in diesen keine entsprechende Inhibition benötigt wird.

Geht man nun von der Annahme aus, dass Vielfältig das Replikationsverhalten einer Zelle negativ reguliert, stellt sich die Frage über welchen Mechanismus eine solche Inhibition erfolgen könnte. Zur Beantwortung dieser Frage ist die Proteinstruktur von Vielfältig in erster Instanz nützlich. In der Aminosäuresequenz dieses Proteins sind außer einem Kernlokalisierungssignal sechs Zinkfinger-Motive, zwei einzelne Motive N-terminal und ein Cluster von vier Fingern C-terminal auffallend (Abb. 16B). Bei diesen Zinkfinger-Motiven (Abb.29) handelt es sich um den so genannten C₂H₂-Typ (Iuchi, 2001), welcher bei dem Transkriptionsfaktor TFIID aus *Xenopus*-Oozyten erstmals beschrieben wurde (Brown et al., 1985; Vrana et al., 1988). Neben einer DNA-bindenden Wirkung (Stanojevic et al., 1989) dieses Motivs gibt es allerdings auch Beispiele für die durch Zinkfinger vermittelte Bindung von anderen Proteinen (Rodgers et al., 1996) oder von RNA (Friesen et al., 2001). Durch Röntgenstrukturanalyse und den Vergleich DNA-bindender Zinkfinger ist es möglich, etwas über das theoretische DNA-Bindungsverhalten einiger Zinkfinger-Motive auszusagen (Choo und Klug, 1997).

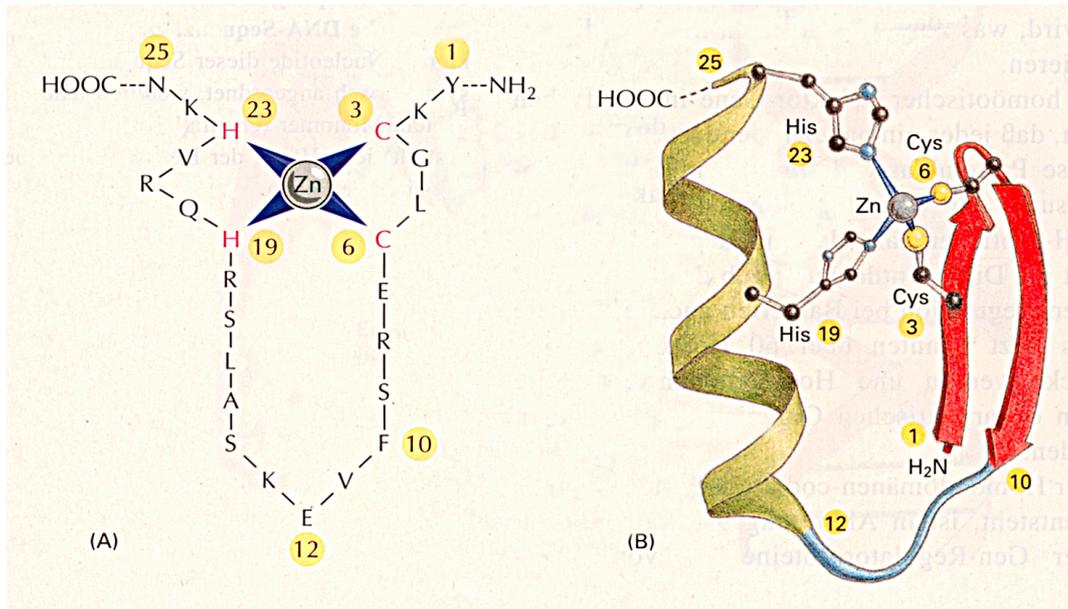


Abb. 29: Schematische Darstellungen des C_2H_2 -Zinkfinger-Motivs.

A) Beispielhafte Aminosäuresequenz eines Zinkfinger-Motivs. **B)** Über die Bindung des Zink werden β -Faltblatt und α -helikale Strukturen des Zinkfingers miteinander verbunden (nach Alberts *et al.*, 1995).

In Vielfältig können die Zinkfinger fünf und sechs laut Vorhersage sehr wahrscheinlich an DNA binden, da es sich um so genannte Zinkfinger der EGR-Familie (Early-growth-response) handelt (Sukhatme, 1990), die in *Drosophila* beispielsweise in dem Transkriptionsfaktor *stripe* vorkommen (Frommer *et al.*, 1996). Anhand von bestimmten konservierten Aminosäuren innerhalb der α -Helix dieser Zinkfinger-Domänen lässt sich sogar postulieren, dass Vielfältig mit seinen am weitesten C-terminal lokalisierten Zinkfingern theoretisch an die Sequenz 5'-G/A-G-G-G-C-X-3' (S. Böhm, persönliche Mitteilung) binden kann. Da eine solche Sequenz sehr häufig im Genom von *Drosophila* vorkommt, sind mit Sicherheit noch weitere Sequenzinformationen und Faktoren notwendig, um eine spezifische Bindung zu gewährleisten.

Die Wahrscheinlichkeit ist also sehr hoch, dass Vielfältig an DNA binden kann. Außer dieser DNA-Bindung können die anderen Zinkfinger möglicherweise die Bindung an andere Proteine vermitteln. Es ist sehr wahrscheinlich, dass

Vielfältig zwar an die DNA bindet und dann, wie in den meisten Fällen, mit anderen Proteinen komplexiert. Als ein Beispiel für eine solche Interaktion lässt sich das Zinkfinger-Protein Schnurri anführen, welches außer DNA auch den Transkriptionsfaktor Smad direkt binden kann (Dai *et al.*, 2000).

Die Frage ist damit, in welcher Funktion Vielfältig an die DNA bindet, d.h. ob das Protein als Transkriptionsfaktor oder Chromatinkomponente fungiert. Wie bereits erwähnt, setzt die zygotische Transkription in *Drosophila* nicht unmittelbar nach der Befruchtung, sondern erst nach den ersten Teilungszyklen im Blastoderm-Embryo ab Zyklus 10 ein (Edgar und Schubiger, 1986). Zuerst fängt die Transkription von tRNA, rRNA und Histon-mRNA an, erst ab dem 14. Zyklus ist auch ein hohes Transkriptionslevel von Nichthiston-mRNA zu beobachten (Edgar und Schubiger, 1986). Diese Beobachtungen machen das Vorkommen von Transkriptionsfaktoren zu einem solch frühen Zeitpunkt zwar unwahrscheinlich, es kann jedoch aber auch nicht ausgeschlossen werden.

Auf der anderen Seite besteht natürlich auch die Möglichkeit, dass Vielfältig an die DNA bindet, um dadurch eine Modifikation der DNA zu bewirken, die die erneute Replikation verhindert. Zum Beispiel könnte durch die Bindung an die DNA die Bildung des 'Origin-Recognition-Complex' (Gossen *et al.*, 1995) inhibiert werden. Da während der Kernteilung aufgrund der starken Kondensation des Chromatins die Replikation sowieso inhibiert wird, kann Vielfältig in dieser Phase von der DNA dissoziieren und erst wieder nach Abschluß der Teilung, wenn sich das Chromatin wieder dekondensiert, an seine Zielsequenz an der DNA binden. Ein Hinweis, dass es sich bei Vielfältig um eine Chromatinkomponente handelt, besteht in der Beobachtung, dass das Protein auch nach Abschluss der Replikation in den Kernen der Epidermis zu beobachten ist. Dies würde bedeuten, dass Vielfältig möglicherweise als ständige Komponente in Kernen der Epidermis benötigt wird. Ein Fehlen des Proteins in Kernen anderer Gewebe ist evtl. durch die Expression anderer Faktoren gleicher Funktion in diesen Geweben zu erklären.

Die genaue Funktionsweise von Vielfältig bleibt Gegenstand zukünftiger Untersuchungen. Möglicherweise lassen sich Faktoren finden, die mit

Vielfältig interagieren. Falls deren Funktion bereits bekannt ist, wird der Wirkmechanismus von Vielfältig, möglicherweise auch die Regulationskaskade, transparenter werden. Außerdem wäre eine Untersuchung der Auswirkungen von sowohl überaktiviertem Vielfältig als auch dessen Reduktion auf Faktoren der Replikation, der Kondensation von Chromatin und des Zellzyklusses von Interesse. Allerdings bleibt aufgrund der bisher untersuchten vielfältigen Phänotypen von *vielfältig* die Differenzierung zwischen primären und sekundären Effekten auch in Zukunft komplex, es sei denn, es werden Interaktoren identifiziert, die Aufschluss über eine direkte Funktion von *vielfältig* geben.

4. Material und Methoden

4.1 Stammhaltung und Anzucht von Bakterien

Zur langfristigen Stammhaltung wurden zu gleichen Teilen eine Bakterien-Übernachtskultur und sterilfiltrierte Glycerinlösung (96%) vermischt und in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. In dieser Form können die Bakterien bei -80°C gelagert werden.

Für eine kurzfristigere Stammhaltung von mehreren Monaten wurden die Bakterien auf LB-Agar-Platten ausgestrichen, welche außerdem das Antibiotikum enthielten für welches die Bakterien eine Resistenz besitzen (Ampicillin: 100 µg/ml, Kanamycin: 50 µg/ml). Nach schüttelnder Inkubation über Nacht bei 37°C können die Platten bei 4°C gelagert werden.

Die Anzucht benötigter Bakterien erfolgte durch animpfen von 3 ml LB-Medium (Lurie-Bertani-Medium) mit jeweils einer Einzelkolonie bzw. 500 µl einer Vorkultur und schüttelnder Inkubation bei 37°C über Nacht. Bei antibiotikaresistenten Stämmen wurde ebenfalls das jeweilige Antibiotikum zum Inkubationsansatz hinzugefügt.

4.1.1 Bakterienstämme

E. Coli DH5α: *supE44, lacU169(80lacZDM15)hsdR17, recA1, endA1, gyrA96, thi-1, relA1*

E. Coli LE392: *supE44, hsdF58, hsdR514, galK2, T22, medB1, trpR55, lacY1*

TOP10: *FmrcA, (mrr-hsdRMS-mrcBC), 80lacZ M15, lacX74, recA1, deoR, araD139D(ara-leu)7697, galU, galK, rspL, (Str^R), endA1, nupG*
(TOPO-TA-Cloning, Invitrogen)

4.1.2 Herstellung chemisch kompetenter Zellen

RF1:	100 mM RbCl 50 mM MnCl ₂ 30 mM Kac 10 mM CaCl ₂ × 2H ₂ O 15% Glycerin pH 5,8	RF2:	10 mM MOPS 10 mM RbCl 75 mM CaCl ₂ × 2H ₂ O 15% Glycerin pH 6,8
-------------	--	-------------	---

Zur Herstellung chemisch kompetenter Zellen wurden zunächst alle verwendeten sterilen Materialien auf 4°C gekühlt.

50 ml LB-Medium wurden mit einer Einzelkultur des gewünschten Bakterienstammes inokuliert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden 400 ml LB-Medium mit 10 ml der Übernachtskultur angeimpft und bei 37°C bis zu einer OD_{600nm} = 0,3 - 0,5 inkubiert. Nach Erreichen der gewünschten Optischen Dichte wurde die Kultur im Eisbad abgekühlt und in 50 ml Falconröhrchen aufgeteilt. Nach 12 minütiger Zentrifugation bei 5000 rpm wurden die entstandenen Pellets in je 16,5 ml eiskaltem RF1-Puffer aufgenommen. Anschließend wurde nach 20 minütiger Inkubation bei 4°C erneut zu den gleichen Bedingungen zentrifugiert. Die Pellets wurden in je 4 ml eiskaltem RF2-Puffer aufgenommen und für 15 Minuten bei 4°C inkubiert. Die Suspension wurde in Aliquots zu je 100 µl oder 200 µl aufgeteilt, in flüssigem Stickstoff eingefroren und konnten so bei -80°C gelagert werden.

4.2 Stammhaltung und Anzucht von *Drosophila melanogaster*

Maisgriesagar	60 % Maisgries 7,15 % Fruktose 1,2 % Trockenhefe 0,14 % Nipagin 0,6 % Propionsäure 0,7 % Agar
---------------	--

Die Fliegenzucht erfolgte in Plastikröhrchen unterschiedlicher Größe, welche einige cm hoch mit Maisgriesagar gefüllt wurden. Zur Ernährung der Fliegen wurden außerdem einige Körnchen Trockenhefe zugegeben. Nach Überführung der Fliegen in diese Flaschen wurden die Röhrchen mit Ceaprenstopfen verschlossen und bei 18 bzw. 25°C gelagert. Ca. alle zwei bis vier Wochen je nach Temperatur wurden die Fliegen in neue Flaschen umgesetzt.

Beim Ansetzen von Kreuzungen bzw. zur Auswahl bestimmter Individuen wurden die Fliegen kurzfristig mit CO₂ betäubt.

4.2.1 Sammeln von Embryonen für immunhistochemische Färbungen

Apfelsaftagar	25 % Apfelsaft
	1,25 % Saccharose
	2,5 % Trockenhefe
	0,2 % Nipagin
	2,7 % Agar

Zur Eiablage wurden die Fliegen auf mit Apfelsaftagar gefüllte Petrischalen gesetzt, deren Oberfläche mit einer Spatelspitze frischer Hefe bestrichen war.

Wurde ein bestimmtes Alter der Embryonen benötigt, ließ man die Fliegen für bestimmte Zeit ablegen. Den Embryonen konnte anschließend bei entsprechender Temperatur für gewünschte Zeit eine weitere Entwicklung ermöglicht werden.

4.2.2 Sammeln von Embryonen zur Präparation von RNA

Um eine möglichst große Anzahl von Embryonen zu erhalten, wurden möglichst viele Fliegen in einen großen Flugkäfig gesetzt. Zum Sammeln der Embryonen wurden mit Apfelsaftagar gefüllte Styroporschalen in den Käfig gestellt, zur Nahrung diente mit Wasser angerührte Trockenhefe, welche auf Whatman-Papier gestrichen wurde.

Nach erwünschter Entwicklungszeit wurden die Embryonen mit einem Gummispatel von den Ablageschalen in Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und in flüssigem

Stickstoff tiefgefroren. Bis zur Präparation der RNA konnten die Embryonen bei -20°C gelagert werden.

4.2.3 Ansetzen von Kreuzungen von *Drosophila melanogaster*

Bei der Kreuzung zwei verschiedener Fliegenlinien ist es notwendig, darauf zu achten, dass die Weibchen in einem jungfräulichen Stadium von den Männchen der eigenen Linie getrennt werden. So lässt sich sicherstellen, dass keine der Nachkommen, den Genotyp der mütterlichen Linie widerspiegelt, sondern eine Kombination aus zwei unterschiedlichen Linien darstellt.

Im Falle der Kreuzungen des Misexpression-Screens wurden aus praktischen Gründen Jungfrauen der *sr239 panGal4*-Treiber-Linie mit Männchen von 4058 verschiedenen EP-Linien gekreuzt.

Bei Kreuzungen zwischen Gal4- und UAS-Linien mit der Absicht einer ektopischen Expression, musste darauf geachtet werden, die Röhren bzw. Ablagekäfige bei mindestens 25°C bis 29°C zu inkubieren, um den gewünschten Effekt zu erzielen.

4.2.3.1 Fliegenlinien

Wildtyp:	Oregon-R-S, Canton-S
EP1344:	Rorth <i>et al.</i> , 1996
PX-Linien:	Peter <i>et al.</i> , 2002
Histon 2A-GFP:	W ¹¹¹⁸ ; P w ^{+mC} =His3Av ^{T:Avic/GFP-S65T} 62A
<i>paired</i> -Gal4:	w*, P w ^{+mW.hs} =Gal4- <i>prd.F</i> RG1/TM3, Sb ¹
<i>twist</i> -Gal4:	P w ^{+mC} =Gal4- <i>twi.G</i> 108.4, w ¹
<i>single-minded</i> -Gal4:	w; <i>simGal4</i> /CyO
<i>actin</i> -Gal4:	Y ^{1W} ; P wmc= <i>act5c</i> -Gal4 25F01/CyO, y ⁺
NGT40-Gal4:	w*; P w ^{+mC} =Gal4- <i>nos</i> .NGT 40
<i>nanos</i> -Gal4:	w ¹¹¹⁸ ; P w ^{+mC} =Gal4::VP16- <i>nos</i> .UTR MVD1
TR-Gal4:	
<i>engrailed</i> -Gal4:	Reinhard Schuh
<i>breathless</i> -Gal4:	Milan <i>et al.</i> , 1997
	y ¹ w ¹¹¹⁸ ; P w ^{+mW.hs} =GawB <i>ap</i> ^{md544} /CyO

apterous-Gal4: w^{*}; P w^{+m*}=Gal4-*ey.H* 4-8/CyO
eyeless-Gal4: w¹¹¹⁸; P w^{+mC}=UAS-lacZ.NZ J312
 UAS-LacZ: w^[1118], P ry^[+7.2]=neoFRT 19A
 :

4.3 Grundlegende molekularbiologische Methoden zum Arbeiten mit Nukleinsäuren

4.3.1 Behandlung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

DNA lässt sich sequenzspezifisch mit unterschiedlichen Restriktionsendonukleasen schneiden. Dies macht man sich zunutze, um beispielsweise bestimmte Fragmente voneinander zu trennen und evtl. anschließend mit anderen Fragmenten bzw. Vektoren zu ligieren.

In die enzymatische Reaktion wurden die gewünschte Menge DNA, die benötigte Menge an Enzym (1 Unit = Enzymmenge die 1µg DNA in einer Stunde schneidet) sowie ein vom Hersteller angegebener zehnfach konzentrierter Reaktionspuffer eingesetzt. Dieser Ansatz wurde bei 37°C für ca. zwei bis drei Stunden inkubiert.

4.3.2 Elektrophoretische Auftrennung von DNA in Agarosegelen

Auftragspuffer: 0,1 % Bromphenolblau
 0,9 % Borsäure
 0,1 % Xylencyanol
 40 % Glycerin in TBE bzw. TAE

TBE-Puffer: 0,5M Borsäure
 0,5M Tris
 10mM EDTA
 pH: 7,8

Das Laufverhalten von DNA-Fragmenten in Agarosegelen korreliert mit der jeweiligen Größe und dreidimensionalen Gestalt, wodurch eine Auftrennung unterschiedlicher Fragmente möglich ist. Große Fragmente wandern im Gel langsamer als kleinere. Bei gleicher Größe wandern lineare Fragmente langsamer als jene in Supercoiled-Form.

Agaroselösungen in TBE-Puffer benötigter Konzentration (meist ca. 1%ig) wurden aufgekocht und mit 10 µg/ml Ethidiumbromid versetzt. Nach dem Abkühlen auf 60°C wurde die Lösung in horizontale Gelkammern benötigter Größe gegossen. Durch Einsatz eines Kammes in die Gelkammer entstanden nach dem Auspolymerisieren mehrere Taschen, in die die mit Auftragspuffer beschwerten DNA-Proben pipettiert werden konnten. Als Laufpuffer wurde TBE-Puffer über das Gel geschichtet und eine Gleichspannung von ca. 50-100V angelegt. Auf Grund ihrer negativen Ladung läuft die DNA in Richtung Anode, was mit Hilfe des Auftragspuffers optisch verfolgt werden kann.

Durch den der Agaroselösung zugesetzten interkalierenden Farbstoff Ethidiumbromid ließen sich die unterschiedlichen DNA-Fragmente im UV-Licht als fluoreszierende Bande erkennen. Durch gleichzeitiges Laufen von Marker-DNA-Fragmenten bekannter Größe ließen sich die Größen der zu untersuchenden Fragmente bestimmen.

4.3.3 Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen bzw. PCR-Ansätzen

(QIAquick, Quiagen)

Die Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen und PCR-Ansätzen erfolgt mithilfe der QIAquick-Säulen in ähnlicher Weise, hier soll exemplarisch die Aufreinigung aus Agarosegelen erläutert werden.

Die Bande mit dem gewünschten DNA-Fragment wurde mit einem sterilen Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß transferiert.

Pro 100 mg Gelstück wurden 300 µl Lösung QG zugegeben und anschließend wurde der Ansatz für ca. 10 Minuten bei 50°C inkubiert, wobei ein regelmäßiges Schütteln erfolgte, um das Auflösen des Gels zu beschleunigen.

Anschließend wurde der Ansatz mit 100 µl Isopropanol pro 100 mg Gel versetzt und auf die Säule transferiert. Nach Bindung der DNA an die Säule konnte der Überstand durch einminütige Zentrifugation entfernt werden. Nach waschen mit 0,5 ml QG-

Puffer und 0,75 ml PE-Puffer wurde die Säule nochmals zentrifugiert, um Lösungsreste zu entfernen. Anschließend wurde die Säule in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und die DNA mit 30µl EB-Puffer eluiert und durch Zentrifugation in das Reaktionsgefäß überführt.

4.3.4 Bestimmung der Konzentration von DNA und RNA

Aufgrund ihrer maximalen Absorption bei einer Wellenlänge von $\lambda = 260$ nm können Nucleinsäuren photometrisch quantifiziert werden.

Bei einer Küvettenbreite von 1 cm lassen sich Konzentrationen mit Hilfe folgender Beziehungen berechnen:

doppelsträngige DNA c ($\mu\text{g/ml}$) = $\text{OD}_{260} \times 50 \times \text{Verdünnungsfaktor}$

einzelsträngige DNA c ($\mu\text{g/ml}$) = $\text{OD}_{260} \times 33 \times \text{Verdünnungsfaktor}$

RNA c ($\mu\text{g/ml}$) = $\text{OD}_{260} \times 37 \times \text{Verdünnungsfaktor}$

4.3.5 Dephosphorylierung von Vektor-DNA

Um nach dem Schneiden des Vektors mit Restriktionsendonukleasen und beabsichtigter Ligation mit einem anderen DNA-Fragment eine Religation des Vektors zu verhindern, wurden die 5'-Phosphatenden des Vektors mit dem Enzym Alkaline Phosphatase (AP) abgespalten.

Der Reaktionsansatz aus Vektor-DNA, 1 Unit AP und 10 \times AP-Puffer wurde für 15 Minuten bei 37°C und anschließend nach Zugabe eines weiteren Units AP für 45 Minuten bei 50°C inkubiert. Durch Inkubation bei 65°C für 10 Minuten wurde das Enzym inaktiviert.

4.3.5.1 Vektoren

PBluescript KS⁺:	2958 bp, Ampicillin-Resistenz, T3- und T7-Promotor
PCaSpeR 3: (UAS-Vektor)	7735 bp, Ampicillin-Resistenz, RK19- und RK20-Primer zur Sequenzierung verwendet
PCR-XL-TOPO: Invitrogen	3519 bp, Kanamycin- und Neomycin-Resistenz, M13 Forward- und Reverse-Promotor
PCRII-TOPO: Invitrogen	3950 bp, Kanamycin- und Ampicillin-Resistenz, Sp6- und T7-Promotor
POT2:	ca. 1600 bp, Tetracyclin-Resistenz, Sp6- und T7-Promotor

4.3.6 Ligation

Zur Klonierung von DNA-Fragmenten in bestimmte Vektoren wurden dephosphorylierte Vektor-DNA und zu klonierendes Fragment in bestimmten molaren Verhältnissen nach Revie *et al.*(1988) mit 1 Unit T4-DNA-Ligase und 10 x Ligationspuffer (enthält dATP) über Nacht bei 16°C ligiert.

4.3.7 Transformation

Zur Amplifikation der in den Vektor klonierten DNA wurden die Plasmide in kompetente Zellen (siehe Kap. 4.1.2) transformiert. Dazu wurden 100 µl Bakterienlösung auf Eis aufgetaut und mit der Plasmid-DNA vermischt und 20 Minuten auf Eis inkubiert. Mithilfe eines Hitzeschocks bei 42°C für 60 Sekunden konnte die DNA durch die Zellmembran in die Bakterien aufgenommen werden. Nach dem Hitzeschock wurden die Zellen nochmals für 10 Minuten auf Eis gestellt, anschließend folgt nach Zugabe von LB-Medium eine 30-60minütige, schüttelnde Inkubation, in der die Antibiotika-Resistenz ausgebildet werden kann.

Methode macht sich das unterschiedliche Verhalten von chromosomaler und Plasmid-DNA bei einem wechselnden pH-Wert zunutze.

4 mit 200 µl der Mini-Kultur bzw. einer Kolonie angeimpft und über Nacht bei 37°C schüttelnd inkubiert. Die Übernachtskulturen wurden in Falconröhrchen (50 ml) überführt, die Zellen bei 4000 rpm abzentrifugiert und anschließend in 4 ml P1 resuspendiert. Durch Zugabe von P2 wurden die Zellmembranen während der fünf minütigen Inkubation bei Raumtemperatur aufgebrochen. Nach Zugabe von 4 ml P3 und fünf Minuten Inkubation bei 4°C wurde die chromosomale DNA abzentrifugiert (bei 4°C, 6000 rpm, 20 Minuten). Der Überstand wurde auf eine zuvor mit QBT-Puffer äquilibrierte Quiagen Midi-Säule transferiert. Nach zweimaligem Waschen mit QC-Puffer wurde die an die Säule gebundene Plasmid-DNA mit 5 ml Puffer QN eluiert. Die gereinigte Plasmid-DNA wurde mit Isopropanol aus dem Eluat gefällt, mit 70 %igem Ethanol gewaschen und nach Trocknen des Pellets in TE-Puffer oder Wasser aufgenommen.

4.3.10 Präzipitieren von DNA

Zur Präzipitation von DNA aus wässriger Lösung wurden 2,5 VT Ethanol (96 %) und 0,1 VT 3 M Natriumacetat (pH 4,8) zugegeben, gevortext und für mindestens 30 Minuten bei -20°C inkubiert. Durch anschließendes Zentrifugieren bei 4°C, 13000 rpm für mindestens 30 Minuten lässt sich die DNA pelletieren. Das Präzipitat wurde mit 70 % igem Ethanol gewaschen, luftgetrocknet und anschließend in TE-Puffer aufgenommen. Durch die Zugabe eines bestimmten Volumens an TE-Puffer konnte die Konzentration der Nukleinsäure bestimmt werden.

Bei sehr geringen Mengen an DNA wurde Glycogen (Endkonzentration: 15 µg/ml) zum Ansatz hinzugegeben, um die Präzipitation zu verstärken.

4.3.11 Phenol/Chloroform-Extraktion

Durch eine Phenol/Chloroform-Extraktion (nach Sambrook *et al.*, 1989) lassen sich Proteine aus einer wässrigen Nukleinsäure-Lösung entfernen.

Zur Denaturierung der Proteine wurde die Nukleinsäure-Lösung mit einem Volumenteil TE-gesättigtem Phenol versetzt und für 15 Sekunden gevortext.

Durch fünfminütiges Zentrifugieren bei 13000 rpm wurden die zwei Phasen voneinander abgetrennt, die obere wässrige Phase wurde anschließend in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Zur Entfernung von Phenolresten wurde ein VT eines Chloroform-Isoamylalkohol-Gemisches (24:1) zugegeben, kräftig geschüttelt und fünf Minuten bei 13000 rpm zentrifugiert. Mit der oberen Phase wurde der letzte Schritt nochmals durchgeführt.

Zum Schluß wurde die Nukleinsäure gefällt und in einer erwünschten Menge TE-Puffer aufgenommen.

4.3.12 Präparation von genomischer DNA

(Dneasy Tissue Kit, Quiagen)

Zur Präparation von genomischer DNA aus adulten Fliegen wurden 10-15 Fliegen in 180 µl PBS homogenisiert. Nach Zugabe von 20 µl ProteinaseK wurde das Homogenat für ca. eine Stunde bei 55°C inkubiert. Anschließend wurde nach optionaler Zugabe von Rnase, 200 µl Puffer AL und 15 Sekunden vortexen das Gemisch für 10 Minuten bei 70°C inkubiert. Durch Zugabe von 200 µl Ethanol wurde die DNA präzipitiert und im Anschluss an eine Säule gebunden. Diese Säule wurde mit je 500 µl Puffer AW1 und AW2 gewaschen bevor die DNA mit 200 µl eluiert und durch Zentrifugation in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt wurde.

4.3.13 Analyse von Nukleinsäuren mittels PCR

Die **Polmerase-Chain-Reaction** = PCR ermöglicht die schnelle Amplifikation kleinster Mengen DNA. Diese Methode besteht aus sich wiederholenden Zyklen weniger Reaktionsschritte, die in jedem Durchlauf die Anzahl eines spezifischen DNA-Fragmentes verdoppeln, d.h. es findet eine exponentielle Vermehrung statt.

Die Reaktion beginnt mit der Denaturierung der DNA bei hohen Temperaturen, dem nach Erniedrigung der Temperatur ein 'annealen' der zugegebenen, spezifischen Primer folgt. Ausgehend von diesen Primern kann anschließend eine DNA-Polymerisation erfolgen. Durch anschließende Erhöhung der Temperatur findet wieder eine Denaturierung der neuen Doppelstränge statt und die Reaktion kann von neuem durchlaufen werden.

Die-PCR-Reaktion findet in einer speziellen Apparatur statt, die einen schnellen Temperaturwechsel ermöglicht.

A) Amplification von DNA-Fragmenten mit PCR:

Ein Standard-PCR-Ansatz zur Amplifikation bzw. Identifizierung spezieller DNA-Fragmente sah folgendermaßen aus:

Template-DNA	ca. 10 ng
10×PCR-Puffer	5 µl
MgCl ₂	3 µl
dNTP (je 2,5 mM)	5 µl
Primer A	25 pmol
Primer B	25 pmol
Taq-Polymerase	0,2 µl (= 1U)
destilliertes Wasser	auf 50 µl auffüllen

Die Ansätze wurden kurz gevortext, durch anzentrifugieren am Boden des 0,5 ml-Reaktionsgefäßes gesammelt und in den PCR-Cycler gestellt.

Folgendes Standard-Programm wurde in der Regel verwendet:

94°C	4 min		
94°C	1 min		
x °C (primerabhängig)	1 min		dieser Teil wird als Schleife ca. 30 ×
72°C	durchlaufen		
72°C	1 min (pro kb)		
4°C	5 min		
	unendlich		

B) Nachweis von RNA durch RT-PCR:

(TitanTM One Tube RT-PCR System, Roche)

Zum Nachweis von spezifischer RNA mit Hilfe von PCR-Methoden wurde diese zunächst durch eine reverse Transkriptase in cDNA umgeschrieben und dann mit spezifischen Primern in der PCR-Reaktion nachgewiesen. Somit lassen sich z.B. noch nicht bekannte cDNA-Fragmente finden bzw. im Vergleich mit genomischer DNA als Template Intronbereiche aufzeigen. Diese Reaktionen wurden mit Lösungen des

Titan™ One Tube RT-PCR System (Roche) durchgeführt, die es erlauben zu Beginn eine Enzym-Gemisch zuzugeben, was bereits alle benötigten Enzyme enthält.

Zunächst wurden zwei getrennte Gemische angesetzt:

Komponente:	Volumen:	Endkonzentration in der RT-PCR:
<u>Mastermix 1:</u> dNTP, je 10 mM Primer 1, 20 µM Primer 2, 20 µM Template-RNA DTT-Lösung, 100 mM RNase-Inhibitor, 40U/µl steriles bidest. Wasser	1 µl x µl x µl x µl 2,5 µl x µl auf 25 µl auffüllen	je 0,2 mM 0,4 µM 0,4 µM 1 pg - 1 µg Gesamt-RNA 5 mM 5 - 10 U
<u>Mastermix 2:</u> 5×PCR-Puffer mit Mg ²⁺ Enzym-Mix steriles bidest. Wasser	10 µl 1 µl auf 25 µl auffüllen	1,5 mM MgCl ₂ AMV und Expand™ High Fidelity

Nach Mischen der beiden Ansätze wurden die 0,5 ml Reaktionsgefäße in PCR-Apparaturen gestellt und folgendes Programm eingegeben:

94°C	2 min	
94°C	30 sec	
45 - 65°C (primerabhängig)	30 sec	 × 10
68°C	45 sec - 4 min	
94°C	30 sec	
45 - 65°C (primerabhängig)	30 sec	 × 25,

68°C 45 sec - 4 min wobei die Zeit der letzten Stufe bei 68°C in
68°C 7 min jedem Zyklus um 5 sec verlängert wird

Die Polymerisationszeit bei 68°C richtet sich nach der Größe des zu amplifizierenden Fragmentes.

PCR-Fragment (kb)	< 1	1,5	3	4,5	6
Polymerisations-Zeit:	45 sec	1 min	2 min	3 min	4 min

4.3.14 Plasmid-Rescue-Experimente

Um die Integrationsstelle von EP-Elementen in das Genom von *Drosophila* zu analysieren, wurde die Plasmid-Rescue-Technik verwendet. Zu diesem Zweck wurde zunächst die genomische DNA der betreffenden EP-Element-Linie präpariert (siehe 4.3.12) und mit der Restriktionsendonuklease EcoRI geschnitten. Dies erzeugte Fragmente, die einerseits Teile des EP-Elementes und andererseits angrenzende genomische DNA enthielten. Nach anschließender Ligation der entstandenen Fragmente konnte entweder mit einer inversen PCR oder der Klonierung des restlichen EP-Elementes inklusive angrenzender genomischer Region fortgeföhren werden.

Im Falle der inversen PCR wurden folgende Primer verwendet, die innerhalb der verbliebenen EP-Element-Sequenz binden und in Richtung der genomischen DNA orientiert sind.

Pry1, 3': CCTTAGCATGTCCGTGGGGTTTGAAT
Pry4, 3': CAATCATATCGCTGTCTCACTCA
Plac1, 5': CACCCAAGGCTCTGCTCCCACAAT
Pwht1, 5': GTAACGCTAATCACTCCGAACAGGTCACA

Auf diesem Wege erhielt man eine Sequenzinformation, die man mit der bekannten Sequenz von *Drosophila* vergleichen und somit die Integrationsstelle bestimmen konnte.

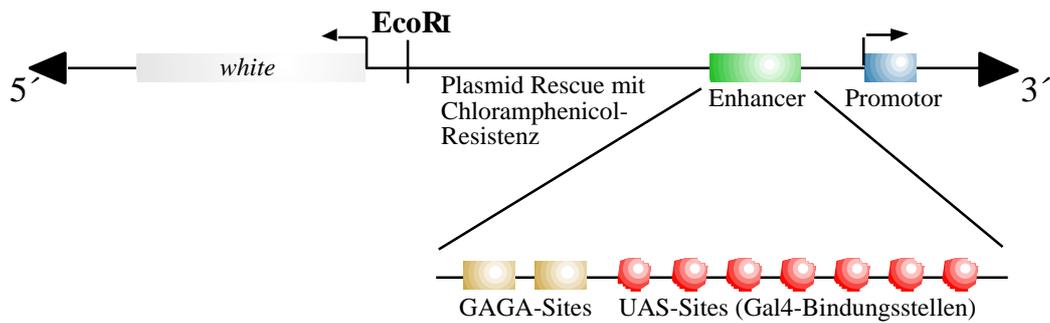


Abb. 4.3.14: Schematische Darstellung des EP-Vektors (nach Rorth *et al.*, 1996)

Da zu Beginn der vorliegenden Arbeit noch nicht die komplette Sequenzinformation vorlag, war es von Vorteil das genomische Fragment zu klonieren. Zu diesem Zweck wurde die DNA nach der Ligation in *E. coli*-Zellen transformiert und mithilfe der auf dem EP-Element-Vektor enthaltenen Chloramphenicolresistenz selektioniert. Die in diesem Klon enthaltene genomische DNA wurde durch Inkubation mit den Restriktionendonukleasen *EcoRI* und *HindIII* weitestgehend vom EP-Element-Vektor getrennt und in einen Bluescript-Vektor kloniert. Mithilfe der Erkennungssequenzen für die RNA-Polymerasen T3 und T7 in diesem Vektor konnten RNA-Sonden für *in-situ*-Hybridisierungsexperimente hergestellt werden. Im Falle der EP-Linie 1344, in der das EP-Element im ORF von *vielfältig* inseriert ist, konnte somit das Expressionsmuster nachgewiesen werden, welches mit dem der cDNA-Klone in diesem Bereich übereinstimmt.

4.3.15 Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierungen der DNA wurden von Gordon Dowe mithilfe einer Perkin-Elmer-Sequenziermaschine durchgeführt. Zur Sequenzierung der cDNA-Klone LD47418 und LD37284 von *vielfältig* wurden folgende Oligonukleotide verwendet:

Name:	Sequenz 5'-3':
AC001A	GTCTGTCCGTTTCGTCTGTCCA
AC002A	CGCGTCTTCGTCTTCGTCGTT
AC01A	AACGGGCACAACACTGAGCAACC
AC01B	GGTTGCTCAGTTGTGCCCGTT
AC02A	GGCCAACCAATCTTCGCTGTG

AC02B	CACAGCGAAGATTGGTTGGCC
AC03A	AGCCCACGCAACAGCAGCAAT
AC03B	ATTGCTGCTGTTGCGTGGGCT
AC03C	GAGTCCGCGTGTGGTTAGCAG
AC03D	CTGCTAACCACACGCGGACTC
AC04A	TCGCCCTACTACTACCAAAG
AC04B	CTTTGGTGAGTAGTAGGGCGA
AC04C	GCAGCAACAGCCGCCGATACC
AC04D	GGTATCGGCGGCTGTTGCTGC
AC05A	ACAACCACGCCGCCACCAACA
AC05B	TGTTGGTGGCGGCGTGGTTGT
AC05C	ATCATCAGCAGCAGCGGGAGC
AC05D	GCTCCCGCTGCTGCTGATGAT
AC06A	GACGCCAACGCTGACTGTGCT
AC06B	AGCACAGTCAGCGTTGGCGTC
AC06C	TCGCCACCGCACCCAGGACAA
AC06D	TTGTCCTGGGTGCGGTGGCGA
AC07A	CGCTAACGGTGACGGCTGTGA
AC07B	TCACAGCCGTCACCGTTAGCG
AC07C	GGGTCAGCTTGGGGTTGTTCC
AC07D	GGAACAACCCCAAGCTGACCC
AC08A	CCTCAGCAAACAGCAGTCCAC
AC08B	GTGGACTGCTGTTTGCTGAGG

4.4 Northern-Blot-Analyse

Zur Bestimmung der Größe des *vielfältig*-Transkriptes und der Verteilung im Verlauf des Lebenszyklus von *Drosophila* wurde eine Northern-Blot-Analyse mit RNA verschiedener Stadien durchgeführt.

4.4.1 Präparation von Gesamt-RNA

(Rneasy, Quiagen)

Embryonen, Larven-, Puppen- und adulte Stadien von *Drosophila melanogaster* wurden gesammelt und in bis zu 600µl RLT-Puffer pro 30mg Material in einem Handpotter homogenisiert.

Das Gemisch wurde auf eine QIAshredder-Säule pipettiert, welche sich in einem 2ml Sammelgefäß befand und das ganze für zwei Minuten bei höchster Geschwindigkeit zentrifugiert. Das resultierende Lysat wurde in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß

überführt und für drei Minuten bei höchster Geschwindigkeit zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Gefäß transferiert und ein Volumen 70%iges Ethanol zugegeben. Anschließend wurde dieses Gemisch auf eine RNeasy-Säule pipettiert und für 15 Sekunden bei 10000rpm zentrifugiert. Anschließend wurde die Säule einmal mit 700µl RW1-Puffer und zweimal mit 500µl RPE-Puffer gewaschen. Zum Abschluß wurde die RNA mit 30-50µl Rnase-freiem Wasser von der Säule eluiert. Bei allen Arbeiten mit RNA wurden Handschuhe getragen und möglichst mit RNase freien Materialien und Lösungen gearbeitet.

4.4.2 Isolierung von PolyA⁺-RNA

(Oligotex-mRNA-Kit, QIAGEN)

Bis zu 1mg Gesamt-RNA wurden mit destilliertem, RNase freien Wasser auf ein Volumen von 500 µl aufgefüllt. Nach Zugabe von 500 µl OBB-Puffer und 55 µl Oligotex-Suspension (auf 37°C vorgewärmt) wurde der Ansatz für drei Minuten bei 70°C inkubiert, was der Beseitigung von Sekundärstruktur in der RNA dienen sollte. Nach weiterer 10minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Oligotex-Partikel durch zweiminütige Zentrifugation bei höchster Geschwindigkeit pelletiert. Nach Entfernung des Überstandes wurde das Pellet in 400µl OW2-Puffer aufgenommen und auf eine Säule transferiert. Nach einminütiger Zentrifugation wurde die Säule mit 400µl OW2-Puffer gewaschen. Im Anschluss wurde die PolyA⁺-RNA durch zweimalige Zugabe von 20-100µl auf 70°C erwärmten OEB-Puffer eluiert.

4.4.3 Herstellung radioaktiv markierter RNA-Sonden

(Strip-EZTMRNA, Ambion)

Zur Herstellung radioaktiv markierter RNA-Sonden wurde eine in-vitro-Transkription mit ³²P-markiertem UTP durchgeführt. Alle Reagenzien wurden auf Eis aufgetaut und wie folgt zusammen pipettiert.

0.5-1 µg DNA-Template (LD47819)

2 µl 10*Transkriptionspuffer

1 µl 10mM ATP
1 µl 2mM CTP
1 µl 10mM GTP
1 µl 10mM ³²P-UTP
2 µl SP6- oder T7-Polymerase
mit Wasser auf 20 µl auffüllen

Anschließend wurde der Ansatz für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von 1 µl Dnase zur Degradation des DNA-Templates und Inkubation für weitere 15 Minuten konnte die Reaktion durch Zugabe von 1 µl 0,5M EDTA gestoppt werden. Die radioaktiv markierte DNA-Sonde wurde ohne längere Lagerung wegen des radioaktiven Zerfalls (Halbwertszeit von ³²P: ca. 14 Tage) anschließend zur Hybridisierung (4.5.5) eingesetzt.

4.4.4 Northern-Blot-Transfer

10 x MOPS - Puffer : 0,2 M MOPS [3-(N-morpholino)propanesulfonic acid]
 50 mM Na-Acetat
 _ pH-Wert auf 7,0 einstellen
 10 mM EDTA

Formaldehyd-
Ladepuffer : 50 % Formamid
 2,2 M Formaldehyd
 2 x MOPS-Acetat
 0,02 % Bromphenolblau

Zur elektrophoretischen Auftrennung von RNA wurden 0,6 g RNase freie Agarose in ca. 48 ml 1xMOPS-Puffer aufgekocht und auf 60°C abgekühlt. Nach Zugabe von ca. 3 ml steril filtriertem 37 %igem Formaldehyd wurde die Agaroselösung in eine 8 × 9 cm große horizontale Gelkammer gegossen und mit einem Kamm benötigter Taschengröße versehen.

Nach Auspolymerisation wurde das Gel mRNA-Proben verschiedener Stadien sowie einem RNA-Marker beladen, wobei ein Formaldehyd-Laufpuffer verwendet wurde. Bei einer Spannung von 45 V und einer Dauer von mindestens drei Stunden wurden die unterschiedlichen RNA-Fragmente über die gesamte Länge des Gels aufgetrennt.

Nach 10 Minuten Äquilibration des Gels in 10 × SSC wurde ein aufwärts gerichteter Kapillar-Blot aufgebaut, um die RNA aus dem Gel auf eine Nylonmembra-
n zu

übertragen. Als Laufpuffer wurde $10 \times \text{SSC}$ verwendet. Nach mehreren Stunden bzw. Übernacht-Inkubation konnte der Blot abgebaut werden.

Bis zur Hybridisierung wurde die Nylonmembran bei -20°C gelagert.

4.4.5 Hybridisierung

High-SDS-Puffer :

- 7 % SDS
- 50 % Formamid
- 5 x SSC
- 2 % Blocking-Reagenz
- 50 mM Natriumphosphat-Puffer
- _ pH-Wert 7,0 einstellen
- 0,1 % N-lauroylsarcosine

Die Hybridisierung der RNA auf der Nylonmembran mit der radioaktiv markierten DNA-Sonde erfolgte in einem Hybridisierungsofen, in dem die Hybridisierungsröhren bei erwünschter Temperatur gleichmäßig gedreht wurden.

Zunächst wurde die Membran in High-SDS-Puffer für mindestens eine Stunde bei 48°C prähybridisiert. Nach erneuern des Puffers wurde die zuvor denaturierte radioaktiv markierte DNA-Sonde zugegeben und die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 48°C .

Am nächsten Morgen wurde die Membran für 2×15 Minuten bei Raumtemperatur mit $2 \times \text{SSC}$, 0,1 % SDS und für weitere 2×15 Minuten bei 48°C mit $0,5 \times \text{SSC}$, 0,1 % SDS gewaschen.

4.4.6 Detektion radioaktiv markierter Sonden

Die gewaschene Nylonmembran mit gebundener radioaktiver DNA-Sonde wurde in Frischhaltefolie eingeschlagen und in eine Autoradiographiekassette überführt. Nach Auflegen eines Röntgenfilmes wurde die Kassette bei -80°C je nach radioaktivem Einbau in der Sonde für einige Stunden bis einige Tage inkubiert.

Anschließend wurde der Film zur Detektion des radioaktiven Signals mithilfe einer Entwicklermaschine (Sakura QX60, Konica) detektiert.

4.5 Antikörper-Aufreinigung mittels CNBr-aktivierter Sepharose

Zur Produktion von Antikörpern gegen Vielfältig wurden folgende zwei Peptide in zwei Kaninchen injiziert:

TWKSNEARRPKTYNC (AS 540-554); EQQGTDFSRTTPPPQ (AS 923-937)

Das Serum eines Kaninchens wurde im Anschluss an die finale Blutung über eine CNBr-aktivierte Sepharose aufgereinigt.

Zu diesem Zweck wurde pro 10mg Peptid 1g Sepharose-Pulver (ergibt ca. 3,5ml Gel) verwendet, welches in ca. 20 ml 1mM HCl suspendiert und anschließend mehrmals in 1mM HCl gewaschen bevor es mit 5ml Coupling-Buffer (0,1 M NaHCO₃, 0,5 M NaCl, pH 8,3)/ml Gel gewaschen wurde, um das Säulenmaterial zur Ladung der Peptide zu equilibrieren.

Die Peptide wurden in Coupling-Buffer im Verhältnis zwei Volumen Puffer zu einem Volumen Gel gelöst. Die Sepharose wurde mit den gelösten Peptiden für 2 Stunden bei Raumtemperatur oder bei 4°C über Nacht leicht schüttelnd inkubiert. Im Anschluss wurde der Puffer entfernt und das Gel mit 5 Gelvolumen neuem Coupling-Buffer gewaschen.

Zum Abblocken verbleibender aktiver Gruppen wurde das Gel für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend in mindestens drei alternierenden Zyklen von 5 Gelvolumen 0,1M Acetate, 0,5M NaCl, pH 4,0 und Coupling-Buffer gewaschen. Im Anschluss wurde die Sepharose vorsichtig Luftbalsen vermeidend auf eine Säule geladen und in Folge mit jeweils 10 Gelvolumen 10mM Tris-HCl, pH 7,5; 100mM Glycin, pH 2,5; 10mM Tris-HCl, 8,8; 100mM Triethylamin, pH 11,5; 10 mM Tris-HCl, pH 7,5 gewaschen.

Zur Bindung des Antikörpers an das Säulenmaterial wurde das Serum eines Kaninchens 1:10 mit 10 mM Tris-HCl, pH 7,5 verdünnt und langsam (ca. 1 ml/min) mehrmals über Nacht über die Säule laufen lassen. Anschließend wurde mit je 20 Gelvolumen 10 mM Tris-HCl, pH 7,5 und 10 mM Tris-HCl, 0,5 M NaCl, pH 7,5.

Die Elution des an das Säulenmaterial gebundenen Antikörpers erfolgt zum einen mit 10 Gelvolumen 100 mM Glycin, pH 2,5 und zum anderen mit 100 mM Triethylamin, pH 11,5 getrennt von einem Waschschrift mit 10 mM Tris-HCl, pH 8,0. Die beiden Eluate wurden mit 1M Tris-HCl, pH 8,0 neutralisiert. Die Säule wurde zum Schluß mit 10 mM Tris-HCl, pH 7,5 gewaschen, worin sie auch über längere Zeit gelagert werden konnt.

Die beiden Eluate wurden mithilfe von Centricon-Säulen (Millipore) ankonzentriert und in PBS überführt. Im Anschluss wurden beide Eluate in einer Antikörperfärbung getestet.

4.6 Western-Blot-Analyse

SDS-Probenpuffer:	4% SDS 20% Glycerin 0,1% Bromphenolblau 100mM Tris-HCl, pH 6,8 1mM DTT, frisch aus 1:1000-Stocklösung
15ml 8%iges Trenngel:	4ml 30% Acrylamid-Mix 3,8 ml 1,5M Tris, pH 8,8 0,15ml 10% SDS 0,15ml 10% Ammoniumpersulfat 0,009ml TEMED 6,9ml H ₂ O
10ml 5%iges Sammelgel:	1,7ml 30% Acrylamid-Mix 1,25 ml 1,5M Tris, pH 6,8 0,1ml 10% SDS 0,1ml 10% Ammoniumpersulfat 0,01ml TEMED 6,8ml H ₂ O
SDS-Laufpuffer:	25mM Tris-Base 250mM Glycin, pH 8,3 0,1% SDS
Laemmli-Blot-Puffer:	25mM Tris-Base 250mM Glycin, pH 8,3 20% Methanol

Nach Denaturierung der Proben inklusive Probenpuffer durch Aufkochen wurden diese mithilfe von SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennt. Dazu wurde zunächst ein 8%iges Trenngel in eine Mingelkammer (Biorad) gegossen und nach dem Auspolymerisieren mit wenigen ml Sammelgel überschichtet. Die Glasplatten inklusive Gel wurden anschließend in Laufpuffer transferiert. Die Kammgröße wurde in Relation zum Probenvolumen ausgewählt. Nach dem Auftragen der Proben in die entstandenen Taschen wurde eine Spannung von ca. 100V angelegt und anhand eines Markers die Auftrennung der Proteine verfolgt. Im Falle der Erstellung zwei gleich beladener Gele konnte ein Gel mit Coomassiebrilliant-Lösung zur Anfärbung der

Proteine verwendet werden, während die Proteine des anderen Gels auf eine Zellulosemembran transferiert wurden. Dies erfolgte ebenfalls mit Hilfe eines BioRad-Gelkammersystems, welches in eine Kammer mit Blotpuffer überführt wurde und die Proteine bei einer Stromstärke von ca. 300mA auf die Membran für ca. 1,5 Stunden transferiert wurden.

Anschließend wurde nach einstündigem Blocken in 10%iger BSA-Lösung und mehrmaligem Waschen der Membran mit PBT der gewünschte Antikörper in 3%iger BSA-Lösung zugegeben. Nach einstündiger schüttelnder Inkubation wurde mehrmals mit PBT gewaschen bevor der zweite Antikörper, welcher mit Alkaliner Phosphatase gekoppelt war zugegeben.

Nach erneuter einstündiger Inkubation und Waschen mit PBT wurde die Membran für 10 min in AP-Puffer (siehe *In-situ*-Hybridisierung) equilibriert. Die Färbung erfolgte nach Zugabe von 45µl NBT und 35µl BCIP pro 10ml Puffer und wurde nach Erreichen der erwünschten Färbeintensität mit PBT abgestoppt.

4.7 Antikörperfärbungen an Embryonen von *Drosophila melanogaster*

4.7.1 Fixierung von Embryonen für Antikörperfärbungen

Die Embryonen wurden mit Hilfe von TNX (0,7 % NaCl/ 0,1 % Triton) von den mit Apfelsaftagar gefüllten Ablageschälchen auf kleine Netze transferiert.

Zum Entfernen des Chorions wurden die Embryonen für ca. drei Minuten mit einer 50 %igen Klorix-Lösung gewaschen. Um die Reaktion abzustoppen folgten mehrere abwechselnde Waschschrte mit TNX und destilliertem Wasser. Anschließend wurden die Embryonen in ein Glasröhrchen überführt, wo die Fixierung durch schüttelnde Inkubation mit einem Gemisch aus Heptan und 4 %igem Formaldehyd (1:1) für ca. 20 Minuten erfolgte. Die an der Interphase befindlichen Embryonen wurden mit Hilfe einer Glaspipette in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und mit Heptan gewaschen.

Zur Entfernung der Vitellinmembran wurden die Embryonen in einem Heptan-Methanol-Gemisch (1:1) für eine Minute kräftig geschüttelt. Nach waschen mit Methanol folgten mehrere Waschschrirte mit Ethanol (96 %), in dem die Embryonen schließlich auch gelagert wurden.

4.7.2 Antikörperinkubation und -detektion

Die in Ethanol gelagerten fixierten Embryonen wurden einmal kurz und dann 2×30 Minuten in PBT gewaschen. Dann erfolgte die Inkubation mit dem Antikörper, welcher individuell in PBT verdünnt wurde, bei 4°C unter leichter permanenter Bewegung über Nacht.

Am nächsten Tag wurde der verdünnte Antikörper abgenommen und bis zu erneuter Verwendung bei 4°C gelagert. Die Embryonen wurden einmal kurz und 2×20 Minuten mit PBT gewaschen. Der Zweitantikörper, welcher den ersten erkennt und seine Wirkung verstärkt, wurde an so genannten Dummies in einer Verdünnung von 1:100 in PBT + 2 % Serum (anti-rabbit + goat Serum; anti-mouse + horse Serum) für mindestens einen Stunde präabsorbiert, während die Embryonen eine Stunde in PBT + 2 % Serum geblockt wurden. Nach Verwerfen der Blockierlösung wurden die Embryonen in der präabsorbierten Zweitantikörper-Lösung für ein Stunde langsam bewegt. Während anschließenden drei Waschschrirten von je 20 Minuten wurde eine Färbekomplex aus 500 µl PBT, 10 µl Lösung A und 10 µl Lösung B (Vectastain Kit-Elite) zusammengestellt und für 30 Minuten leicht geschüttelt. Mit diesem Färbekomplex wurden dann die gewaschenen Embryonen für 30 Minuten inkubiert. Der Komplex wurde anschließend entfernt und die Embryonen 3×10 Minuten mit PBT gewaschen. Dann wurden die Embryonen in 450 µl PBT aufgenommen und 20 µl DAB (10 mg/ml) hinzugegeben und 10 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen. Je nach erwünschter Färbung konnten auch 3 µl NiCl₂ (10 %) zugefügt werden. NiCl₂ bewirkt anstatt einer braunen eine schwarze Färbung.

Nach Überführung der Embryonen in ein Blockschälchen wurde die Farbreaktion mit 5 µl H₂O₂ (0,3 %) gestartet. Die Farbreaktion wurde unter dem Binokular verfolgt und nach Erreichen der erwünschten Farbintensität durch mehrfaches Waschen mit PBT gestoppt.

Bei Verwendung von fluoreszent markierten Zweitantikörpern wurde nach Abnahme der Antikörperlösung nur noch mehrmals mit PBT gewaschen und die Embryonen anschließend in Vectashield-Medium eingebettet.

4.8 *in-situ*-Hybridisierung an Embryonen von *Drosophila melanogaster*

4.8.1 Fixierung von Embryonen für *in-situ*-Hybridisierungen

Die Fixierung von Embryonen für *in-situ*-Hybridisierungen erfolgte nach dem gleichen Verfahren wie bei einer Fixierung für Antikörperfärbungen. Neben einer etwas längeren Fixierungszeit von 25 Minuten wurde jedoch auch anstatt des Gemisches aus Heptan und 4 %igem Formaldehyd eine Mischung aus 8 ml Heptan, 0,5 ml 37%igem Formaldehyd und 1,6 ml HEPES-Fixierlösung (100 mM HEPES, 2 mM MgSO₄, 1 mM EGTA; pH 6,9) verwendet.

4.8.2 Herstellung von DIG- bzw. Fluorescein-markierten RNA-Sonden (DIG RNA Labeling Kit, Roche)

Zur Herstellung von RNA-Sonden wurde eine *in-vitro*-Transkription durchgeführt, bei der markierte Nukleotide (meist UTP) in den polymerisierenden Strang eingebaut wurden. Die Startstellen für die RNA-Polymerase liegen im bakteriellen Vektor auf beiden Seiten der MCS (multiple cloning site), in die das zu markierende DNA-Fragment eingesetzt wurde. So lässt sich das Fragment sense oder antisense in Bezug auf die mRNA transkribieren. Bei einer *in-situ*-Hybridisierung benötigt man eine antisense-RNA, die mit der zu untersuchenden mRNA hybridisieren kann.

Für die Markierungsreaktion wurden folgende Reagenzien in einem RNase freien Eppendorf-Reaktionsgefäß gemischt und für zwei Stunden bei 37°C inkubiert.

- 1 µg Template-DNA
- 2 µl 10×NTP-Markierungs-Mix

- 2 µl 10×Transkriptionspuffer
- 1 µl RNase-Inhibitor
- 2 µl spezifischer RNA-Polymerase
- mit RNase freiem Wasser auf 20 µl auffüllen

Nach zwei Stunden wurden 2µl DNaseI hinzugefügt, um das DNA-Template zu entfernen, und für weitere 15 Minuten bei 37°C inkubiert bevor die Reaktion durch Zugabe von 2 µl 0,2 M EDTA-Lösung gestoppt wurde.

Zur Verwendung der Sonden bei *in-situ*-Hybridisierungen wurde der Ansatz 1:10 mit RNase freiem Wasser verdünnt. Diese Lösung wurde bei -20°C gelagert.

4.8.3 Hybridisierung mit RNA-Sonden und Detektion

Färbepuffer : 100 mM NaCl
 50 mM MgCl₂
 100 mM Tris/HCl; pH 9,5
 1 mM Levamisol
 0,1 % Tween 20

Hybridisierungspuffer: 50% Formamid
 5× SSC
 50 µg/ml Heparin
 0,3% Tween
 pH 4,5

Zunächst wurden die fixierten Embryonen aus Ethanol (96 %) über eine Alkoholreihe in PBT überführt und dann für 20 Minuten in Paraformaldehyd (4% in PBT) nachfixiert.

Nach mehrmaligem Waschen mit PBT wurden die Embryonen in 995 µl PBT aufgenommen und nach Zugabe von 5 µl Protease K (10 mg/ml) für 30 Sekunden kräftig geschüttelt. Nachdem die Embryonen in weiteren 35 Sekunden abgesunken waren, wurde die Protease-Lösung entfernt und die Embryonen für drei Minuten in einer Lösung aus 900 µl PBT und 100 µl Glycin (20 mg/ml) inkubiert. Nach 2×5 Minuten in PBT wurden die Embryonen erneut für ca. 10 Minuten in 4 % Formaldehyd-Lösung fixiert. Anschließend folgten fünf Waschschritte von je fünf

Minuten in PBT. Nach langsamer Überführung in *in-situ*-Hybridisierungspuffer wurden die Embryonen für mindestens eine Stunde bei 55°C prähybridisiert. Anschließend wurden die Embryonen mit der entsprechenden RNA-Sonde (1,5 µl der verdünnten Markierungsreaktion in 148,5 µl Hybridisierungspuffer) über Nacht inkubiert.

Am nächsten Morgen folgten mehrere Waschschritte von je 20 Minuten Dauer, zunächst dreimal bei 55°C mit Hybridisierungspuffer, dann folgten Waschungen bei 55°C mit Lösungen aus 60 % Hybridisierungspuffer/40 % PBT und 20 % Hybridisierungspuffer/80 % PBT. Danach wurde in fünf weiteren Waschschritten mit PBT die Temperatur langsam auf Raumtemperatur angeglichen. Während dieser Zeit wurden Embryonen, die nicht zur Färbung bestimmt waren, so genannte Dummies, für 3×20 Minuten in PBT rehydriert und äquilibriert. Dann wurde die Anti-DIG- bzw. Anti-Fluorescein-Antikörperlösung (1:100 in PBT) durch schüttelnde Inkubation für eine Stunde an den Dummies präabsorbiert. Die zu färbenden Embryonen wurden für eine Stunde in dieser präabsorbierten Antikörperlösung inkubiert und danach für 4×20 Minuten in PBT gewaschen. Zur Detektion der markierten RNA-Sonden wurden die Embryonen durch schüttelnde Inkubation von 4×5 Minuten in In-situ-Färbepuffer überführt. Nach Transfer der Embryonen in Blockschälchen und Aufnahme in 1 ml Färbepuffer wurde die Farbreaktion durch Zugabe von je 4,5 µl NBT und 3,5 µl BCIP gestartet. Zur Vermeidung von Hintergrund-Färbung wurde die Reaktion im Dunkel durchgeführt. Je nach Sonde und Häufigkeit sowie Verteilung des nachzuweisenden Transkriptes war eine spezifische Färbung nach mehreren Minuten bis Stunden zu sehen. Die Farbreaktion wurde dann durch mehrmaliges Waschen mit PBT gestoppt. Bei fluoreszenter *in-situ*-Hybridisierung (FISH) wurden die Embryonen nach der Hybridisierung mit der RNA-Sonde und mehrmaligem Waschen mit PBT mit einem Anti-DIG-Antikörper (Schaf) inkubiert. Anschließend wurde nach zwischenzeitigem Waschen ein zweiter gegen den Schaf-Antikörper gerichteter biotinylierter Antikörper verwendet. Nach gewünschter Inkubationszeit und erneuten Waschschritten mit PBT wurde wie bei der Antikörperfärbung erklärt die AB-Lösung des Vectastain-Kits verwendet. Im Anschluss wurden die Embryonen nach mehrmaligem Waschen mit dem gewünschten Farbkomplex aus dem TSA-Kit (1:50 in beiliegendem Verdünnungspuffer) für eine halbe Stunde behandelt. Nach mehrmaligen Waschen

konnten die Embryonen eingebettet oder mit einer Antikörperfärbung fortgeföhren werden.

4.9 Pulsmarkierung mit BrdU (5`-Bromo-2`-Desoxyuridine)

Die zu markierenden Embryonen wurden wie in Kap. 4.7.1 angegeben dechorionisiert, anschließend für sieben Minuten an der Luft getrocknet und für weitere sieben Minuten in n-Oktan inkubiert. Nach sieben sekundigem Trocknen wurden die Embryonen zweimal in Schneider-Medium+ 0,1% Triton und einmal in Schneider-Medium gewaschen bevor sie für 20 bis 40 Minuten in einer Lösung von 1mg/ml BrdU in Schneider-Medium inkubiert wurden, um die Inkorporation von BrdU in die sich replizierende DNA zu erlauben.

Im Anschluss wurden die Embryonen nach erneutem Waschen in Schneider-Medium fixiert (siehe 4.7.1 und 4.8.1).

Nach Fixierung, Devitellinisierung und mehrmaligem Waschen in PBT wurden die Embryonen für 60 bis 70 Minuten in einer frisch angesetzten 2N HCl-Lösung in PBT inkubiert. Dies sollte die DNA teilweise entwinden, um eine bessere Zugänglichkeit des Antikörpers zu ermöglichen. Nach intensivem Waschen mit PBT zur Neutralisierung wurden die Embryonen mit einem Anti-BrdU-Antikörper inkubiert. Die weitere Behandlung der Embryonen wurde analog zum Protokoll für Antikörperfärbungen (Kap. 4.7) durchgeführt.

4.10 Herstellung von dsRNA

Um den Mechanismus der RNAinterference (Tuschel, 2001) zur Herstellung von Phenokopien von *vielfältig* zu verwenden, musste zunächst doppelsträngige RNA aus dem transkribierten Bereich von *vielfältig* hergestellt werden.

Zur Amplifikation eines ca. 1kb großen Stückes aus dem 5`-Bereich von *vielfältig* wurden folgende Primer verwendet:

3-ANTI	GGCACCGTGGGCGTTGACTAT
3-SENSE	GGTTGAGGTGGTGCTGCTGCT
5-ANTI-T7	TAATACGACTCACTATAGTAATACGACTCACTATAG
5-SENSE-T7	TAATACGACTCACTATAGGGCACCGTGGGCGTTGACTAT

Mithilfe der beiden ANTI- und SENSE-Primer wurde jeweils eine PCR-Reaktion (Kap. 4.3.13) in einem Volumen von 100µl, mit 10ng LD47819-cDNA, einer Annealing –Temperatur von 50°C und 25 Zyklen angesetzt. Nach einer Ethanol-Fällung (Kap. 4.3.10) des PCR-Produktes wurde das Pellet in 10µl T7-Puffer aufgenommen. Da jeweils ein Primer eine T7-Promotor-Sequenz enthält, kann ausgehend von diesen PCR-Produkten eine *in vitro*-Transkription erfolgen, um eine sense- und eine antisense-RNA herzustellen. Zur *in vitro*-Transkription (siehe Kap. 4.8.2) wurden folgende Komponenten gemischt:

DNA:	4 µl PCR-Product (10×)
DTT (100mM):	10µl
NTPs (10 mM):	10µl
Rnase Inhibitor:	1.5µl
10 × Transkriptions-Puffer:	10µl
H ₂ O:	39.5µl
T7-Polymerase:	5µl

Nach zweistündiger Inkubation und Behandlung mit DNase wurden jeweils 2 µl des Ansatzes auf ein Gel aufgetragen, um die Mengen an RNA zu vergleichen.

Anschließend wurden äquimolare Mengen an sense- und antisense-RNA vereinigt und mittels Phenol-/Chloroform-Extraktion (Kap. 4.3.11) aufgereinigt. Die gereinigte DNA wurde in H₂O aufgenommen und erhitzt, um den beiden komplementären Strängen beim Abkühlen die Möglichkeit zur Bildung einer doppelsträngigen RNA zu geben. Die RNA wurde auf einem Agarosegel kontrolliert und eine Konzentration von 2µg/µl eingestellt.

4.11 Injektion von Antikörper oder dsRNA in Embryonen von *Drosophila*

Zur Herstellung von nicht stabilen Mutanten von *vielfältig* wurden der gereinigte Antikörper (siehe Kap. 4.5) oder dsRNA (siehe Kap. 4.10) in Embryonen injiziert. Dazu wurden 0-30min alte Embryonen von Wildtyp-Fliegen bzw. zur späteren *in-vivo*-Beobachtung des Chromatins von Fliegen, bei denen Histon H2a mit GFP markiert war, zunächst dechorionisiert und anschließend auf einer Apfelsaftagarplatte aufgereicht. Diese Embryonen wurden mit einem Heptan-löslichen Kleber auf einem Deckglaschen befestigt und je nach Temperatur und Luftfeuchtigkeit für mehrere Minuten in einem mit Silicagel gefüllten Ofen gerocknet. Anschließend wurde die Antikörper- bzw. RNA-Lösung in mit Halocarbonöl überschichtete Embryonen injiziert.

Anschließend wurden die Embryonen nach zweistündiger Inkubation entweder fixiert und die DNA angefärbt oder das Chromatin direkt an lebenden Embryonen untersucht. In diesem Fall war das Histon H2a der injizierten Embryonen mit GFP markiert. Somit konnte das Teilungsverhalten der DNA in Blastoderm-Embryonen direkt am Mikroskop verfolgt und durch Abspeichern der Bilder alle 20-120sec im Verlauf festgehalten werden.

Abkürzungen:

Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäuren
ATP	Adenosintriphosphat
BCIP	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphat
BDGP	Berkeley <i>Drosophila</i> Genome Project
BSA	Rinderserumalbumin
bp	Basenpaar(e)
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
cDNA	complementaryDNA
CTP	Cytosintriphosphat
DAB	3,3'-Diaminobenzidintetrahydrochlorid
DIG	Digoxigenin
d.h.	das heißt
DNA	Desoxynucleinacid (Desoxyribonukleinsäure)
DNase	Desoxyribonuklease
EDTA	Ethylendiaminotetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis-(beta-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
<i>et al.</i>	<i>et aliter</i>
evtl.	eventuell
GFP	Green Fluorescent Protein
GTP	Guanosintriphosphat
kb	Kilobasenpaar(e)
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
mg	Milligramm
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
mRNA	messengerRNA (Boten-RNA)
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NBT	4-Nitroblautetrazoliumchlorid
OD	Optische Dichte
ORF	Open Reading Frame (Offener Leserahmen)
PCR	Polymerase-Chain-Reaction (Polymerase-Ketten-Reaktion)
RNA	Ribonucleinacid (Ribonukleinsäure)
RNase	Ribonuklease
rpm	rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
SDS	Natriumlaurylsulfat
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TritonX-100	Octylphenolpolyethylenglycolether
Tween20	Polyoxyethylensorbitanmonolaurat
U	Unit (Einheit)
UAS	Upstream Activation Sequence
UTP	Uraciltriphosphat
UTR	untranslatierte Region einer mRNA
VT	Volumenteil
wt	Wildtyp
ZNS	Zentralnervensystem

5. Zusammenfassung

In der Embryogenese von *Drosophila melanogaster* müssen, wie bei allen anderen höheren Organismen, ineinander greifende Differenzierungsprozesse reguliert ablaufen, damit ein lebensfähiges Individuum entsteht. Bei diesen entwicklungsbiologischen Prozessen spielt die Regulation des korrekten Ablaufes von Zellteilungszyklen und das gerichtete Wachstum von Zellen eine wichtige Rolle.

In einem systematischen Misexpression-Screen zur Identifizierung neuer Faktoren, die das kontrollierte Auswachsen von Muskelzellen beeinflussen wurde ein Gen entdeckt, welches *vielfältig* genannt wurde. Die nachfolgende Charakterisierung ergab, dass das Genprodukt wahrscheinlich am kontrollierten Ablauf der Replikation beteiligt ist.

vielfältig-mRNA und -Protein sind in allen mitotischen Zellen des Embryos nachweisbar. Auch nach Abschluß der Zellteilung bleibt das Protein in ektodermalen Zellen erhalten. Während der Interphase kolokalisiert es mit Chromatin im Zellkern, es dissoziiert jedoch von der DNA, wenn diese sich im Verlauf der Mitose kondensiert und die Kernmembran abgebaut wird.

In *vielfältig*-Mutanten sind größere Kerne als im Wildtypen zu erkennen, die mit einer erhöhten Replikationsrate assoziiert sind. Wahrscheinlich aus Platzmangel an der Oberfläche von Blastoderm-Embryonen werden Kerne ins Innere des Embryos verlagert, es kommt zu Einfaltungen in normalerweise einschichtigen Zellepithel. Vergleichbare Störungen werden nach Behandlung der Embryonen mit *vielfältig*-dsRNA beobachtet. Die Defekte während der Replikation sind nach Reduktion oder gar Wegnahme von *vielfältig*-Aktivität so stark ausgeprägt, dass Schwester-chromatiden nach der Mitose über Chromatinbrücken verbunden bleiben oder keine Teilung mehr durchlaufen werden kann. Aufgrund der beobachteten Phänotypen ist davon auszugehen, dass *Vielfältig* als negativer Regulator der Replikation wirkt. Anhand von zwei Zinkfinger-Motiven im abgeleiteten Protein lässt sich vorhersagen, dass *Vielfältig* eine Bindung mit DNA eingeht. Der Wirkmechanismus der *vielfältig*-Aktivität bleibt jedoch zu untersuchen.

6. Literaturangaben

Abmayr, S.M., Erickson, M.S. and Bour, B. (1995)

Embryonic development of the larval body wall musculature of *Drosophila melanogaster*.
TIG 11: 153-159

Abrams, J.M., White, K., Fessler, L.I. and Steller, H. (1993)

Programmed cell death during *Drosophila* embryogenesis.
Development 117: 29-43

Adams, M.D., and Venter, J.C. (2000)

The genome sequence of *Drosophila melanogaster*.

Adams, R.R.; Maiato, H.; Earnshaw, W.C. and Carmena, M. (2001)

Essential roles of *Drosophila* inner centromere protein (INCENP) and Aurora B in histone H3 phosphorylation, metaphase chromosome alignment, kinetochor disjunction, and chromosome segregation.
J. Cell Biol. 153: 865-879

Aerne, B.L.; Johnson, A.L.; Toyn, J.H. and Johnston, L.H. (1998)

Swi5 controls a novel wave of cyclin synthesis in late mitosis.
Mol. Biol. Cell 9: 945-956

Ahmad, K. and Henikoff, S. (2001)

Modulation of a transcription factor counteracts heterochromatic gene silencing in *Drosophila*.
Cell 104: 839-847

Anant, S., Roy, S. and VijayRaghavan, K. (1998)

Twist and Notch negatively regulate adult muscle differentiation in *Drosophila*.
Development 125: 1361-1369

Artero, R., Prokop, A., Paricio, N., Begemann, G., Pueyo, I., Mlodzik, M., Perez-Alonso, M. and Baylies, M.K. (1998)

The *muscleblind* gene participates in the organisation of Z-bands and epidermal attachments of *Drosophila* muscles and is regulated by *Dmef2*.
Dev. Biol. 195: 131-143

Audibert, A., Debec, A. and Simonelig, M. (1996)

Detection of mitotic spindles in third-instar imaginal discs of *Drosophila melanogaster*.
TIG 12: 452-453

Baonza, A. and Garcia-Bellido, A. (2000)

Notch signaling directly controls cell proliferation in the *Drosophila* wing disc.
P.N.A.S. 14: 2609-2614

Baonza, A.; de Celis, J.F. and Garcia-Bellido, A. (2000)

Relationships between *extramacrochaetae* and *Notch* signalling in *Drosophila* wing development.
Development 127: 2383-2393

Bate, M. and Martinez-Aias, A. (1993)

The development of *Drosophila melanogaster*.
Cold Spring Harbor Laboratory Press

Becker, S., Pasca, G., Strumpf, D., Min, L. and Volk, T. (1997)

Reciprocal signalling between *Drosophila* epidermal muscle attachment cells and their corresponding muscles.
Development 124: 2615-2622

Berdnik, D. and Knoblich, J.A. (2002)

Drosophila Aurora-A is required for centrosome maturation and actin-dependent asymmetric protein localization during mitosis.
Current Biology 12, 640-647

Bhat, M.A.; Philip, A.V.; Glover, D.M. and Bellen, H.J. (1996)

Chromatid segregation at anaphase requires the *barren* product, a novel chromosome associated protein that interacts with topoisomerase II.
Cell 87: 1103-1114

Bier, E.; Yan, L.Y. and Jan Y.N. (1990)

rhomboid, a gene required for dorsoventral axis establishment and peripheral nervous system development in *Drosophila melanogaster*.
G&D 4: 190-203

Brennan, K.; Baylies, M. and Martinez-Arias, A. (1999)

Repression by Notch is required before Wingless signalling during muscle progenitor cell development in *Drosophila*.
Current Biology 9: 707-710

Brose, K., Bland, K.S., Wang, H.K., Arnott, D., Henzel, W., Goodman, C.S., Tessier-Lavigne, M. and Kidd, T. (1999)

Slit proteins bind Robo receptors and have an evolutionarily conserved role in repulsive axon guidance.
Cell 96: 795-806

Bour BA, Chakravarti M, West JM, Abmayr SM. (2000)

Drosophila SNS, a member of the immunoglobulin superfamily that is essential for myoblast fusion.
G&D 14:1498-511.

Buff, E., Carmena, A., Gisselbrecht, S., Jimenez, F. and Michelson, A. M. (1998)

Signaling by the *Drosophila* growth factor receptor is required for the specification and diversification of embryonic muscle progenitors.
Development 125: 2075-2086

Burchart, S., Paululat, A., Hinz, U. and Renkawitz-Pohl, R. (1995)

The mutant *not enough muscles (nem)* reveals reduction of the *Drosophila* embryonic muscle pattern.
J. Cell Science 108: 1443-1454

Buttgereit, D.; Paululat, A and Renkawitz-Pohl, R. (1996)

Muscle development and attachment to the epidermis is accompanied by expression of $\beta 3$ and $\beta 1$ tubulin isotypes, respectively.
Int.J.Dev.Biol. 40: 189-196

Callahan, C.A., Bonkovsky, J.L., Scully, A.L. and Thoma, J.B. (1996)

derailed is required for muscle attachment site selection in *Drosophila*.
Development 122: 2761-2767

Carmena, A., Gisselbrecht, S., Harrison, J., Jimenez, F. and Michelson, A.M. (1998)

Combinatorial signaling codes for the progressive determination of cell fates in the *Drosophila* embryonic mesoderm.
G&D 12: 3910-3922

Charroux, B., Angelats, C., Fasano, L., Kerridge, S. and Vola, C. (1999)

The levels of the *bancal* product, a *Drosophila* homologue of vertebrate hn RNP K protein, affect cell proliferation and apoptosis in imaginal disc cells.
Mol. And Cell. Biol. 19: 7846-7856

- Chen, X., Reynolds, E.R., Ranganayakulu, G. and O'Donnel, J.M. (1994)**
A maternal product of the *Punch* locus of *Drosophila melanogaster* is required for precellular blastoderm nuclear divisions.
J. Cell Science 107: 3501-3513
- Choo, Y. and Klug, A. (1997)**
Physical basis of a protein-DNA recognition code.
Cur. Opinion in Str. Biol. 7: 117-125
- Clarkson, M.J., Wells, J.R.E., Gibson, F., Saint, R and Tremethick, D.J. (1999)**
Regions of variant histone His2Avd required for *Drosophila* development.
NATURE 399: 694-697
- Cooley, L., Kelley, R. and Spradling, A. (1988)**
Insertional mutagenesis of the Drosophila genome with single P-elements.
SCIENCE 239: 1121-1128
- Cossu, G., Tajbakhsh, S. and Buckingham, M. (1996)**
How is myogenesis initiated in the embryo?
TIG 12(6): 218-222
- Crevel, G.; Huikeshoven, H. and Cotterill, S. (1997)**
Molecular and cellular characterization of CRP1, a *Drosophila* chromatin decondensation protein.
J. Struc. Biol. 118: 9-22
- Crevel, G.; Huikeshoven, H. and Cotterill, S. (2000)**
Df31 is a novel nuclear protein involved in chromatin structure in *Drosophila melanogaster*.
J. Cell Science 114: 37-47
- Crozatier, M. and Vincent, A. (1999)**
Requirement for the *Drosophila* COE transcription factor Collier in formation of an embryonic muscle: transcriptional response to Notch signalling.
Development 126: 1495-1504
- Dai, H., Hogan, C., Gopalakrishnan, B., Torrez-Vasquez J., Ngyen, M, Park, S., Raftery, L.A., Warrior, R. and Arora K. (2000)**
The zinc finger protein Schnurri acts as a Smad partner in mediating the transcriptional response to *decapentaplegic*.
Dev. Biol. 227: 373-387
- Damm, C.; Wolk, A.; Buttgerit, D.; Löher, K.; Wagner, E.; Lilly, B.; Olson, E.N.; Hasenpusch-Theil, K. and Renkawitz-Pohl, R. (1998)**
Independent regulatory elements in the upstream region of the *Drosophila* $\beta 3$ tubulin gene (*β Tub60D*) guide expression in the dorsal vessel and the somatic muscles.
Dev. Biol. 199: 138-149
- DePamphilis, M.L. (2000)**
Review: Nuclear structure and DNA replication.
J. Str. Biol. 129: 186-197
- Doberstein; S.K.; Fetter, R.D.; Mehta, A.Y. and Goodman, C.S. (1997)**
Genetic analysis of myoblast fusion: *blown fuse* is required for progression beyond the prefusion complex.
J. Cell Biol. 136: 1249-1261
- Duan, H., Skeath, J.B. and Ngyen, H.T. (2001)**
Drosophila *Lame duck*, a novel member of the Gli superfamily, acts as a key regulator of myogenesis by controlling fusion-competent myoblast development.
Development 128: 4489-4500

Edgar, B.A. and Schubiger, G. (1986)

Parameters controlling transcriptional activation during early *Drosophila* development.
Cell 44: 871-877

Edgar, B.A. and Datar, S.A. (1996)

Zygotic degradation of two maternal Cdc25 mRNAs terminates *Drosophila*'s early cell cycle program.
G&D 10: 1966-1977

Edgar, B.A. and Lehner, C.F. (2000)

Developmental Control of cell cycle regulators. A fly's perspective.
SCIENCE 274: 1646-1658

Elbashir S.M.; Harborth, J., Lendeckel, W.; Yalcin, A.; Weber, K. and Tuschl, T. (2001)

Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells.
NATURE 411: 494-498

Ericson, 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, and cytoskeletal organisation.
J. of Cell Biol. 138: 589-603

Faguy, D.M. and Doolittle, W.F. (1998)

Cytoskeletal proteins: The evolution of cell division.
Curr. Biol. 8: R338-R341

Farkas, G., Leibovitch, B.A. and Elgin, S.C.R. (2000)

Chromatin organization and transcriptional control of gene expression in *Drosophila*.
Gene 253: 117-136

Ferguson, E.L., and Anderson, K.V. (1991)

Dorsal-ventral pattern formation in the *Drosophila* embryo: the role of zygotically active genes.
Curr. Top. Dev. Biol. 25: 17-43

Foe, V.E. and Alberts, B.M. (1983)

Studies of nuclear and cytoplasmic behaviour during the five mitotic cycles that precede gastrulation in *Drosophila* embryogenesis.
J. Cell. Science 61: 31-70

Foe, V.E., Odell, G.M. and Edgar, B.A. (1993)

The development of *Drosophila melanogaster*. Chapter 3:
Mitosis and morphogenesis in the *Drosophila* embryo.
Cold Spring Harbor Laboratory Press

Foe, V.E.; Field, C.M. and Odell, G.M. (2000)

Microtubules and mitotic cycle phase modulate spatiotemporal distributions of F-actin and myosin II in *Drosophila* syncytial blastoderm embryos.
Development 127: 1767-1787

Fogarty, P.; Kalpin, R.F. and Sullivan, W. (1994)

The *Drosophila* maternal-effect mutation *grapes* causes a metaphase arrest at nuclear cycle 13.
Development 120: 2131-2142

Foley, E. and Sprenger, F. (2001)

The cyclin-dependent kinase inhibitor Roughex is involved in mitotic exit in *Drosophila*.
Current Biology 11: 151-160

Frasch, M. (1995)

Induction of visceral cardiac mesoderm by ectodermal Dpp in the early *Drosophila* embryo.
NATURE 374: 464-467

- Frasch, M. and Leptin, M. (2000)**
 Merger and acquisitions: Unequal partnership in *Drosophila* myoblast fusion.
Cell 102: 127-129
- Frenz, L.M. and Glover, D.M. (1996)**
 A maternal requirement for glutamine synthetase I for the mitotic cycles of syncytial *Drosophila* embryos.
J. Cell Science 109: 2649-2660
- Friesen, W.J. und Darby, M.K. (2001)**
 Specific RNA binding by a single C₂H₂ zinc finger.
J.Biol.Chem. 276: 1968-1973
- Frömmer, G., Vorbrüggen, G., Pasca, G., Jäckle, H. and Volk, T. (1996)**
 Epidermal egr-like zinc finger protein of *Drosophila* participates in myotube guidance.
EMBO 15: 1642-1649
- Furlong, E.E.M., Andersen, E.C., Null, B., White, K.P. and Scott, M.P. (2001)**
 Patterns of gene expression during *Drosophila* mesoderm development.
ScienceExpress 2
- Fyodorov D.V. and Kadonaga J.T. (2001)**
 The many faces of chromatin remodeling: SWItching beyond transcription.
Cell 106: 523-525
- Gabay, L., Seger, R. and Shilo, B.-Z. (1997)**
 In situ activation pattern of *Drosophila* EGF receptor pathway during development.
Science 277: 1103-1106
- Gemkow, M.J.; Dichter, J. and Arndt-Jovin, D. (2001)**
 Developmental regulation of DNA-topoisomerases during *Drosophila* embryogenesis.
Exp. Cell Research 262: 114-121
- Gergely, F.; Kidd, D.; Jeffers, K.; Wakefield, J.G. and Raff, J.W. (2000)**
 D-TACC: a novel centrosomal protein required for normal spindle function in the early *Drosophila* embryo.
EMBO 19: 241-252
- Giebel, B. (1999)**
 The Notch signaling pathway is required to specify muscle progenitor cells in *Drosophila*.
MOD 86: 137-145
- Giet, R. and Glover, D.M. (2001)**
Drosophila Aurora B kinase is required for histone H3 phosphorylation and condensin recruitment during chromosome condensation and to organize the central spindle during cytokinesis.
J. Cell Biol. 152: 669-681
- Gilbert, D.M. (2001)**
 Nuclear position leaves its mark on replication timing.
J. Cell Biol. 152: F11-F15
- Gisselbrecht, S.; Skeath, J.; Doe, C.Q. and Michelson, A.M.(1996)**
heartless encodes a fibroblast growth factor receptor (DFR1/DFGF-F2) involved in the directional migration of early mesodermal cells in the *Drosophila* embryo.
G&D 10: 3003-3017
- Golembo, M; Yarntzky, T.; Volk, T. (1999)**
 Vein expression is induced by the EGF receptor pathway to provide a positive feedback loop in patterning the *Drosophila* embryonic ventral ectoderm.
G&D 13: 158-162

- Gossen, M, Pak, D.T., Hansen, S.K., Archarya, J.K. and Botchan, M.R. (1995)**
A *Drosophila* homolog of the yeast origin recognition complex.
SCIENCE 270: 1585-1587
- Goto, H., Yasui, Y., Nigg, E.A. and Inagaki, M. (2002)**
Aurora-B phosphorylates Histone H3 at serine 28 with regard to the mitotic chromosome condensation.
Genes Cells. 7: 11-17
- Gotwals, P.J., Paine-Saunders, S.E., Stark, K.A. and Hynes, R.O. (1994)**
Drosophila integrins and their ligands.
Curr, Opin. Cell Biol. 6: 734-739
- Goubeaud, A.; Knirr, S.; Renkawitz-Pohl, R. and Paululat, A. (1996)**
The *Drosophila* gene *alien* is expressed in the muscle attachment sites during embryogenesis and encodes a protein highly conserved between plants, *Drosophila* and vertebrates.
MOD 57: 59-68
- Gregory, S.L. and Brown, N.H. (1998)**
kakapo, a gene required for adhesion between and within cell layers in *Drosophila*, encodes a large cytoskeletal linker protein related to plectin and dystrophin.
J. of Cell Biol. 143: 1271-1282
- Grenningloh, G., Rehm, E.J. and Goodman, C.S. (1991)**
Genetic analysis of growth cone guidance in *Drosophila*; fasciclin II functions as a neuronal recognition molecule.
Cell 67: 45-57
- Halfon, M.S., Hashimoto, C. and Keshishian, H. (1995)**
The *Drosophila toll* gene functions zygotically and is necessary for proper motoneuron and muscle development.
Dev. Biol. 169: 151-167
- Halfon, M.S and Keshishian, H. (1998)**
The *toll* pathway is required in the epidermis for muscle development in the *Drosophila* embryo.
Dev. Biology 199: 164-174
- Hamburger, V. and Hamilton, H.L (1951)**
A series of normal stages in the development of a chick.
J. Morph. 88: 49-92
- Hans, F. and Dimitrov, S. (2001)**
Histone H3 phosphorylation and cell division.
Oncogene 20: 3021-3027
- Hausen, P and Riebesell, H. (1991)**
The early development of *Xenopus laevis*.
Berlin: Springer-Verlag
- Hari, K.L., Cook, K.R. and Karpen, G.H. (2001)**
The *Drosophila* Su(var)2-10 locus regulates chromosome structure and function and encodes a member of the PIAS protein family.
G&D 15: 1334-1348
- Hoch, M. and Jäckle, H. (1995)**
Metamerisierung im *Drosophila*-Embryo: Faktoren, Mechanismen und Perspektiven.
Biospektrum 5: 22-33
- Huang, J.-y. and Raff, J.W. (1999)**
The disappearance of cyclin B at the end of mitosis is regulated spatially in *Drosophila* cells.
EMBO 18: 2184-2195

- Ito T.; Tyler, J.K., Bulger, M., Kobayashi, R. and Kadonaga J.T. (1996)**
ATP-facilitated chromatin assembly with a Nucleoplasmin-like protein from *Drosophila melanogaster*.
J. Biol. Chem. 271: 25041-25048
- Ito, T., Bulger, M., Kobayashi, R. and Kadonaga, J.T. (1996)**
Drosophila NAP-1 is a core histone chaperone that functions in ATP-facilitated assembly of regulatory spaced nucleosomal arrays.
MCB 16: 3112-3122
- Iuchi, S (2001)**
Three classes of C2H2 zinc finger proteins.
CMLS 58: 625-635
- Jacobs, H.W.; Knolich, J. A. and Lehner C.F. (1998)**
Drosophila Cyclin B3 is required for female fertility and is dispensable for mitosis like Cyclin B.
G&D 12: 3741-3751
- Jagla, T., Bellard, F., Lutz, Y., Dretzen, G., Bellard, M. and Jagla, K. (1998)**
ladybird determines cell fate decisions during diversification of *Drosophila* somatic muscles.
Development 125: 3699-3708
- Jones K.A. and Kadonaga J. T. (2000)**
Exploring the transcription-chromatin interface.
G&D 14: 1992-1996
- Kaufman, M.H. (1992)**
The atlas of mouse development.
London: Academic Press
- Keller , C.A., Erickson, M.S. and Abmayr, S.M. (1997)**
Misexpression of *nautilus* induces myogenesis in cardioblasts and alters the pattern of somatic muscle fibers.
Dev. Biol. 181: 197-212
- Kidd, T., Bland, K.S. and Goodman, C.S. (1999)**
Slit is the midline repellent for the Robo receptor in *Drosophila*.
Cell 96: 785-794
- Kimmel, C.B., Ballard, W.W., Kimmel, S.R., Ullmann, B. and Schilling, T.F. (1995)**
Stages of embryonic development of the zebrafish.
Dev. Dynam. 203: 253-310
- Kornberg, T., Siden, I., O'Farrell, P. and Simon, M. (1985)**
The engrailed locus of Drosophila: in situ localization of transcripts reveals compartment-specific expression.
Cell 40: 45-53
- Knirr, S., Breuer, S., Paululat, A. and Renkawitz-Pohl, R. (1997)**
Somatic mesoderm differentiation and the development of a subset of pericardial cells depend on the *not enough muscles (nem)* locus, which contains the *inscutable* gene and the intron located gene, *skittles*.
MOD 67: 69-81
- Knirr, S., Azpiazu, N. and Frasch, M. (1999)**
The role of the NK-homeobox gene *slouch (S59)* in somatic muscle patterning.
Development 126: 4525-4535
- Kramer, S.G.; Kidd, T.; Simpson, J.H. and Goodman, C.S. (2001)**
Switching repulsion to attraction: Changing responses to Slit during transition in mesoderm migration.
SCIENCE 292: 737-740

- Krause, S.A., Loupart, M.-L., Vass, S., Schoenfelder, S., Harrison, S. and Heck, M.M.S. (2001)**
Loss of cell cycle checkpoint control in *Drosophila* Rfc4 mutants.
MCB 21: 5156-5168
- Krude, T. and Keller, C. (2001)**
Chromatin assembly during S phase contributions from histone deposition, DNA replication and cell division cycle.
CMLS 58: 665-672
- Lam G. and Thummel, C.S. (2000)**
Inducible expression of double-stranded RNA directs specific genetic interference in *Drosophila*.
Current Biology 10: 957-963
- Leiss, D.; Hinz, U.; Gasch, A.; Mertz, R. and Renkawitz-Pohl, R. (1988)**
 $\beta 3$ tubulin expression characterizes the differentiating mesodermal germ layer during *Drosophila* embryogenesis.
Development 104: 525-531
- Leptin, M. and Grunewald B. (1990)**
Cell shape changes during gastrulation in *Drosophila*.
Development 110: 73-84
- Levenstein, M.E. and Kadonaga, J.T. (2002)**
Biochemical analysis of chromatin containing recombinant *Drosophila* core histones.
JBC 277: 8749-8754
- Lilly, B., Zhao, B., Ranganayakulu, G., Paterson, B.M., Schulz, R.A. and Olson, E.N. (1995)**
Requirement of MADS domain transcription factor D-MEF2 for muscle formation in *Drosophila*.
SCIENCE 267: 688-692
- Lin, H., Yue, L. and Spradling, A. (1994)**
The *Drosophila* fusome, a germline-specific organelle, contains membrane skeletal proteins and functions in cyst formation.
Development 120: 947-956
- Lin, H. and Spradling, A.C. (1995)**
Fusome asymmetry and oocyte determination in *Drosophila*.
Dev. Genetics 16: 6-12
- Lo, P.C.H. and Frasch, M (1999)**
Sequence and expression of *myoglianin*, a novel *Drosophila* gene of the TGF- β superfamily.
MOD 86: 171-175
- Martin-Bermudo, M.D. and Brown, N.H. (1999)**
Uncoupling integrin adhesion and signaling: the β PS cytoplasmatic domain is sufficient to regulate gene expression in the *Drosophila* embryo.
G&D 13: 729-739
- Martin-Bermudo, M.D. (2000)**
Integrins modulate the Egfr signaling pathway to regulate tendon cell differentiation in the *Drosophila* embryo.
Development 127: 2607-2615
- Martinez-Arias, A. and Lawrence, P.A. (1985)**
Parasegments and compartments in the *Drosophila* embryo.
NATURE 313: 639-642
- McCartney, B.M., McEwen, D.G., Grevengoed, E., Maddox, P., Bejsovec, A. and Peifer, M. (2001)**
Drosophila APC2 and Armadillo participate in tethering mitotic spindles to cortical actin.
NATURE Cell Biol. 3: 933-938

- Menon, S.D. and Chia, W. (2001)**
Drosophila rolling pebbles: a multidomain protein required for myoblast fusion that recruits D-Titin in response to the myoblast attractant Dumbfounded.
Dev. Cell. 1: 691-703.
- Michelson, A.M. (1994)**
Muscle pattern diversification in *Drosophila* is determined by the autonomous function of homeotic genes in the embryonic mesoderm.
Development 120: 755-768
- Michelson, A.M., Gisselbrecht, S., Buff, E. and Skeath, J.B. (1998)**
Heartbroken is a specific downstream mediator of FGF receptor signalling in *Drosophila*.
Development 125: 4379-4389
- Michelson, A.M., Gisselbrecht, S., Zhou, K.H. and Buff, E.M. (1998)**
Dual functions of the *heartless* fibroblast growth factor receptor in development of the *Drosophila* embryonic mesoderm.
Dev. Genet. 22: 212-229
- Milan, M., Campuzano, S. and Garcia-Bellido, A. (1997)**
Developmental parameters of cell death in the wing disc of *Drosophila*.
PNAS 94: 5691-5696
- Mulligan, P.K. and Rasch, E.M. (1985)**
Determination of DNA content in the nurse and follicle cells from wild type and mutant *Drosophila melanogaster* by DNA-Feulgen cytophotometry.
Histochemistry 82: 233-247
- Murugasu-Oei, B., Rodrigues, V., Yang, X. and Chia, W. (1995)**
Masquerade: a novel secreted serine protease-like molecule is required for somatic muscle attachment in the *Drosophila* embryo.
G&D 9: 139-154
- Nabel-Rosen, H.; Dorevitch, N.; Reuveny, A. and Volk, T. (1999)**
The balance between two isoforms of the *Drosophila* RNA-binding protein How controls tendon cell differentiation.
Mol. Cell 4: 573-584
- Nabel-Rosen, H., Volohonsky, G., Reuveny, A. Zaidel-Bar, R. and Volk, T. (2002)**
Two isoforms of the *Drosophila* RNA binding protein, Ho, act in opposing directions to regulate tendon cell differentiation.
Dev. Cell 2: 183-193
- Nakao, M. (2001)**
Epigenetics: interaction of DNA methylation and chromatin.
Gene 278: 25-31
- Nolan, K.M., Barret, 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 signaling pathway utilized for multiple developmental processes.
G&D 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
- Nüsslein-Volhard, C. (1991)**
Determination of the embryonic axes of *Drosophila*.
Dev. Suppl. 1: 1-10

- O'Connell, M.J. and Nurse, P. (1994)**
How cells know that they are in G1 or G2.
Curr. Opin. Cell Biol. 6: 867-871
- Olson, E.N. and Rosenthal, N. (1994)**
Homeobox genes and muscle patterning.
Cell 79: 9-12
- Paddy, M.R.; Saumweber, H; Agard, D.A. and Sedat, J.W. (1996)**
Time-resolved, in vivo studies of mitotic spindle formation and nuclear lamina breakdown in *Drosophila* early embryos.
J. Cell Science 109: 591-607
- Pankratz, M.J. and Jäckle, H. (1990)**
Making stripes in the *Drososopha* embryo.
TIG 6: 287-292
- Pankratz, M.J., Seifert, E., Gerwin, N., Billi, B., Nauber, U. and Jäckle, H. (1990)**
Gradients of *Krüppel* and *knirps* gene products direct pair-rule gene stripe patterning in the posterior region of the *Drosophila* embryo.
Cell 61: 309-317
- Paululat, A.; Burchard, S. and Renkawitz-Pohl (1995)**
Fusion from myoblasts to myotubes is dependent on the *rolling stone* gene (*rost*) of *Drosophila*.
Development 121: 2611-2620
- Paululat A, Goubeaud A, Damm C, Knirr S, Burchard S, Renkawitz-Pohl R. (1997)**
The mesodermal expression of *rolling stone* (*rost*) is essential for myoblast fusion in *Drosophila* and encodes a potential transmembrane protein.
J. Cell Biol. 138: 337-48.
- Paululat, A., Holz, A. and Renkawitz-Pohl, R. (1999)**
Essential genes for myoblast fusion in *Drosophila* embryogenesis.
MOD 83: 17-26
- Peter, A., ...and Schäfer, U. (2002)**
Mapping and identification of essential gene functions on the X-chromosome of *Drosophila*.
EMBO 3: 34-38
- Piepenburg, O., Vorbrüggen, G. and Jäckle, H. (2000)**
Drosophila segment borders result from unilateral repression of *hedgehog* activity by *wingless* signaling.
Mol. Cell 6: 203-209
- Preiss, A., Rosenberg, U.B., Kienlin, A., Seifert, E. and Jäckle, H. (1985)**
Molecular analysis of *Krüppel*, a gene required for segmentation in *Drosophila melanogaster*.
NATURE 13: 27-32
- Quinn, L.M., Herr, A., McGarry, T.J. and Richardson, H. (2001)**
The *Drosophila* Geminin homolog: roles for Geminin in limiting DNA replication, in anaphase and in neurogenesis.
G&D 15: 2741-2754
- Qumsiyeh M.B. (1999)**
Structure and function of the nucleus: anatomy and physiology of chromatin.
CMLS 55: 1129-1140

Rau, A., Buttgerit, D., Holz, A., Fetter, R., Doberstein, S.K., Paululat, A., Staudt, N., Skeath, J., Michelson, M., Renkawitz-Pohl, R. (2001)

rolling pebbles (rols) is required in *Drosophila* muscle precursor for recruitment of myoblasts for fusion.

Development 128: 5061-5073

Rodgers, K.K., Bu, Z., Fleming, K.G., Schatz, D.G., Engelmann, D.M. and Coleman, J.E. (1996)

A zinc-binding domain involved in the dimerization of RAG1.

J.Mol.Biol. 260: 70-84

Rorth, P. (1996)

A modular misexpression screen in *Drosophila* detecting tissue-specific phenotypes.

P.N.A.S. 93: 12418-12422

Rorth, P. (1998)

Gal4 in the *Drosophila* female germline.

MOD 78: 113-118

Rorth, P., Szabo, K., Bailey, A., Laverty, T., Rehm, J., Rubin, G.M., Weigmann, K., Milan, M., Benes, V., Ansorge, W. and Cohen, S.M. (1998)

Systematic gain-of-function genetics in *Drosophila*.

Development 125: 1049-1057

Rosenberg, U.B., Preiss, A., Seifert, E., Jäckle, H. and Knipple, D.C. (1985)

Production of phenocopies by *Krüppel* antisense RNA injection into *Drosophila* embryos.

NATURE 313: 703-706

Roy, S. and VijayRaghavan, K. (1997)

Homeotic genes and the regulation of myoblast migration, fusion, and fibre-specific gene expression during adult myogenesis in *Drosophila*.

Development 124: 3333-3341

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

Ruiz-Gomez, M., Romani, S., Hartmann, C., Jäckle, H. and Bate, M. (1997)

Specific muscle identities are regulated by *Krüppel* during *Drosophila* embryogenesis.

Development 124: 3407-3414

Ruiz-Gomez, M., Coutts, N., Price, A., Taylor, M.V. and Bate, M. (2000)

Drosophila dumbfounded: a myoblast attractant essential for fusion.

Cell 102:189-98.

Ruiz-Gomez, M., Coutts, N., Suster, M.L., Landgraf, M. and Bate, M. (2002)

myoblast incompetent encodes a zinc finger transcription factor required to specify fusion-competent myoblasts in *Drosophila*.

Development 129: 133-141

Salzberg, A., Golden, K., Bodmer, R. and Bellen, H.J. (1996)

gutfeeling, a *Drosophila* gene encoding an antizyme-like protein, is required for late differentiation of neurons and muscles.

Genetics 144: 183-196

Sharp, P.A. (2001)

RNA interference-2001.

G&D 15: 485-490

- Schweisguth, F., Vincent, A. and Lepasant, J.A. (1991)**
Genetic analysis of the cellularization of the *Drosophila* embryo.
Biol. Cell. 72: 15-23
- Shishido, E., Ono, N., Kojima, T. and Saigo, K. (1997)**
Requirements of DFR1/Heartless, a mesoderm-specific *Drosophila* FGF-receptor, for the formation of heart, visceral and somatic muscles, and ensheathing of longitudinal axon tracts in CNS.
Development 124: 2119-2128
- Simon, J.A. and Tamkun, J.W. (2002)**
Programming off and on states in chromatin: mechanisms of Polycomb and trithorax group complexes.
Curr. Opin. Genet. Dev. 12: 210-218
- Spradling, A.C. and Rubin, G.M. (1982)**
Transposition of cloned P elements into *Drosophila* germline chromosomes.
SCIENCE 218: 341-347
- Stack, S.M. and Anderson, L.K. (2001)**
A model for chromosome structure during the mitotic and meiotic cell cycles.
Chromosome Research 9: 175-198
- Steffensen, S., Coelho, P.A., Cobbe, N., Vass, S., Costa, M., Hassan, B., Prokopenko, S.N., Bellen, H., Heck, M.M. and Stunkel, C.E. (2001)**
A role for *Drosophila* SMC4 in the resolution of sister chromatids in mitosis.
Curr. Biol. 11: 295-307
- Stevenson, V.A.; Kramer, J.; Kuhn, J. and Theurkauf, W.E. (2000)**
Centrosomes and the Scrambled protein coordinate microtubule-independent actin reorganization.
Nature Cell Biol. 3: 68-75
- Strumpf, D. and Volk, T. (1998)**
Kakapo, a Novel cytoskeletal-associated protein is essential for the restricted localization of the neuregulin-like factor, Vein, at the muscle-tendon junction site.
J. of Cell Biol. 143: 1259-1270
- Su, T.T.; Sprenger, F.; DiGregorio, P.J.; Campbell, S.D. and O'Farrell, P.H. (1998)**
Exit from mitosis in *Drosophila* syncytial embryos requires proteolysis and cyclin degradation, and is associated with localized dephosphorylation.
G&D 12: 1495-1503
- Tepass, U., Theres, C. and Knust, E. (1990)**
crumbs encodes an EGF-like protein expressed on apical membranes of *Drosophila* epithelial cells and required for organization of epithelia.
Cell 61: 787-799
- Tio, M.; Udolph, G.; Yang, X. and Chia, W. (2001)**
cdc2 links the *Drosophila* cell cycle and asymmetric division machineries.
NATURE 409: 1063-1067
- Uhlmann, F. (2001)**
Chromosome condensation: Packaging the genome.
Cur. Biol. 11: R384-R387
- Umemiya, T., Takeichi, M. and Nose, A. (1997)**
M-spondin, a novel ECM protein highly homologous to vertebrate F-spondin, is localized at the muscle attachment sites in the *Drosophila* embryo.
Dev. Biol. 186: 165-176

Vidwans, S.J. and O'Farrell, P.H. (1999)

Centrosom-in absentia.
Curr. Biol. 9: 764-766

Volk, T. and VijayRaghavan, K. (1994)

A central role for epidermal segment border cells in the induction of muscle patterning in the *Drosophila* embryo.
Development 120: 59-70

Volk, T. (1999)

Singling out *Drosophila* tendon cells.
TIG 15: 448-453

Vorbrüggen, G.; Constien, R.; Zilian, O.; Wimmer, E.A.; Dowe, G.; Taubert, H.; Noll, M. and Jäckle, H. (1997)

Embryonic expression and characterization of a Ptx1 homolog in *Drosophila*.
MOD 68: 139-147

Vorbrüggen, G. and Jäckle, H. (1997)

Epidermal muscle attachment site specific target gene expression and interference with myotube guidance in response to ectopic *stripe* expression in the developing *Drosophila* epidermis.
P.N.A.S. 94: 8606-8611

Wakefield, J.G.; Bonaccorsi, S. and Gatti, M. (2001)

The *Drosophila* protein Asp is involved in microtubule organization during spindle formation and cytokinesis.
J. Cell Biol. 153: 637-647

Walker, D.L.; Wang, D.; Jin, Y.; Rath, U.; Wang, Y.; Johansen, J. and Johansen, K.M. (2000)

Skeletor, a novel chromosomal protein that redistributes during mitosis provides evidence for the formation of a spindle matrix.
J. Cell Biol. 151: 1401-1411

Whittaker, A.J.; Royzman, I. And Orr-Weaver T.L. (2000)

Drosophila Double parked: a conserved, essential replication protein that colocalizes with the origin recognition complex and links DNA replication with mitosis and the down-regulation of S phase transcripts.
G&D 14: 1765-1776

Wieschaus, E., Nüsslein-Volhard, C. and Kluding, H. (1984)

Krüppel, a gene whose activity is required early in the zygotic genome for normal embryonic segmentation.
Dev. Biol. 104: 172-186

Williams, G.J. and Caveney, S. (1980)

Changing muscle patterns in a segmental epidermal field.
J. Emb. Exp. Morph. 58: 13-33

Yarnitzky, T; Min, L. and Volk, T. (1997)

The *Drosophila* neuregulin homolog Vein mediates inductive interactions between myotubes and their epidermal attachment cells.
G&D 11: 2691-2700

Yarnitzky, T., Min, L. and Volk, T. (1998)

An interplay between two EGF-receptor ligands, Vein and Spitz, is required for the formation of a subset of muscle precursors in *Drosophila*.
MOD 79: 73-82

Yu, K.R.; Saint, R.B. and Sullivan, W. (2000)

The Grapes checkpoint coordinates nuclear envelope breakdown and chromosome condensation.
NATURE Cell Biol. 2: 609-615

Zervas, C.G.; Gregory, S.L. and Brown, N.H. (2001)

Drosophila integrin-linked kinase is required at sites of integrin adhesion to link the cytoskeleton to the plasma membrane.

J. Cell Biol. 152: 1007-1018

Zink, D and Paro, R. (1995)

Drosophila Polycomb-group regulated chromatin inhibits the accessibility of a trans-activator to its target DNA.

EMBO 14: 5660-56671

Zinn, K. and Qi, S. (1999)

Slit branches out: A secreted protein mediates both attractive and repulsive axon guidance.

Cell 97: 1-4

Lebenslauf

09.08.1974	Geburt in Herborn Eltern: Fritz und Gertrud Staudt, geb. Pfeiffer
1980-1984	Diesterweg-Grundschule Herborn
1984-1993	Johanneum-Gymnasium Herborn
1993	Abiturprüfungen und Erlangen der Allgemeinen Hochschulreife
1993-1998	Diplom-Studium der Biologie an der Philipps-Universität Marburg
1993-1995	Grundstudium
April 1995	Vorgezogene Vordiplomsprüfungen in Chemie und Physik
Oktober 1995	Vordiplomsprüfungen in den Fächern Zoologie und Botanik
1995-1998	Hauptstudium
Oktober 1997	Diplomprüfungen Hauptfach: Zoologie- Entwicklungsbiologie Nebenfächer: Genetik, Mikrobiologie, Pharmakologie
Dez. 1997-Nov. 1998	Anfertigung einer Diplomarbeit im Hauptfach in der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. Renate Renkawitz-Pohl
November 1998	Abschluss des Studiums durch Erlangen des Diplom-Grades
Dezember 1998	Beginn von molekularbiologischen Promotionsstudien am Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie Göttingen in der Arbeitsgruppe für Molekulare Entwicklungsbiologie unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Herbert Jäckle

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Renate Renkawitz-Pohl für die Übernahme des Erstgutachtens und Herrn Prof. Dr. Herbert Jäckle für die Überlassung des Themas und der Übernahme des des Zweitgutachtens.

Herrn Prof. Dr. Uwe Maier und Herrn Prof. Dr. Michael Bölker danke ich für die Mitgliedschaft in der Prüfungskommission.

Herrn Dr. Gerd Vorbrüggen danke ich für die Betreuung des Projektes.

Sonja Fellert danke ich für die ständige Hilfsbereitschaft und Einarbeitung in Methoden und „Laborgewohnheiten“.

Nina Gerlach, Olaf Piepenburg, Ralf Pflanz, Michael Stauber, Mitsuko Takamori und allen anderen Mitgliedern der Abteilung 170 danke ich für die praktischen Hilfestellungen und für die Diskussionsbereitschaft.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mir diese Arbeit ermöglicht haben.

Die vorliegende Arbeit wurde am Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie in Göttingen in der Abteilung Molekulare Entwicklungsbiologie unter Leitung von Herrn Prof. Dr. Herbert Jäckle angefertigt.

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe.

Göttingen, 08.07.02