

**Regulation und Funktion von *hunchback* in Neuroblasten-  
Zellstammbäumen von *Drosophila melanogaster***

**D i s s e r t a t i o n**

zur Erlangung des Grades

„Doktor der Naturwissenschaften“

am Fachbereich Biologie

der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

vorgelegt von

Ulrike Mettler

geb. in Morbach

**Mainz 2006**

---

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1	Embryonale Neurogenese von <i>Drosophila melanogaster</i> .....	2
1.2	Fragestellung dieser Arbeit .....	9
<b>2</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>10</b>
2.1	Geräte .....	10
2.2	Software .....	11
2.3	Chemikalien und Lösungen.....	12
2.4	Fliegenstämme.....	16
2.5	Fliegenhaltung.....	17
2.6	Genetische Kreuzungen.....	18
2.7	Ektopische Expression von Genen mit Hilfe des GAL4/UAS-Systems .....	18
2.8	Eiablagen .....	19
2.9	Chemische Dechorionisierung der Embryonen .....	20
2.10	Fixierung der Embryonen .....	20
2.11	Antikörperfärbung.....	21
2.12	<i>In situ</i> -Hybridisierung .....	21
2.13	Meerrettich-Peroxidase-Färbung.....	22
2.14	Fluoreszenzfärbung .....	23
2.15	Tyramid-Verstärkungssystem.....	23
2.16	Anfertigen von Präparaten zur mikroskopischen Analyse .....	25
2.16.1	„Whole mount“-Präparate .....	25
2.16.2	Präparate von flach aufpräparierten Embryonen .....	26

2.17	Mikromanipulation .....	27
2.17.1	Vorbereitung der Injektionslösung und des Mikromanipulators.....	27
2.17.2	Vorbereitung der Embryonen und Injektion der Plasmid-DNA.....	28
2.18	Etablieren transgener Fliegenstämme und Bestimmung des Insertions- chromosoms.....	30
2.19	Herstellung der <i>seven-up,prospero</i> -Doppelmutante .....	31
2.20	Quantifizierung der Expressionsstärke der <i>UAS-hb</i> -Konstrukte in den Insertionsstämmen .....	32
2.21	Herstellung der <i>hb</i> - und <i>svp</i> -RNA-Sonden .....	34
2.21.1	<i>In vitro</i> -Transkription .....	34
2.22	Herstellung von Enhancerfragmenten aus der regulatorischen Region von <i>hunchback</i> .....	35
2.23	PCR .....	35
2.23.1	Herstellung der Amplifikate .....	35
2.23.2	PCR zur Bestimmung der Anwesenheit und Orientierung eines Inserts im Vektor .....	36
2.24	Aufreinigung des PCR-Produkts .....	37
2.25	Subklonierung von PCR-Produkten in den Topo-Vektor .....	37
2.26	Generierung eines Desoxyadenosin-Überhangs.....	38
2.27	Gewinnung von Plasmid-DNA.....	38
2.27.1	Präparation von Plasmid-DNA im kleinen Maßstab .....	39
2.27.2	Präparation von Plasmid-DNA im großen Maßstab .....	39
2.28	Konzentrationsbestimmung von Nucleinsäurelösungen.....	39
2.28.1	Photometrische Konzentrationsbestimmung.....	40
2.28.2	Konzentrationsbestimmung mittels Gel-Elektrophorese .....	40
2.29	Restriktion von DNA und verwendete Enzyme.....	40
2.30	Dephosphorylierung .....	41

2.31	Konzentrierung und Aufreinigung von Nucleinsäuren .....	42
2.31.1	Phenol-Chloroform-Extraktion.....	42
2.31.2	Ethanolische Fällung von DNA .....	42
2.31.3	Ethanolische Fällung von RNA .....	43
2.32	Agarosegel-Elektrophorese.....	43
2.33	Gelextraktion .....	44
2.34	Ligation.....	44
2.35	Transformation .....	45
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>46</b>
3.1	Seven-up beendet die Hunchback-positive Phase in Neuroblasten.....	46
3.1.1	Bei Verlust der Seven-up-Funktion wird Hunchback im NB7-3 nicht rechtzeitig abgeschaltet.....	48
3.1.2	Im Zellstammbaum NB6-4T führt der Funktionsverlust von Seven-up zu einer Reduktion von Neuronen, einhergehend mit einer erhöhten Anzahl von Gliazellen. ....	49
3.1.3	In <i>seven-up</i> -Mutanten ist die Anzahl der Hunchback-positiven Neurone im Zellstammbaum NB2-4T erhöht .....	52
3.1.4	In <i>seven-up</i> -Mutanten werden im Zellstammbaum NB7-1 hauptsächlich Zellen generiert, die das Genexpressionsmuster der Nachkommen von GMZ7-1a aufweisen.....	54
3.2	Regulation der Seven-up-Expression.....	55
3.2.1	<i>seven-up</i> -mRNA wird unmittelbar vor der Teilung exprimiert, nach der <i>hunchback</i> im Neuroblasten abgeschaltet wird.....	56
3.2.2	Seven-up-Protein wird sowohl im Neuroblasten als auch der letztgeborenen Hunchback-positiven Ganglienmutterzelle eines Zellstammbaums exprimiert.....	58
3.2.3	Seven-up-Expression in G2-arretierten Neuroblasten .....	61

3.3	Prospero erhält die Hunchback-Expression in Ganglienmutterzellen aufrecht .....	64
3.3.1	In <i>prospero</i> -Mutanten geht die Hunchback-Expression in der erstgeborenen Tochterzelle der Zellstammbäume NB7-3 und NB6-4T verloren .....	66
3.3.2	In Prospero-Mutanten kommt es zu einem Verlust der Hunchback- Expression in GMZ2-4Tb .....	69
3.4	Seven-up ist epistatisch über Prospero.....	70
3.5	Regulation von Seven-up durch Prospero.....	72
3.6	Analyse von LacZ-Enhancerkonstrukten aus dem 5'- und 3'-Bereich von <i>hunchback</i> .....	76
3.6.1	In Stämmen, die genomische DNA aus dem Bereich 5' von HZ4 inseriert haben, wird kein LacZ im Nervensystem exprimiert.....	78
3.6.2	DS1-Insertionsstämme zeigen starke LacZ-Expression im Nervensystem.....	78
3.6.3	Analyse von Enhancerfragmenten, die evolutiv konservierte Bereiche des DS1-Fragments enthalten .....	82
3.6.4	DS2-Insertionsstämme exprimieren LacZ vorwiegend im Gehirn und im PNS.....	84
3.7	Funktionsanalyse einzelner Domänen von Hunchback im embryonalen ventralen Nervensystem.....	87
3.7.1	Analyse der Even skipped-positiven Zellen in mutanten <i>hb</i> - Allelen .....	88
3.7.2	Auswirkung der Überexpression verschiedener <i>hb</i> -Varianten auf die U-Neurone des Zellstammbaums NB7-1 .....	93

<b>4</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>99</b>
4.1	Regulation der <i>hunchback</i> -Expression in embryonalen Neuroblasten-Zellstammbäumen durch Seven-up und Prospero .....	99
4.1.1	Seven-up schaltet <i>hunchback</i> in Neuroblasten ab und ermöglicht dessen Übergang zur nächsten temporalen Identität .....	99
4.1.2	Die Aktivität von Seven-up ist Mitose-abhängig .....	100
4.1.3	Die Transkription von <i>seven-up</i> ist Zellzyklus-unabhängig .....	102
4.1.4	Seven-up ist notwendig für die Spezifizierung der GMZ7-1b .....	103
4.1.5	Prospero reprimiert die Funktion von Seven-up in Gangliennutterzellen .....	104
4.1.6	In <i>prospero</i> -Mutanten findet möglicherweise eine Transformation von EW1 zu EW2 statt .....	105
4.1.7	Modell der Regulation von <i>hunchback</i> durch Seven-up und Prospero .....	106
4.2	Enhancerfragment-Analyse .....	108
4.2.1	Enhancer für die Regulation von <i>hunchback</i> im Nervensystem befinden sich sowohl 3' als auch 5' der kodierenden Region .....	108
4.2.2	Die im 3'-Bereich lokalisierten Enhancer sind nicht an der zeitlichen Regulation der <i>hb</i> -Expression beteiligt .....	108
4.2.3	Die evolutiv konservierten Regionen des DS1-Fragments enthalten panneurale und gliaspezifische Enhancer .....	109
4.3	Funktionsanalyse einzelner konservierter Domänen des Hunchback-Proteins .....	110
4.3.1	Die D-Box ist notwendig für die Spezifizierung früh geborener Zellen .....	111
4.3.2	Die terminale Zinkfinger-Domäne ist vermutlich an der Aufrechterhaltung der Kompetenz des Neuroblasten beteiligt .....	114
4.3.3	Eine Deletion der A-Box erhöht möglicherweise die Aktivität von Hunchback .....	116

---

<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>119</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>120</b>
<b>7</b>	<b>Anhang</b> .....	<b>131</b>
7.1	Evolutiv konservierte Sequenzen im DS1-Fragment.....	131
7.2	Karten der verwendeten Vektoren.....	134
7.3	Aminosäuresequenz des Hb-Proteins.....	136
7.4	Abkürzungverzeichnis .....	137
	-----	
	-----	
	-----	

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1: Schematische Darstellung der Spezifizierung von Neuroblasten im embryonalen ventralen Nervensystem .....	4
Abb. 1.2: Schematische Darstellung der sequenziellen Genexpression in Neuroblasten .....	5
Abb. 1.3: Schematische Darstellung des Zellstammbaums NB7-1 und der Effekte von ektopischem Hunchback im NB7-1 .....	7
Abb. 2.1: Funktionsweise des GAL4/UAS-Systems.....	19
Abb. 2.2: Vorbereitung und Injektion der Embryonen .....	29
Abb. 2.3: Kreuzungsschema zur Bestimmung des P-Element-tragenden Chromosoms .....	31
Abb. 2.4: Kreuzungsschema zur Herstellung einer <i>pros,svp</i> -Doppelmutante .....	32
Abb. 3.1: Im Bauchmark von <i>seven-up</i> -mutanten Embryonen ist die Anzahl der Hunchback-positiven Zellen stark erhöht.....	47
Abb. 3.2: In <i>seven-up</i> -Mutanten wird <i>hunchback</i> im NB7-3 verspätet abgeschaltet	49
Abb. 3.3: In <i>seven-up</i> -Mutanten wird <i>hunchback</i> im NB6-4T verspätet abgeschaltet .....	51
Abb. 3.4: In <i>seven-up</i> -Mutanten ist die Anzahl Hunchback-positiver Zellen im Zellstammbaum NB2-4T erhöht.....	53
Abb. 3.5: Das Fehlen von Seven-up hat eine Vermehrung von U1 zur Folge, eine Überexpression von Seven-up führt zum Verlust von U1. ....	55
Abb. 3.6: <i>seven-up</i> -mRNA-Expression in NB6-4T, NB7-3, NB2-4T und NB7-1.....	57
Abb. 3.7: Seven-up-Expression in den Zellstammbäumen NB6-4T, NB7-3 und NB2-4T .....	60
Abb. 3.8: In <i>string</i> -Mutanten wird <i>svp</i> in NB6-4T, NB7-3 und NB7-1 transkribiert, aber kaum translatiert.....	62
Abb. 3.9: Seven-up schwächt die Hunchback-Expression in <i>string</i> -mutanten Embryonen ab .....	64

Abb. 3.10: Im Bauchmark von <i>prospero</i> -mutanten Embryonen ist die Anzahl Hunchback-positiver Zellen stark reduziert .....	65
Abb. 3.11: Prospero ist notwendig, um die Hunchback-Expression in GMZ7-3a zu erhalten.....	67
Abb. 3.12: In <i>prospero</i> -Mutanten geht die Hunchback-Expression im glialen Anteil des Zellstammbaums NB6-4T verloren.....	68
Abb. 3.13: In <i>prospero</i> -Mutanten wird die Hunchback-Expression in der GMZ2-4Tb nicht aufrechterhalten. ....	70
Abb. 3.14: Im Bauchmark von <i>prospero,seven-up</i> -doppelmutanten Embryonen ist die Anzahl Hunchback-positiver Zellen stark erhöht .....	71
Abb. 3.15: <i>seven-up</i> ist epistatisch über <i>prospero</i> .....	72
Abb. 3.16: Seven-up-mRNA- und –Protein-Expression in der frühen Entwicklung des Zellstammbaums NB7-3.....	74
Abb. 3.17: In <i>prospero</i> -Mutanten findet sich eine zusätzliche Seven-up-positive Zelle im Zellstammbaum NB7-3.....	75
Abb. 3.18: Übersicht der genomischen Umgebung von <i>hunchback</i> .....	76
Abb. 3.19: DS1-Insertionsstämme exprimieren LacZ im embryonalen ventralen Nervensystem .....	80
Abb. 3.20: DS1-Insertionsstämme exprimieren LacZ in vielen Hunchback-negativen Zellen .....	81
Abb. 3.21: LacZ-Expressionsmuster in Insertionsstämmen von DS1-1, DS1-2 und DS1-3.....	83
Abb. 3.22: DS2-Insertionsstämme exprimieren LacZ vorwiegend im Gehirn .....	85
Abb. 3.23: Übersicht der LacZ-positiven Gehirnbereiche in DS2-Insertionsstämmen .....	85
Abb. 3.24: DS2-Insertionsstämme exprimieren LacZ nur in wenigen Zellen des Bauchmarks.....	86
Abb. 3.25: Lage der evolutiv konservierten Regionen des Hunchback-Proteins sowie der analysierten <i>hb</i> -Allele und <i>hb</i> -Varianten.....	87

---

Abb. 3.26: Schematische Darstellung der Even skipped-positiven Zellen.....	89
Abb. 3.27 In <i>hb</i> -Mutanten mit Stop-Codons in der D-Box werden die früh geborenen Even-skipped-positiven Zellen nicht korrekt spezifiziert.....	92
Abb. 3.28: Schematische Darstellung der U-Neurone.....	94
Abb. 3.29: Expression von Zfh-2 und Castor nach Überexpression verschiedener <i>hunchback</i> -Varianten .....	95
Abb. 3.30: Expression von Zfh-2 und Castor in den U-Neuronen nach Überexpression verschiedener <i>hunchback</i> -Varianten. ....	96
Abb. 4.1: Modell der Regulation von <i>hunchback</i> durch Seven-up und Prospero .	107
Abb. 7.1: Karte des pBluescript II KS-Vektors.....	134
Abb. 7.2: Karte des pBluescript II SK-Vektors.....	134
Abb. 7.3: Karte des pCR II Topo-Vektors.....	135
Abb. 7.4: Karte des C4PLZ-Vektors .....	135
Abb. 7.5: Karte des p( $\Delta$ 2-3)-Helferplasmids.....	136
Abb. 7.6: Aminosäuresequenz des Hb-Proteins.....	136

---

**Tabellenverzeichnis**

Tabelle 2-1: In dieser Arbeit benutzte Geräte .....	11
Tabelle 2-2: In dieser Arbeit verwendete Software .....	11
Tabelle 2-3: In dieser Arbeit verwendete Fliegenstämme .....	17
Tabelle 2-4: In dieser Arbeit verwendete primäre Antikörper .....	24
Tabelle 2-5: In dieser Arbeit verwendete sekundäre Antikörper.....	25
Tabelle 2-6: Expressionsstärke der <i>UAS-hb</i> -Konstrukte .....	33
Tabelle 2-7: Primer zum Amplifizieren potentiell regulatorischer Bereiche von <i>hunchback</i> .....	36
Tabelle 2-8: Vektorspezifische Primer zur Überprüfung der Anwesenheit und Orientierung von Inserts .....	37
Tabelle 2-9: In dieser Arbeit verwendete Restriktionsendonucleasen.....	41
Tabelle 3-1: Übersicht über Anzahl und Expressionsmuster der Even skipped- positiven Nachkommen von NB4-2, NB1-1 und NB7-1 .....	91
Tabelle 3-2: Übersicht der Anzahl der U-Neurone und die Expression von Zfh-2, Krüppel und Castor nach Überexpression von <i>hunchback</i> -Varianten im NB7-1 .....	98

# 1 Einleitung

Das Zentrale Nervensystem (ZNS) dient der Integration von sensorischen Informationen und koordiniert bewusste wie auch unbewusste Körperfunktionen. Im Verlauf der Evolution hat das ZNS fortwährend an Komplexität gewonnen und unter allen Organsystemen die größte Entwicklungssteigerung erfahren. Phylogenetisch findet sich ein erstes Nervensystem (NS) mit funktionell verschiedenen Netzwerken von Neuronen bei den Coelenteraten. Die Plathelminthen weisen bereits ein zentrales Nervensystem auf. In diesem Tierstamm werden in der Literatur auch erstmalig Gliazellen beschrieben, die den zweiten Zelltyp des NS ausmachen (Breidbach und Kutsch, 1995).

Gliazellen bilden ein Stützgewebe aus, ernähren und isolieren Neurone. Sie regulieren die Homöostase und dienen den auswachsenden Neuronen als Wegweiser. Die Neurone sind die funktionellen Einheiten des NS. Ihre Aufgabe ist es, Signale aufzunehmen, zu verarbeiten und weiterzuleiten (Leviton und Kaczmarek, 2002). Mit steigendem Komplexitätsgrad hat die Zahl der Neurone und vor allem die der Gliazellen fortwährend zugenommen. Im menschlichen Gehirn finden sich  $10^{12}$  Gliazellen und  $10^{11}$  Neurone (Pearson und Doe, 2004), einige dieser Neurone gehen bis zu 150.000 Zellkontakte miteinander ein (Hashimoto und Kano, 1998). Die Entstehung des Gehirns zu entschlüsseln ist zweifellos eine der schwierigsten Aufgaben der Entwicklungsbiologie.

Da grundsätzliche Mechanismen phylogenetisch konserviert sind, ist es zweckmäßig, die Grundlagen der Entstehung des Nervensystems an einem weniger komplexen Organismus zu erforschen. Wir benutzen für unsere Analysen die Fruchtfliege *Drosophila melanogaster*.

*Drosophila* wird seit Anfang des letzten Jahrhunderts studiert und entwicklungsbiologische Vorgänge sind entsprechend gut untersucht. Das Genom der Fruchtfliege ist vollständig sequenziert, wodurch eine systematische Analyse von DNA-Sequenzen ermöglicht wird. Es steht eine große Auswahl an mutanten Fliegenstämmen zur Verfügung, da rezessive Letalmutationen durch den Einsatz von Balancerchromosomen in stabilen Fliegenstämmen gehalten werden können. Die kurze Generationszeit und die geringe Anzahl von vier Chromosomen prädestinieren *Drosophila* für genetische Kreuzungsexperimente. In den letzten Jahrzehnten ist eine

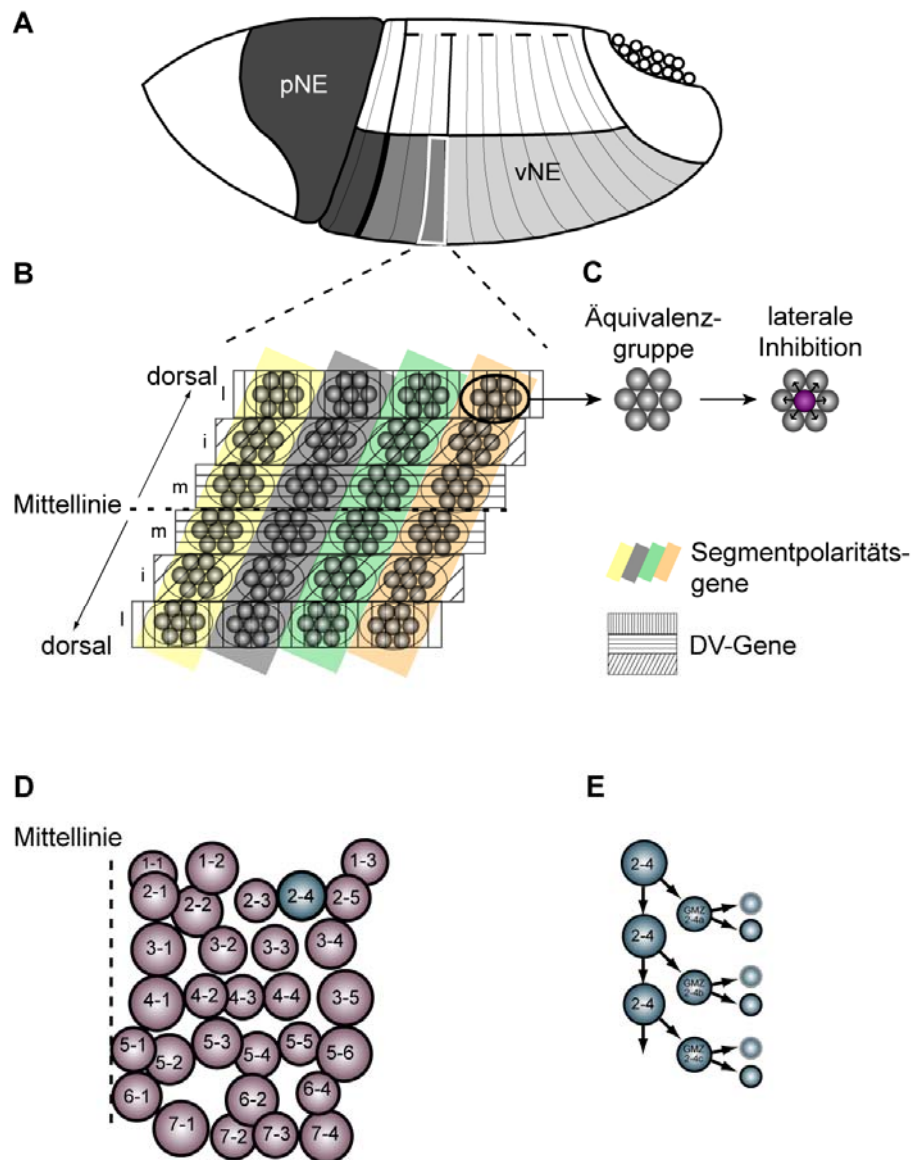
Vielzahl von Techniken entwickelt worden, die es erlauben, das Expressionsprofil und die Funktion von Genen aufzuklären. Die meisten dieser Techniken basieren auf dem Einsatz von Transposons. Beispielsweise lässt sich mit Hilfe der Enhancer-Trap-Methode die zeitlich-räumliche Expression eines Gens analysieren (Bellen et al., 1989). Eine Weiterentwicklung dieses Verfahrens ist das GAL4/UAS-System, mit dem Gene gezielt in Organen und Zellen exprimiert werden können (Brand und Perrimon, 1993). Die Sammlung transgener Fliegenstämme ist demzufolge sehr umfangreich. Weiterhin hat das embryonale Bauchmark von *Drosophila* eine überschaubare Anzahl von etwa 300 Neuronen und 30 Gliazellen pro Hemisegment (Bossing et al., 1996). Viele dieser Zellen sind identifiziert und individuell ansprechbar. Untersuchungen können daher in einem mechanistisch und zellulär vertrauten Kontext durchgeführt werden.

## 1.1 Embryonale Neurogenese von *Drosophila melanogaster*

Im Gegensatz zu den Vertebraten besitzen Invertebraten wie *Drosophila* ein ventrales Nervensystem (VNS), das sich aus dem zentralen Nervensystem (Gehirn und Bauchmark) und dem peripheren Nervensystem (PNS) zusammensetzt. Der segmentale Aufbau ist im embryonalen ZNS deutlich zu erkennen. Es besteht aus 14 bilateral symmetrischen Einheiten, die als Neuomere bezeichnet werden. Man unterscheidet zwischen drei gnathalen, drei thorakalen und acht abdominalen Neuomeren (Abb. 1.1 A). Aus den gnathalen Segmenten geht der hintere Teil des Gehirns hervor, während das Bauchmark, das dem Rückenmark der Säuger entspricht, die thorakalen und abdominalen Segmente umfasst. Beinahe alle Zellen des ZNS werden durch neurale Vorläufer gebildet, die Neuroblasten (NB) genannt werden. NB entstehen im Neuroektoderm, einem Gewebe aus dem sowohl neurale als auch epidermale Vorläuferzellen hervorgehen (Campos-Ortega und Hartenstein, 1985; Poulson, 1950). Vor der Gastrulation bilden sich im Neuroektoderm Äquivalenzgruppen von je vier bis sechs Zellen. Durch den Vorgang der lateralen Inhibition, in den proneurale und neurogene Gene involviert sind, wird festgelegt, welche Zelle in einer Äquivalenzgruppe zum NB wird (Martin-Bermudo et al., 1995; Skeath und Carroll, 1992). Nach der Gastrulation delaminieren pro Hemineuomer 30 NB in fünf festgelegten Segregationswellen (S1-S5) ins Innere des Embryos und ordnen sich zwischen Mesoderm und Ektoderm an. Abhängig von der Position im

Neuroektoderm exprimiert jeder NB eine spezifische Kombination an Genen, die an der anterior-posterioren (AP) und dorso-ventralen (DV) Musterbildung beteiligt sind (Bhat, 1999; Skeath, 1999; Skeath und Thor, 2003; Abb. 1.1 B). Das jeweilige Expressionsmuster und der Zeitpunkt der Delamination weisen dem NB eine bestimmte Identität zu (Chu-LaGraff und Doe, 1993; Skeath et al., 1995; Udolph et al., 1995). Demnach erhalten NB, die zur selben Zeit in den gleichen relativen Positionen in verschiedenen Hemisegmenten entstehen, die gleiche Identität. Gemäß ihrer Spezifizierung positionieren sich die NB in sieben Reihen und fünf Spalten im Hemisegment (Abb. 1.1 D). Die NB werden nach ihrer Spalten- und Reihenummer benannt. So findet sich z. B. der NB2-4 in der vierten Spalte von Reihe zwei (Abb.1.1 D).

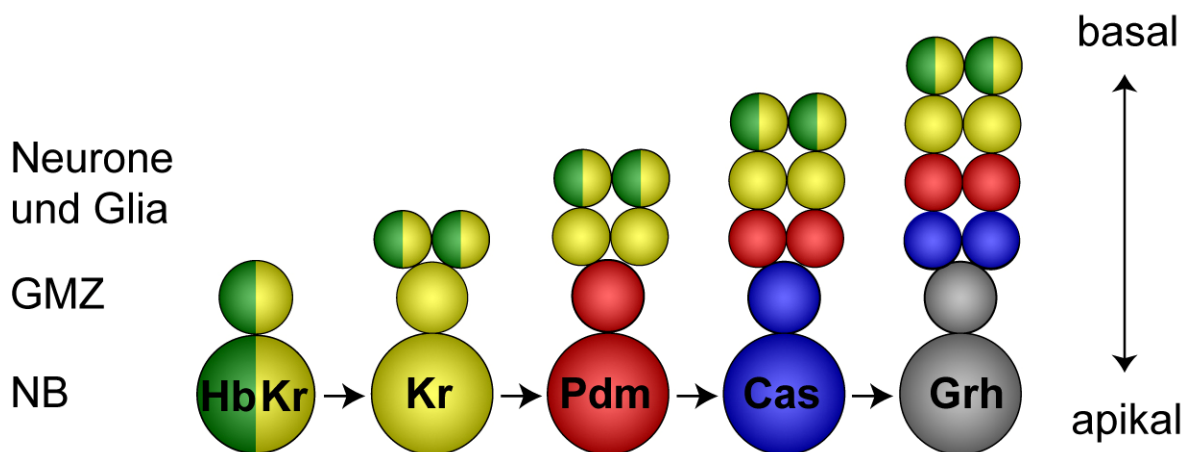
Kurz nach der Delamination beginnen sich die NB asymmetrisch im Stammzellmodus zu teilen. Bei der Teilung wird basal eine kleinere Gangliemutterzelle (GMZ) abgeschnürt. Die GMZ werden alphabetisch nach der Reihenfolge ihrer Entstehung benannt (GMZa, GMZb usw.) GMZ haben ein beschränktes Proliferationspotential und teilen sich nur einmal. Diese Eigenschaften werden durch Zellschicksalsdeterminanten bestimmt, die im NB asymmetrisch lokalisiert werden und während der Mitose in die GMZ segregieren (Cai et al., 2003; Wodarz, 2005). Bei der Teilung von GMZ werden wiederum Determinanten asymmetrisch verteilt und es entstehen zwei Neurone und/oder Gliazellen mit unterschiedlichen Zellschicksal (Buescher et al., 1998; Skeath und Doe, 1998; Spana und Doe, 1996).



**Abb. 1.1: Schematische Darstellung der Spezifizierung von Neuroblasten im embryonalen ventralen Nervensystem**

**A:** Anlagenskarte eines Embryos im Stadium 6. Das Neuroektoderm ist in verschiedenen Grautönen dargestellt. Aus dem procephalen Neuroektoderm (pNE) gehen die Hemisphären des Gehirns hervor, das Bauchmark entstammt dem ventralen Neuroektoderm (vNE). Die gnathalen Segmente sind dunkelgrau hervorgehoben, die thorakalen mittelgrau und die abdominalen Segmente hellgrau. **B:** Spezifizierung von NB im Neuroektoderm. Dargestellt ist ein thorakales Segment. Die Zellen in den Äquivalenzgruppen werden durch die Expression von AP- und DV-Genen spezifiziert. **C:** Durch laterale Inhibition wird eine Zelle pro Äquivalenzgruppe zum NB, aus den anderen Zellen gehen epidermale Zellen hervor. **D:** NB-Karte. Anordnung der NB in einem Hemisegment. Jeder NB hat eine eindeutige Identität und nimmt seine Position gemäß seiner Spezifizierung im Neuroektoderm ein. Der NB2-4 ist hervorgehoben. **E:** Entstehung von Zellstammbäumen am Beispiel des NB2-4T: NB teilen sich asymmetrisch und bringen in jeder Teilungsrunde eine GMZ hervor. GMZ werden alphabetisch nach der Reihenfolge ihrer Geburt benannt (GMZa, GMZb usw.). GMZ teilen sich nur einmal, wobei zwei Neurone und/oder Gliazellen entstehen. In dieser Teilung werden Zellschicksalsdeterminanten asymmetrisch verteilt, wodurch den beiden Nachkommenzellen eine unterschiedliche Identität zugewiesen wird (graue und schwarze Umrandung der Zellen). Abbildung verändert nach Novotny (2003).

Jeder NB generiert entsprechend seiner Identität einen spezifischen und reproduzierbaren Zellstammbaum, in dem die einzelnen Zelltypen in einer invarianten zeitlichen Abfolge geboren werden (Bossing et al., 1996; Schmid et al., 1999; Schmidt et al., 1997). Es wird angenommen, dass es sich dabei um einen zellautonomen Vorgang handelt, der an die sequenzielle und transiente Expression der Transkriptionsfaktoren Hunchback (Hb), Krüppel (Kr), Pdm1/Pdm2, Castor (Cas) und Grainy head (Grh) gekoppelt ist (Brody und Odenwald, 2000; Brody und Odenwald, 2002; Isshiki et al., 2001; Kambadur et al., 1998; Novotny et al., 2002; Pearson und Doe, 2004). Diese Gene werden konsekutiv im NB in einem bestimmten Zeitfenster exprimiert. Das jeweilig exprimierte Set an Transkriptionsfaktoren wird vom NB an die GMZ vererbt, die in diesem Zeitfenster geboren werden. Mit der Zeit entstehen GMZ die unterschiedliche Gene der zeitlichen Spezifizierungskaskade exprimieren (Abb. 1.2). Durch die Expression eines Faktors bzw. einer Kombination von Faktoren wird der GMZ eine temporale Spezifizierung zugewiesen. Am Ende eines Zeitfensters wird die Expression im NB abgeschaltet, die GMZ und deren Nachkommen behalten aber die Expression der Spezifizierungsfaktoren bei.



**Abb. 1.2: Schematische Darstellung der sequenziellen Genexpression in Neuroblasten**

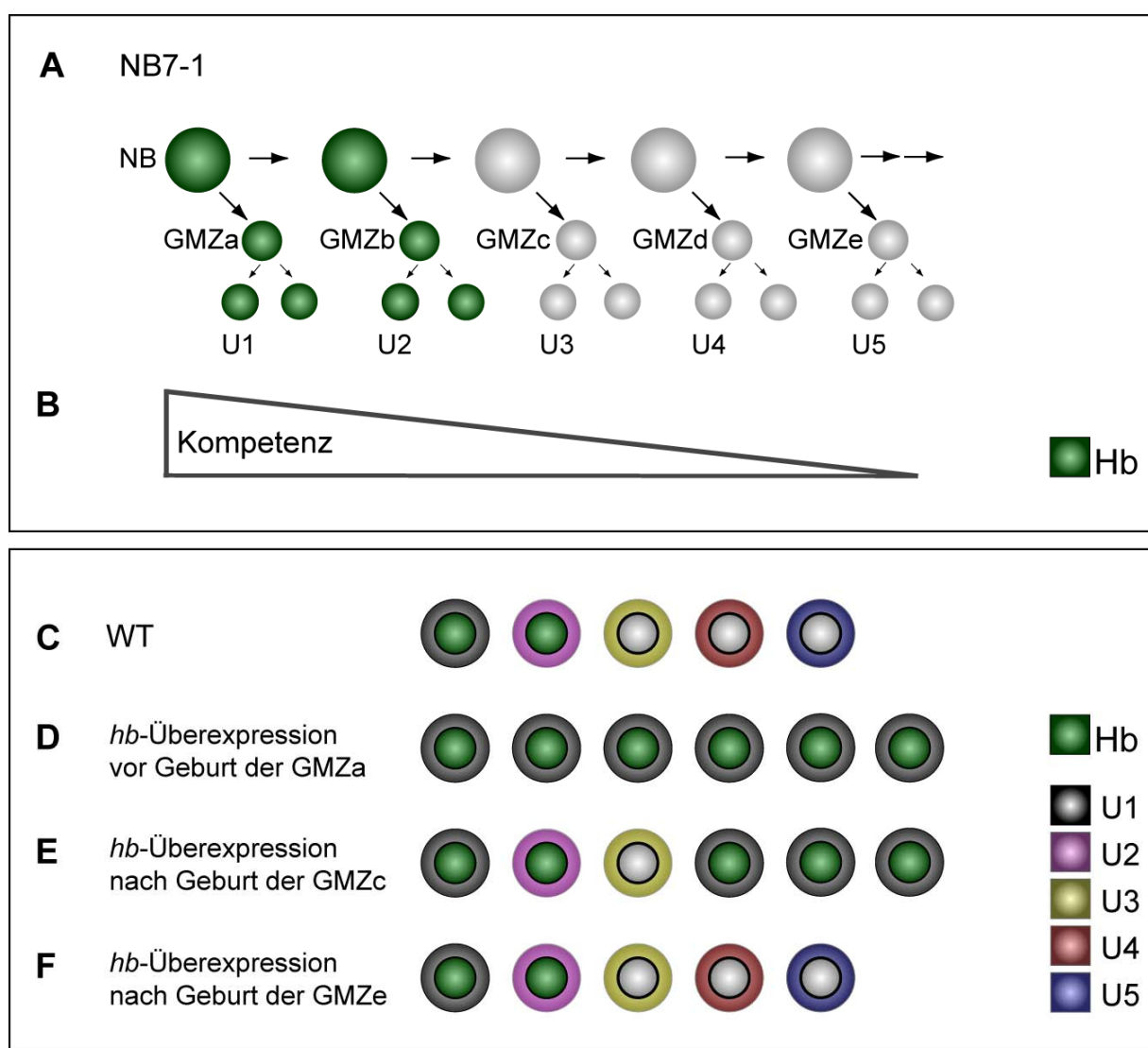
Die Transkriptionsfaktoren Hb, Kr, Pdm, Cas und Grh werden sequenziell und transient in NB exprimiert. Das Set an Transkriptionsfaktoren, die ein NB zum Zeitpunkt der Geburt einer GMZ exprimiert, wird an diese GMZ weitergegeben. Die GMZ und deren Nachkommen behalten die Expression dieser Faktoren bei. GMZ werden basal abgeschnürt; so entstehen charakteristische Schichten von apikal nach basal, in denen alle Zellen einen oder mehrere dieser Faktoren exprimieren. Hb ist der erste Faktor dieser Genkaskade, weshalb die Mehrzahl der Hb-positiven Zellen apikal im VNS gelegen ist. In den meisten NB wird Hb mit Kr koexprimiert. Abbildung verändert nach Brody und Odenwald (2002).

Hunchback ist der erste Faktor dieser zeitlichen Spezifizierungskaskade und wird in fast allen NB schon zum Zeitpunkt der Delamination exprimiert. Es konnte gezeigt werden, dass Hb tatsächlich notwendig und ausreichend ist, um früh geborene Zellen zu spezifizieren. Dementsprechend fehlen in *hb*-Mutanten früh geborene Zellen und eine Überexpression von Hb in NB führt zu einer erhöhten Anzahl von Zellen mit „frühem“ Schicksal (Isshiki et al., 2001; Novotny et al., 2002).

Um die nächste temporale Identitätsstufe des NB einzuleiten, ist es notwendig, dass *hb* am Ende seines Zeitfensters im NB abgeschaltet wird (Isshiki et al., 2001; Kanai et al., 2005; Novotny et al., 2002). Das Abschalten von *hb* ist an die Mitose gekoppelt, da in G2-Phase-arretierten NB die Hb-Expression beibehalten wird (Grosskortenhaus et al., 2005; Isshiki et al., 2001). Welche Faktoren für das Abschalten von Hb im NB zuständig sind, war zu Beginn dieser Arbeit nicht bekannt. Ebenso war unklar, weshalb das mitotische Signal nur im NB, nicht aber in der GMZ wirkt.

Eine weitere Funktion von *hb* ist, den multipotenten Zustand von NB aufrecht zu erhalten. Nach Beendigung der Hb-Expression wird der NB zunehmend in seiner Kompetenz beschränkt, Nachkommen mit „frühem“ Schicksal zu generieren (Carr et al., 2004; Isshiki und Doe, 2004; Pearson und Doe, 2003). Diese Erkenntnisse wurden durch Untersuchungen von Pearson und Doe (2003) am Zellstammbaum NB7-1 gewonnen. Aus den ersten fünf GMZ des NB7-1 gehen fünf U-Neurone hervor, die in der Reihenfolge ihrer Geburt U1-U5 genannt werden. U1 und U2, die Nachkommen der ersten beiden GMZ, sind Hb-positiv (Abb. 1.3 A). Wenn Hb im NB7-1 überexprimiert wird, bevor die erste Teilung stattgefunden hat, kommt es zu einer Vermehrung von U1-Neuronen auf Kosten von normalerweise später geborenen Neuronen (Abb. 1.3 D). Bei einer ektopischen Expression von Hb im NB7-1, nachdem dieser schon die dritte GMZ generiert hat, kann der NB auf die Produktion von U1-Neuronen rückprogrammiert werden (Abb. 1.3 E). Wird Hb jedoch nach der Geburt der fünften GMZ überexprimiert, so ist der NB7-1 nicht mehr in der Lage, U1-Neurone zu generieren (Abb. 1.3 F).

Damit kommen Hb im NS zwei Funktionen zu: Zum einem die Spezifizierung eines „frühen“ Schicksals, zum anderen verleiht Hb den NB die Kompetenz, auf die Expression von Hb mit der Generierung „früher“ Zellschicksale zu reagieren.



**Abb. 1.3: Schematische Darstellung des Zellstammbaums NB7-1 und der Effekte von ektopischem Hunchback im NB7-1**

**A:** Die frühe Entwicklung des Zellstammbaums NB7-1. Die ersten fünf GMZ des NB7-1 bringen jeweils ein U-Neuron hervor, die nach der Reihenfolge ihrer Entstehung U1-U5 genannt werden. U1 und U2 exprimieren Hb. **B:** Die Kompetenz des NB, Nachkommen mit „frühen“ Schicksal zu generieren, nimmt mit zunehmenden Alter ab. **C-F:** Darstellung der Experimente von Pearson und Doe (2003) zur Bestimmung der Kompetenz des NB7-1. Die grüne Farbgebung der inneren Kugel zeigt die Expression von Hb an, die Farbe der Umrandung steht für die jeweilige Identität des U-Neurons (s. Farbcode). **C:** Wildtyp (WT). **D:** Wird Hb im NB7-1 vor der ersten Teilung überexprimiert, entstehen zusätzliche U1-Neurone auf Kosten von normalerweise später geborener Neurone. **E:** Wird Hb nach der Geburt der dritten GMZ im NB7-1 überexprimiert, kann der NB auf die Generierung von U1-Neuronen rückprogrammiert werden. **F:** Nach der fünften Teilung ist die Kompetenz des NB so weit eingeschränkt, dass er nicht mehr auf Hb mit der Generierung von früh geborenen U-Neuronen reagieren kann. Abbildung verändert nach Carr et al. (2004).

Bislang konnte noch nicht geklärt werden, auf welche Weise Hb seine Funktion als Kompetenz- und Spezifizierungsfaktor ausübt. Die molekularen Eigenschaften von Hb sind allerdings schon seit beinahe zwei Jahrzehnten bekannt. Diese Charakterisierungen wurden vorgenommen, nachdem *hb* als Gap-Gen entdeckt wurde, das an der AP-Musterbildung beteiligt ist (Lehmann und Nüsslein-Volhard, 1987; White und Lehmann, 1986).

*hb* kodiert für einen Zinkfinger-Transkriptionsfaktor mit evolutiv konservierten Zinkfingern des Typs C2H2 (Sommer und Tautz, 1991; Sommer et al., 1992; Tautz et al., 1987; Treier et al., 1989). Die Zinkfinger sind in einer N-terminalen und einer C-terminalen Domäne organisiert. Vermutlich vermittelt die N-terminale Domäne die DNA-Bindung (Hülkamp et al., 1994). Neben den Zinkfingern konnten vier weitere konservierte Domänen gefunden werden: Die nahe des N-Terminus gelegenen Boxen A und B (Tautz et al., 1987), sowie die C- und die D-Box, die zwischen den beiden Zinkfinger-Domänen liegen (Sommer et al., 1992).

Erste Arbeiten zur Funktion einzelner Domänen im Nervensystem wurden von Viktoria Linne im Rahmen ihres Diplomprojektes in dieser Arbeitsgruppe durchgeführt. Sie untersuchte *hb*-Allele mit Stop-Codons in verschiedenen Domänen des Proteins. Gleichzeitig analysierte sie die Induktion von ektopischen U-Neuronen bei Überexpression verschiedener *hb*-Varianten im NB7-1, in denen gezielt Domänen deletiert bzw. mutiert worden waren. Bei diesen Arbeiten wurde allerdings nicht die Identität der Zellen überprüft.

## 1.2 Fragestellung dieser Arbeit

In dieser Arbeit sollte der Mechanismus aufgeklärt werden, der dafür verantwortlich ist, dass *hb* im NB abgeschaltet, in der GMZ aber beibehalten wird. Dazu galt es, den oder die Faktoren zu identifizieren, welche die Expression von *hb* im NB terminieren. Weiterhin sollte herausgefunden werden, warum dieser Faktor nicht auch in der GMZ für das Abschalten von *hb* sorgt. Es stellte sich heraus, dass der Transkriptionsfaktor Seven-up (Svp) die Hb-positive Phase in NB beendet. Svp wird vor der entscheidenden Mitose im NB transkribiert, aber nur geringfügig translatiert, da eine effiziente Translation wahrscheinlich Mitose-abhängig ist. Nach der Teilung wird Svp nicht nur im NB, sondern auch in der neu entstandenen Hb-positiven GMZ exprimiert. In dieser Zelle verhindert jedoch der Homöodomänen-Transkriptionsfaktor Prospero (Pros), der bei der Teilung in die GMZ segregiert, die Aktivität von Svp. Da Svp und Pros die Transkription von *hb* direkt oder indirekt regulieren, wurde zudem eine Enhancerfragment-Analyse durchgeführt, um relevante regulatorische Bereiche des *hb*-Gens zu identifizieren. Neben den bereits bekannten Regionen im 5'-Bereich von *hb*, wurden 3' der kodierenden Sequenz weitere nervensystemspezifische Enhancerelemente gefunden.

Des Weiteren wurde die Funktion einzelner Domänen von Hb im Nervensystem untersucht. Dazu wurden *hb*-Varianten, in denen evolutiv konservierte Domänen deletiert bzw. mutiert waren, im NB7-1 überexprimiert und auf ihre Fähigkeit zur Induktion von „frühem“ Zellschicksal getestet. In einem zweiten Ansatz wurden *hb*-Allele analysiert, die Stop-Codons in den entsprechenden Domänen aufwiesen. Die Identität der Zellen wurde mit spezifischen Markern überprüft. Es stellte sich heraus, dass die A-Box möglicherweise die Aktivität von Hb reguliert. Die D-Box ist notwendig, um „frühe“ Zellschicksale zu spezifizieren. Zudem gibt es Hinweise, dass die terminale Zinkfingerdomäne in die Aufrechterhaltung der Kompetenz von NB involviert ist.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Geräte

Bezeichnung	Modell	Hersteller
Binokular	Stemi 2000	Zeiss
Durchlichtmikroskop	Axioplan Axioskop 2	Zeiss Zeiss
Druckeinheit	Pressure Unit	Science Products
Fluoreszenzmikroskop	BX 50 WI	Olympus
Gel-Elektrophoresekammern	HE 33 HE 99X	Hoefer
Gelkamera	Quickstore	MS Laborsysteme
Heizblock	TB1 Thermoblock Thermomixer compact	Biometra Eppendorf
Inkubatoren	KB-115 Friocell 707	WTB Binder MMM Medcenter Einrichtungen
Kaltlichtlampe	KL1500 electronic	Schott
Kameras	Axiocam MRm 3CCD Mikroskopkamera	Zeiss Sony
Kapillarenpuller	P97	Sutter
Konfokales Laserscanning- Mikroskop	TCS SPII	Leica
Magnetrührer	MR3001	Heidolph
Mikromanipulator	Mikromanipulator	Leitz
Netzteil für Gel-Elektrophorese	Gene Power Supply GPS 200/400	Pharmacia
PCR Maschine	TGradient	Biometra
Pipetten	Pipetman 2,10, 20, 100, 200, 1.000	Gilson
pH-Meter	CG840	Schott
Photometer	Biophotometer	Eppendorf

Bezeichnung	Modell	Hersteller
Schüttler	3015 3019 Thermomixer Compact	GFL GFL Eppendorf
Tischzentrifuge	Mini Spin	Eppendorf
Transilluminator	N90 M	MS Laborgeräte
Vakuumpumpe	LVS 301	Ilmvac GmbH
Vakuummzentrifuge	Savant Speed Vac®	Thermo Life Sciences
Vortexer	Vibrofix VF1 Vortex Genie 2TM	Janke & Kunkel Bender & Hobein AG
Waage	PM 4600 Delta AM50	Mettler Mettler
Wasserbad	1002	GFL
Zentrifugen	5410 5417R	Eppendorf Eppendorf

Tabelle 2-1: In dieser Arbeit verwendete Geräte

## 2.2 Software

Software	Hersteller/Internetadresse
Photoshop 7.0.1	Adobe
Illustrator 10.0	Adobe
Amira 3.0	TCS
LCS Lite	Leica
LCS	Leica
Vector NTI	Invitrogen
Oligonucleotid Properties Calculator	<a href="http://www.basic.nwu.edu/biotools/oligocalc.html">http://www.basic.nwu.edu/biotools/oligocalc.html</a>
Blast 2 sequences	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/bl2.html">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/bl2.html</a>

Tabelle 2-2: In dieser Arbeit verwendete Software

## 2.3 Chemikalien und Lösungen

### Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien wurden in Analysequalität von den Firmen MBI Fermentas, Merck, Roth und Sigma-Aldrich bezogen, sofern nicht anders angegeben.

### Lösungen

Alle Lösungen wurden, sofern nicht anders angegeben, mit autoklavierten H<sub>2</sub>O angesetzt. Zur Herstellung von RNase-freien Lösungen wurde 1/200 Volumen Diethylpyrocarbonat (DEPC) zur Lösung hinzugegeben. Die Lösungen wurden über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend autoklaviert. DEPC bindet an primäre und sekundäre Amine und führt zu kovalenten Bindungen, wodurch die Aktivität der RNase zerstört wird.

### Apfelsaftagar

Für die Herstellung der Ablageschalen wird Agar-Agar (28g/l) in handelsüblichem Apfelsaft (100%) in der Mikrowelle aufgekocht und in Petrischalen (Ø 5cm) gegossen. Nach dem Abkühlen werden die Platten bei 4°C gelagert.

### Chloroform-Isoamylalkohol-Gemisch

Chloroform und Isoamylalkohol werden im Verhältnis 24:1 gemischt und bei 4°C gelagert.

### DAB-Lösung

Eine Tablette (10mg) 3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid (DAB) wird in 20ml PBS gelöst. Die Lösung wird 2h bei 60°C, anschließend über Nacht bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert. Aliquots zu je 1ml werden bei -20°C gelagert. Vor der Färbereaktion wird H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1µl /1ml) zur DAB-Lösung zugegeben.

**Fixativ für „Whole-mount“-Antikörperfärbungen an Embryonen**

PEMS bzw. PBS	450µl
Formaldehyd (37%)	50µl
Heptan abs.	450µl

**Fixativ für „Whole-mount“-*in situ*-Hybridisierungen an Embryonen**

PEMS bzw. PBS	350µl
Formaldehyd (37%)	150µl
Heptan abs.	450µl

**Glycerin zum Einbetten lichtmikroskopischer Präparate**

Glycerin	70% in PBS
----------	------------

**Hybridisierungslösung (50ml)**

Formamid	25ml
20x SSC-DEPC	12,5ml
DEPC-H <sub>2</sub> O	12,5ml
Tween 20	50µl

**Luria Broth (LB)-Medium**

Trypton	10g/l
Hefe-Extrakt	5g/l
NaCl	10g/l

in H<sub>2</sub>O lösen und autoklavieren

**LB-Medium mit Ampicillin (LB-Amp.)**

Ampicillin	660µl/l in LB-Medium gelöst
------------	-----------------------------

**LB-Platten mit Ampicillin**

15g/l Bacto-Agar werden in LB-Medium gelöst. Das Medium wird autoklaviert und nach dem Abkühlen (ca. 60°C) wird Ampicillin (75mg/l) zugegeben. Anschließend wird die Lösung in sterile Petrischalen gegossen. Die abgekühlten Platten werden bei 4°C gelagert.

**Nährmedium für *Drosophila***

216g Agar werden 10min in 10l Wasser gekocht. Anschließend werden 488g Hefe, 130g Sojamehl und 2420g Maisgrieß in 5l Wasser gemischt und zur kochenden Agar-Lösung zugegeben. 2,16g Malzextrakt, 1,08g Sirup und weitere 10,5l Wasser werden hinzugefügt und unter ständigem Rühren 30min gekocht. Kurz bevor der Futterbrei in die Kunststoffzuchtgefäße abgefüllt wird, gibt man Nipagin (50g in 2l Wasser gelöst) sowie 120ml Propionsäure dazu.

**PBS** (phosphatgepufferte Salzlösung, 20x, pH 7,4)

NaCl	1,3M
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,03M
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,07M

**PBT** (phosphatgepufferte Salzlösung plus Triton, 0,2%)

Triton X-100 (0,2%) in PBS

**PBTween** (phosphatgepufferte Salzlösung plus Tween, 0,1%)

Tween-20 (0,1%) in DEPC-PBS

**PEMS** (PIPES-EGTA-Magnesiumsulfat-Sorbit)

PIPES	100mM (pH 6,9)
EGTA	1mM
MgSO <sub>4</sub>	1mM
Sorbit	1,2 M

**Phenol/Chloroform**

Phenol/TE	1Volumen
Chloroform	1Volumen

**Phenol-Chloroform-Isoamyalkohol**

Phenol, Chloroform und Isoamylalkohol werden im Verhältnis 25:24:1 gemischt und bei 4°C gelagert.

**SSC** (20x, pH 7,0)

NaCl 175,3g/l

Natriumcitrat 88,2g/l

**TAE** (Tris-Acetat-EDTA, 50x, pH 8)

Tris 242g/l

Na<sub>2</sub>EDTA 50mM

Eisessig 57,1ml/l

**TNT** (Tris-Natriumchlorid-Tween, 50ml)

2M NaCl 3,76ml

1M Tris, pH 7,5 5ml

Tween 20 25µl

## 2.4 Fliegenstämme

Bezeichnung	Genotyp	Herkunft/Referenzen
<b>Wildtyp</b>		
<i>Oregon R</i>	Wildtyp	Bloomington Stock Center
<b>Balancerstämme</b>		
Vierfachbalancer für das 2. und 3. Chromosom	w; CyO-twi-lacZ/Pm;TM6b, abdA-lacZ, Ant <sup>Hu</sup> e/Cxd	O. Vef
Vierfach-Translokations-Balancer für das 2. und 3. Chromosom	w; SM6a TM6b/Pm +	O. Vef
Doppelbalancer für das 3. Chromosom	TM3, ftz-lacZ/TM6b	Bloomington Stock Center
<b>Mutanten</b>		
<i>dMi2<sup>4</sup></i>	dMi2 <sup>4</sup> /TM3, KrGFP 3. Chromosom	Bloomington Stock Center
<i>dMi2<sup>6</sup></i>	dMi2 <sup>6</sup> /TM3, KrGFP 3. Chromosom	Bloomington Stock Center
<i>Df(3L)H99</i>	Def(3L)H99 /TM6b- abdA-lacZ 3. Chromosom	H. Steller (White et al., 1994)
<i>hb<sup>1</sup> (hb<sup>IIU</sup>)</i>	hb <sup>1</sup> Ki <sup>1</sup> ry <sup>1</sup> /TM6b,abdA – lacZ /TM3, KrGFP 3. Chromosom	Bloomington Stock Center
<i>hb<sup>7</sup> (hb<sup>9K57</sup>)</i>	hb <sup>7</sup> /TM6b,abdA-lacZ 3. Chromosom	Bloomington Stock Center
<i>hb<sup>11</sup> (hb<sup>14F</sup>)</i>	hb <sup>7</sup> /TM6b,abdA-lacZ 3. Chromosom	Bloomington Stock Center
<i>pros<sup>C7</sup></i>	Pros <sup>C7</sup> /TM3, ftz-LacZ 3. Chromosom	F. Matsuzaki
<i>pros<sup>17</sup></i>	Pros <sup>17</sup> /TM6b Tb 3. Chromosom	A. Hildago
<i>svp<sup>1</sup></i>	svp <sup>1</sup> /TM3 3. Chromosom	Bloomington Stock Center
<i>svp<sup>e22</sup></i>	svp <sup>e22</sup> /TM3, Ubx-lacZ 3. Chromosom	M. Hoch
<i>white<sup>-</sup></i>	White 1118 X Chromosom	Bloomington Stock Center
<b>Gal4-Stämme</b>		
<i>engrailedGAL4</i>	P[enGAL4] 2. Chromosom	(Tabata et al., 1995)
<i>MZVumGAL4</i>	P[MZVumGAL4] X Chromosom	J. Urban (Landgraf et al., 2003)

Bezeichnung	Genotyp	Herkunft/Referenzen
<b>UAS-Stämme</b>		
<i>UAS-svp1</i>	P[svp1]; P[svp1] 2. und 3. Chromosom	Michael Hoch
<i>UAS-prosK</i>	P[prosK] 2. Chromosom	H. Vässin
<i>UAS-hb</i>	P[hb] ;P[hb] 2. und 3. Chromosom	(Wimmer et al., 2000)
<i>UAS-hb<math>\Delta</math>AXI</i>	w <sup>-</sup> ; P[hb $\Delta$ A]; P[hb $\Delta$ A] 2. und 3. Chromosom	V. Linne
<i>UAS-hb<math>\Delta</math>DIV</i>	w <sup>-</sup> ; P[hb $\Delta$ D]; P[hb $\Delta$ D] 2. und 3. Chromosom	V. Linne
<i>UAS-hb*Zn2</i>	w <sup>-</sup> ; P[hb*Zn2] 2. Chromosom	V. Linne
<b>Enhancerfragment-Insertionsstämme</b>		
<i>DS1 T2</i>	w <sup>-</sup> ,P[DS1] 3. Chromosom	U. Mettler
<i>DS1 T6</i>	w <sup>-</sup> ,P[DS1] 3. Chromosom	U. Mettler
<i>DS1-1 T4</i>	w <sup>-</sup> ,P[DS1-1] X Chromosom	U. Mettler
<i>DS1-2 T4</i>	w <sup>-</sup> ,P[DS1-2] X Chromosom	U. Mettler
<i>DS1-3 T18</i>	w <sup>-</sup> ,P[DS1-3] Chromosom nicht bestimmt	U. Mettler
<i>DS2 T2</i>	w <sup>-</sup> ,P[DS2] 3. Chromosom	U. Mettler
<i>DS2 T7</i>	w <sup>-</sup> ,P[DS2] 3. Chromosom	U. Mettler
<i>HZ4+1kb up</i>	w <sup>-</sup> ,P[HZ4+1kb up] alle Insertionsstämme	U. Mettler
<i>UP3</i>	w <sup>-</sup> ,P[UP3] alle Insertionsstämme	U. Mettler

Tabelle 2-3: In dieser Arbeit verwendete Fliegenstämme

## 2.5 Fliegenhaltung

*Drosophila melanogaster*-Fliegenstämme werden in Kunststoffzuchtgefäßen mit Schaumstoffstopfen auf Nährmedium bei 25°C gehalten. Die Generationszeit beträgt bei 25°C ca. 15 Tage (Ashburner, 1989). Um Kontaminationen durch Schimmel und Milben einzudämmen, werden die Fliegen alle 14 Tage in neue Zuchtgefäße gesetzt.

Zur Verbreiterung eines Fliegenstamms setzt man die Fliegen alle zwei bis drei Tage in neue Zuchtgefäße und füttert sie zusätzlich mit Trockenhefe, um die Eiablage zu stimulieren. Fliegenstämme, die nicht für Experimente genutzt werden, hält man bei 18°C. Bei dieser Temperatur dauert die Generationszeit etwa doppelt so lange wie bei 25°C, so dass die Fliegen nur alle vier Wochen in neue Zuchtgefäße umgesetzt werden müssen.

## 2.6 Genetische Kreuzungen

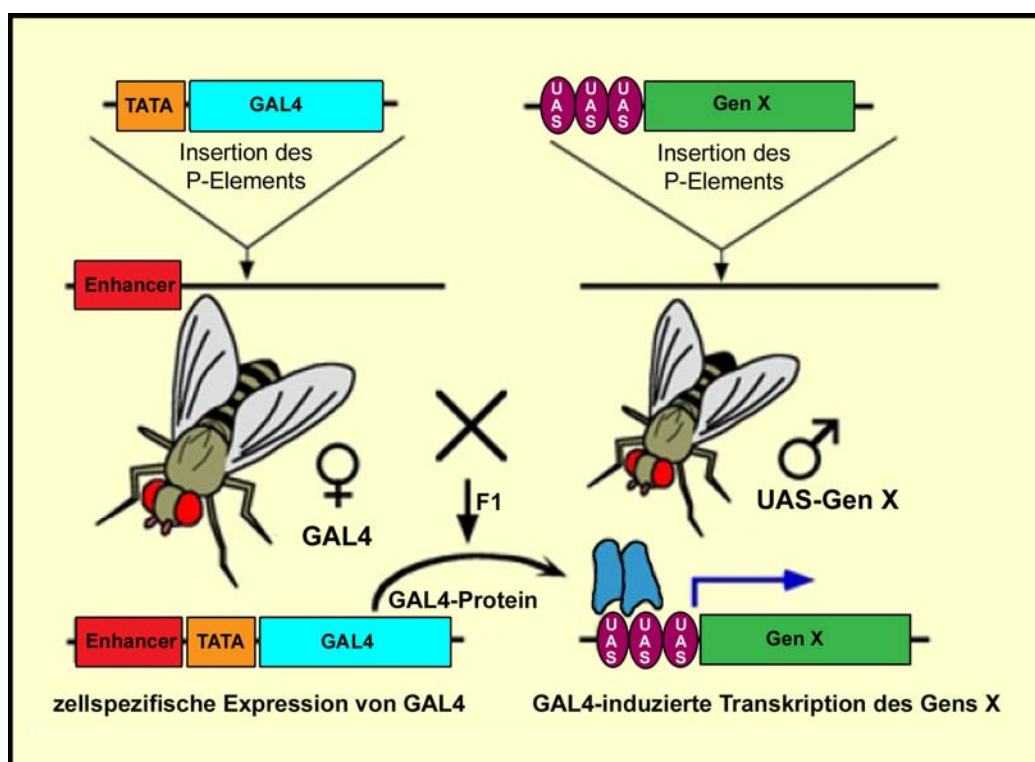
Fliegen zweier Stämme werden miteinander gekreuzt, indem jungfräuliche Weibchen des einen Stammes mit Männchen des anderen Stammes verpaart werden. Beim Sammeln von jungfräulichen Weibchen macht man sich zunutze, dass männliche Fliegen erst vier bis sechs Stunden nach dem Schlüpfen geschlechtsreif werden. Daher sammelt man alle vier Stunden (bei 25°C) die frisch geschlüpften Weibchen ab. Die in dieser Zeit geschlüpften Männchen werden verworfen.

Sollen die Embryonen der F1-Generation analysiert werden, füttert man die Fliegen zunächst über zwei bis drei Tage mit Hefe und überführt sie dann in Ablagegefäße (s. Kap. 2.8). Läuft ein Kreuzungsexperiment über mehrere Generationen, so setzt man die Elterngeneration alle zwei bis drei Tage in neue Zuchtgefäße und füttert sie zusätzlich mit Trockenhefe. Bevor die F1-Generation schlüpft, werden evtl. noch vorhandene Fliegen aus der Parentalgeneration im jeweiligen Gefäß entfernt.

## 2.7 Ektopische Expression von Genen mit Hilfe des GAL4/UAS-Systems

Mit dem GAL4/UAS-System (Brand und Perrimon, 1993) ist es möglich, Gene in einem räumlich und zeitlich spezifischen Muster in *Drosophila* zu exprimieren. Dazu werden zwei P-Element-tragende Fliegenstämme miteinander gekreuzt. Einer dieser Stämme hat ein P-Element inseriert, das für GAL4 kodiert. GAL4 ist ein Transkriptionsfaktor, der an UAS-Sequenzen bindet (upstream activating sequence) und in Hefe für die Transkription von drei Enzymen des Galaktosestoffwechsels zuständig ist (Stryer, 1995). In dem P-Element-Stamm steht GAL4 unter der Kontrolle eines endogenen Enhancers. Dieser ist zu bestimmten Zeiten in der Entwicklung von *Drosophila* in definierten Zellen aktiv, weshalb nur in diesen Zellen

GAL4 exprimiert wird. Fliegen dieses Stammes kreuzt man wiederum mit Fliegen, die ein P-Element besitzen, auf dem sich UAS-Sequenzen und das Gen befinden, das ektopisch exprimiert werden soll. In den aus dieser Kreuzung entstehenden Embryonen wird GAL4 exprimiert, sobald der Enhancer aktiv wird unter dessen Kontrolle GAL4 steht. GAL4 kann dann an die UAS-Sequenzen binden und aktiviert so die Transkription des nachfolgenden Gens. Mit dem GAL4/UAS-System können nach dem Baukastenprinzip alle UAS-Gen-Konstrukte zeitlich koordiniert in festgelegten Zellen und Geweben exprimiert werden.



**Abb. 2.1: Funktionsweise des GAL4/UAS-Systems**

Fliegen, die ein P-Element inseriert haben, das für GAL4 kodiert, werden mit Fliegen gekreuzt, die ein P-Element tragen, das für UAS und das Gen kodieren, welches ektopisch exprimiert werden soll (Gen X). GAL4 steht unter der Kontrolle eines endogenen Enhancers und wird in denjenigen Zellen exprimiert, in denen der Enhancer aktiv ist. In diesen Zellen aktiviert GAL4 die Expression des Gens X. Abbildung mit freundlicher Genehmigung von T. Bobrzynski.

## 2.8 Eiablagen

Zur Eiablage überführt man die Fliegen in Kunststoffgefäße, deren Boden aus einem luftdurchlässigen Drahtnetz besteht. Die Gefäße werden mit einer mit Hefe bestreuten Apfelsaftagarplatte (s. Kap. 2.3) verschlossen. Auf diese Platten legen die Fliegen ihre Eier ab. Durch die Wahl der Inkubationszeit und -temperatur erhält man

Embryonen im gewünschten Entwicklungsstadium (Bestimmung der Stadien nach (Campos-Ortega und Hartenstein, 1985). Am häufigsten werden über Nacht-Ablagen durchgeführt (ca. 14h). Auf diese Weise erhält man ein Gemisch aller Entwicklungsstadien. Die Eiablage erfolgt normalerweise bei 25°C. Bei GAL4/UAS-Kreuzungsexperimenten wird die maximale ektopische Expression erreicht, wenn sich die Eier bei 29°C entwickeln.

## 2.9 Chemische Dechorionisierung der Embryonen

Zunächst werden die Apfelsaftagarplatten, auf denen sich die Eier befinden, mit Wasser überschichtet und die Embryonen mit einem Pinsel vom Agar gelöst. Danach werden die Embryonen in einen Trichter mit Auffangnetz eingespült. Der Trichter wird etwa drei Minuten in ein Gefäß mit Chlorbleichlauge (7,5%) gestellt. Die Chlorbleiche löst das Chorion mit den Atemhörnchen vom Embryo ab. Anschließend werden die Embryonen gründlich mit Wasser gespült.

## 2.10 Fixierung der Embryonen

Dechorionisierte Embryonen werden in Reaktionsgefäße mit Fixierlösung (s. Kap. 2.9 und 2.3) überführt und auf dem Schüttler inkubiert. Für Antikörperfärbungen wählt man eine Inkubationszeit von 20min, für eine *in situ*-Hybridisierung inkubiert man 25min. Um ein gutes Fixiererergebnis zu erreichen, sollten die Reaktionsgefäße schräg auf den Schüttler gelegt werden, damit die Embryonen möglichst häufig mit der Phasengrenze in Berührung kommen. Zum Entfernen der Vitellinhülle zieht man die untere Phase aus dem Reaktionsgefäß ab und gibt ca. 500µl Methanol (abs.) hinzu und schüttelt das Gefäß auf dem Vortexer etwa 20s. Durch die Scherkräfte wird die Vitellinhülle mechanisch beseitigt. Als Folge sinken die Embryonen auf den Boden des Gefäßes. Nun wird erneut die untere Phase abgezogen, mit 500µl Methanol aufgefüllt und noch einmal 20s geschüttelt. Danach zieht man die Flüssigkeit ab,

spült<sup>1</sup> die Embryonen mehrere Male mit Methanol und wäscht<sup>1</sup> 3x10min mit Methanol. Die Embryonen können direkt weiter verwendet werden oder auch für einige Wochen bei –20°C gelagert werden.

## 2.11 Antikörperfärbung

Der primäre Antikörper wird in der angegebenen Konzentration in PBT gelöst. Um Schimmel und Bakterienbefall zu verhindern, versetzt man die Antikörperlösung mit 0,03% NaN<sub>3</sub>. Dechorionisierte und fixierte Embryonen (s. Kap. 2.9 und 2.10) werden 5x mit PBT gespült und anschließend 3x15min in PBT inkubiert. Danach zieht man das PBT ab, gibt den primären Antikörper zu und inkubiert die Embryonen über Nacht bei 4°C. Anschließend werden die Embryonen mehrmals mit PBT gespült und erneut 3x15min in PBT inkubiert. Alle Wasch- und Inkubationsschritte erfolgen auf dem Schüttler. Primäre Antikörper können mehrmals verwendet werden und sollten bei 4°C gelagert werden.

## 2.12 *In situ*-Hybridisierung

Zur Durchführung einer *in situ*-Hybridisierung mit anschließender Fluoreszenzfärbung werden dechorionisierte und fixierte Embryonen (s. Kap. 2.9 und 2.10) in PBTween gespült und 4x15min in PBTween gewaschen. Um die Autofluoreszenz zu unterdrücken, werden die Embryonen mit Natriumborhydrid behandelt (0,001g/1ml PBT). Dazu invertiert man das Reaktionsgefäß und lässt es dann 10min offen unter dem Abzug stehen. Anschließend spült man 2x und wäscht 5x10min mit PBTween. Die Embryonen werden dann nacheinander mit PBTween, PBTween/Hybridisierungslösung (1:1) und Hybridisierungslösung für je 10min auf dem Thermoschüttler bei 55°C inkubiert.

---

<sup>1</sup> Beim Spülen wird die Flüssigkeit im Reaktionsgefäß ausgetauscht, eine Inkubation auf dem Schüttler unterbleibt aber. Beim Waschen schließt sich an den Austausch der Flüssigkeit ein Inkubationsschritt auf dem Schüttler an.

Die Prähybridisierung erfolgt 2h bei 55°C mit 10µl ssDNA (Heringssperma 10mg/ml) in 990µl Hybridisierungslösung. Die Heringssperma/Hybridisierungslösung wird zuvor aufgeköcht und auf Eis abgekühlt. Bevor man die Sonde hybridisiert, kocht man die in Hybridisierungslösung verdünnte Sonde zusammen mit 1% ssDNA 2min bei 100°C auf und kühlt sie auf Eis ab. Die Hybridisierung erfolgt über Nacht bei 4°C auf dem Schüttler. Am nächsten Tag wäscht man zunächst 40min mit Hybridisierungslösung, 40min mit Hybridisierungslösung/PBTween (1:1) und 2x30min mit PBTween bei 65°C. Daran schließt sich ein letzter Waschriff mit PBTween an (30min bei Raumtemperatur).

### **2.13 Meerrettich-Peroxidase-Färbung**

Dechorionisierung, Fixierung und Inkubation mit dem primären Antikörper erfolgen, wie in den Kap. 2.9, 2.10 und 2.11 beschrieben. Für die Meerrettich-Peroxidase-Färbung wird ein biotinylierter sekundärer Antikörper verwendet. Sekundäre Antikörper binden an den konstanten Bereich des primären Antikörpers. Diese konstanten Bereiche sind innerhalb einer Spezies identisch. Spezifische sekundäre Antikörper binden demnach an alle primären Antikörper, die aus der gleichen Tierart stammen. Man löst den sekundären Antikörper in der entsprechenden Verdünnung in PBT und inkubiert die Embryonen 2h. Anschließend werden die Embryonen 3x mit PBT gespült und 3x15min in PBT inkubiert. Während dieser Waschriffte setzt man die AB-Lösung an (Vectastain, ABC-Kit). Dazu gibt man je 4µl Lösung A und B zu 300µl PBT und inkubiert die Lösung 30min. Der AB-Komplex dient der Signalverstärkung und enthält Avidin und biotinylierte Meerrettich-Peroxidase (Horse Radish Peroxidase, HRP). Avidin bindet mit hoher Affinität an Biotin und verfügt über vier Bindestellen für Biotin. Es koppelt den biotinylierten sekundären Antikörper an die HRP. Die Embryonen werden 1h in der A/B-Lösung inkubiert. Danach spült und wäscht man mit PBT. Nun gibt man 500µl mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> versetzte DAB-Lösung (s. Kap. 2.3) hinzu. Die HRP setzt das DAB zu einem braunen Farbstoff um. Bei optimaler Färbung der Embryonen stoppt man die Reaktion durch Spülen und gründlichem Waschen mit PBT ab. Anschließend werden die Embryonen 2x in PBS gespült und in Glycerin (70%) gelagert. Alle Wasch- und Inkubationsschritte erfolgen auf dem Schüttler.

## 2.14 Fluoreszenzfärbung

Dechorionisierung, Fixierung und Inkubation mit dem primären Antikörper erfolgen wie in den Kap. 2.9, 2.10 und 2.11 beschrieben. Man gibt den sekundären, mit Fluoreszenzfarbstoff gekoppelten Antikörper zu und inkubiert die Embryonen 2h. Nach der Inkubation spült und wäscht man gründlich mit PBT. Nach zweimaligen Spülen in PBS werden die Embryonen in Glycerin (70%) überführt. Da Fluoreszenzfarbstoffe leicht ausbleichen, sollten die Embryonen während der Wasch- und Inkubationszeiten in einem lichtundurchlässigen Gefäß aufbewahrt werden. Alle Wasch- und Inkubationsschritte erfolgen auf dem Schüttler.

## 2.15 Tyramid-Verstärkungssystem

Nach Färbungen mit bestimmten Antikörpern, wie bspw. dem  $\alpha$ -Seven-up-Antikörper, zeigt sich nach der Detektion mit den herkömmlichen Methoden nur ein schwaches Signal (s. Kap. 2.12 und 2.13). In solchen Fällen verwendet man zur Signalverstärkung das TSA-Kit (Perkin Elmer).

Die Antikörperfärbung wird wie in Kap. 2.11 beschrieben, durchgeführt. Nach dem Abziehen des primären Antikörpers, werden die Embryonen 10min in  $H_2O_2$ -versetztem PBT (10 $\mu$ l  $H_2O_2$  in 1ml PBT) inkubiert. Anschließend spült man 3x und wäscht 3x15min mit PBT. Danach werden die Embryonen mit einem sekundären biotinylierten Antikörper 2h inkubiert. Nun spült man 3x und wäscht 3x15min mit PBT. Als nächstes werden die Embryonen mit Streptavidin-HRP (1:500 in PBT) 30min inkubiert. Nach 3x Spülen und Waschen (jeweils 5min) mit TNT werden die Embryonen 10min mit Tyramid-Cy3 (1:50 in Amplification Diluent) inkubiert. Anschließend spült man 5x und wäscht 4x15min mit TNT. Alle Wasch- und Inkubationsschritte erfolgen auf dem Schüttler.

Antikörper	Herkunftstier	Konzentration	Bezugsquelle/Referenz
$\alpha$ - $\beta$ -Gal	Kaninchen	1:750	Cappel
$\alpha$ - $\beta$ -Gal	Maus	1:2.000	Cappel
$\alpha$ -Castor	Kaninchen	1:500	W. Odenwald
$\alpha$ -Eagle	Kaninchen	1:500	(Dittrich et al., 1997)
$\alpha$ -Eagle	Maus	1:10	DSHB
$\alpha$ -Engrailed	Maus	1:3	Developmental Studies Hybridoma Bank
$\alpha$ -Even-skipped	Kaninchen	1:5.0000	M. Frasch
$\alpha$ -Even-skipped	Maus	1:3	Developmental Studies Hybridoma Bank
$\alpha$ -Hunchback	Meerschweinchen	1:1.000	T. Novotny (Mettler et al., 2006)
$\alpha$ -Krüppel	Meerschweinchen	1:800	(Kosman et al., 1998)
$\alpha$ -Pdm	Kaninchen	1:500	W. Chia
$\alpha$ -Prospero	Maus	1:10	C. Doe
$\alpha$ -Reverse Polarity	Maus	1:20	Developmental Studies Hybridoma Bank
$\alpha$ -Seven up	Maus	1:1.000	Y. Hiromi
$\alpha$ -Zfh-2	Ratte	1:200	M. Lundell

**Tabelle 2-4: In dieser Arbeit verwendete primäre Antikörper**

Antikörper	Herkunftstier	Konzentration	Bezugsquelle/Referenz
$\alpha$ -Kaninchen-Biotin	Esel	1:250	Dianova
$\alpha$ -Maus-Biotin	Esel	1:250	Dianova
$\alpha$ -Kaninchen-Cy3	Esel	1:250	Dianova
$\alpha$ -Maus-Cy3	Esel	1:250	Dianova
$\alpha$ -Meerschweinchen-Cy3	Ziege	1:250	Dianova
$\alpha$ -Ratte-Cy3	Esel	1:250	Dianova
$\alpha$ -Kaninchen-FITC	Ziege	1:250	Dianova
$\alpha$ -Kaninchen-Cy5	Esel	1:250	Dianova
$\alpha$ -Maus-Cy5	Ziege	1:250	Dianova
$\alpha$ -Meerschweinchen-Cy5	Ziege	1:250	Dianova
$\alpha$ -Dig-POD	Schaf	1:1.000	Roche
$\alpha$ -FITC-POD	Schaf	1:1.000	Roche

**Tabelle 2-5: In dieser Arbeit verwendete sekundäre Antikörper**

## 2.16 Anfertigen von Präparaten zur mikroskopischen Analyse

Zur lichtmikroskopischen Analyse des embryonalen Nervensystems von *Drosophila* bieten sich zwei Arten von Präparaten an. Für eine Übersicht eignen sich „Whole mount“-Präparate, detaillierte Analysen können mit flach aufpräparierten Embryonen durchgeführt werden.

### 2.16.1 „Whole mount“-Präparate

Auf einem Objektträger werden zwei Deckgläschen mit Nagellack fixiert. In den Zwischenraum gibt man einen Tropfen Glycerin (70%) mit Embryonen in den gewünschten Stadien. Der Tropfen und die darin schwimmenden Embryonen werden gleichmäßig zwischen den als Abstandhaltern dienenden Deckgläschen verteilt. Nun legt man ein weiteres Deckgläschen so über die beiden fixierten Deckgläschen, dass

es an beiden Seiten die unteren Deckgläschen überragt. Die Abstandhalter verhindern, dass die Embryonen zerdrückt werden. Durch Bewegen des oberen Deckgläschens können die Embryonen nach Belieben ausgerichtet werden.

### **2.16.2 Präparate von flach aufpräparierten Embryonen**

Zunächst werden in Glycerin gelagerte Embryonen auf einen Hohlschliffobjektträger überführt. Auf einen zweiten Objektträger gibt man ca. 6-10 $\mu$ l des entsprechenden Einbettmediums. Bei nicht fluoreszierenden Färbungen verwendet man Glycerin (70%), bei Fluoreszenzfärbungen benutzt man Quenching Medium (Vectashield mounting medium H-1000, Vector Laboratories). Nun sucht man sich Embryonen des gewünschten Stadiums unter dem Binokular heraus und überführt sie ins Präparationsmedium. Zum Präparieren werden die Embryonen möglichst weit aus dem Medium herausgezogen, so dass sie flach aufliegen und weniger beweglich sind. In den Embryonalstadien 9-12 ist das Bauchmark noch nicht kondensiert und muss in seiner ganzen Länge ausgestreckt werden. Dazu fixiert man den Kopf des Embryos mit einer Wolframnadel; eine zweite Nadel führt man in den Hohlraum zwischen dem Bauchmark ein und klappt mit dieser Nadel das Bauchmark um. Die Embryonen werden mit der Epidermis nach oben ausgerichtet.

Embryonen späterer Stadien werden zunächst so orientiert, dass sie mit der Ventralseite auf dem Objektträger aufliegen. Nun macht man mit einer Nadel einen Schnitt entlang der dorsalen Mittellinie und trennt die Verbindung des Vorderdarms und der Epidermis am Kopf. Dann entfernt man den Darm und klappt die Epidermis zu beiden Seiten nach außen.

Zum Einbetten werden die Embryonen am Rand des Einbettmediums aufgereiht. Ein Deckgläschen wird an der Seite, an der sich die Embryonen befinden, auf den Objektträger gelegt. Mit Hilfe einer feinen Pinzette lässt man das Deckgläschen langsam abgleiten. Zum Schluss werden die Ränder des Deckgläschens mit Nagellack versiegelt.

## 2.17 Mikromanipulation

Zur Erzeugung transgener Fliegenstämme müssen die entsprechenden P-Elemente stabil im Genom der Fliege integriert werden. Bei *Drosophila* nutzt man den Vorteil des syncytialen Blastoderms aus. In der frühen Entwicklung finden nur Kernteilungen, aber keine Cytokinese statt. Man injiziert die P-Element-DNA in den posterioren Pol, wo sich später die Keimbahnzellen, die so genannten Polzellen formieren. Nach der zehnten syncytialen Teilung entstehen 12-14 Polzellen (ca. 1h 20min bei 25°C). Sie sind die ersten Zellen, die im Organismus gebildet werden. Beim Einziehen der Zellwände wird die P-Element-DNA in die Polzellen eingeschlossen und kann mit Hilfe der ebenfalls injizierten Transposase ins Genom inserieren. Fliegen der F1-Generation, die aus transformierten Keimbahnzellen entstehen, tragen das P-Element. Um solche Fliegen zu erkennen, erfolgt die Injektion von P-Elementen in weißäugige *white*<sup>-</sup>-Fliegen. Auf dem P-Element befindet sich ein *white*<sup>+</sup>-Gen, das für rote Augenfarbe kodiert. Eine P-Element-tragende Fliege in der F1-Generation kann man an der orange-roten Augenfarbe erkennen.

### 2.17.1 Vorbereitung der Injektionslösung und des Mikromanipulators

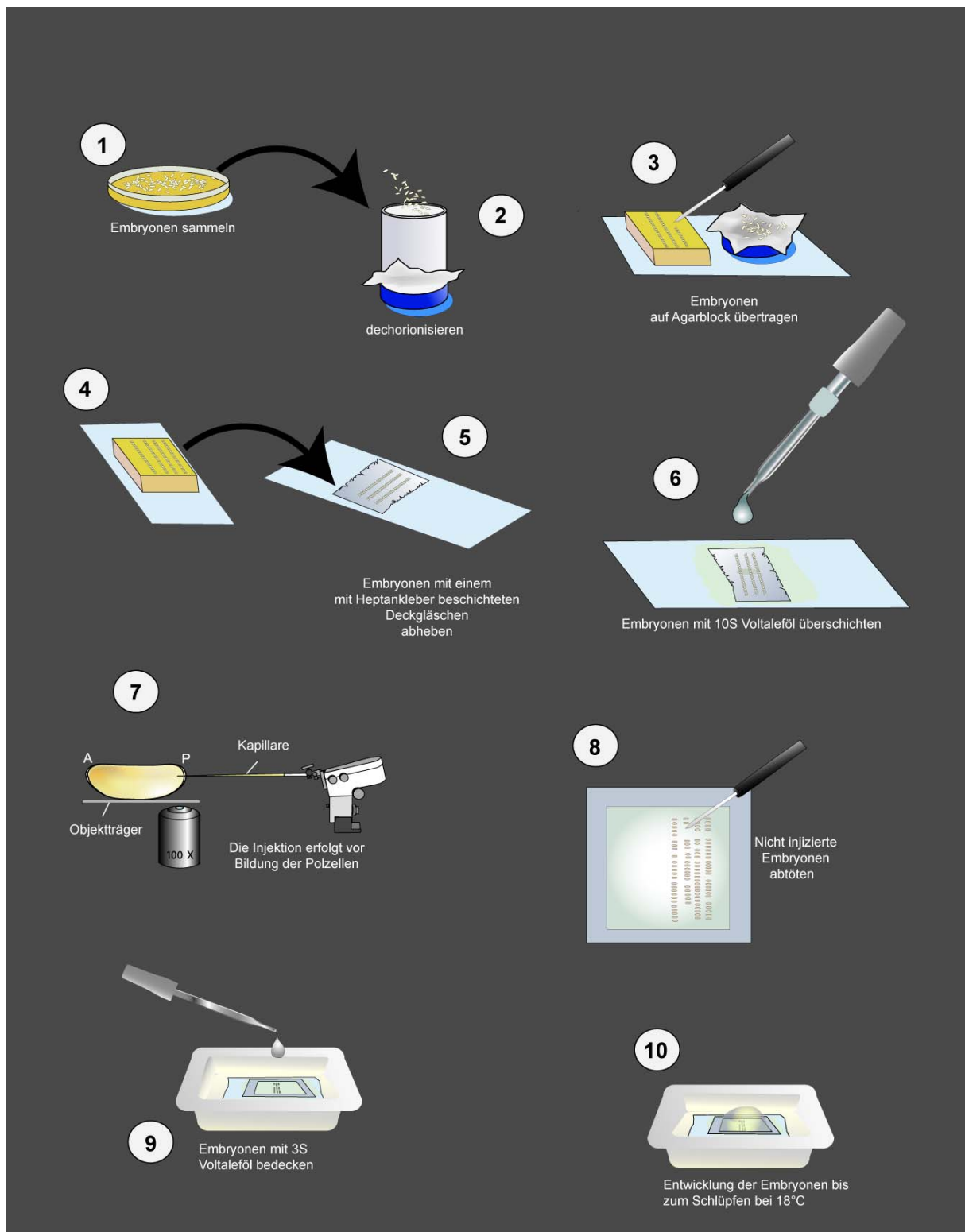
Die Konzentration der Plasmid-DNA in der Injektionslösung sollte etwa 1µg/µl betragen. In einen Ansatz von 20µl werden zudem 2µl 10fach Injektionspuffer und 0,6µl pΔ2-3 Helferplasmid (ca. 25ng/µl) hinzugefügt. Das Helferplasmid verfügt über die Transposase, die notwendig ist, um das P-Element im Genom zu integrieren.

Die Injektionsapparatur besteht aus einem Mikroskop mit einem 10x Objektiv, einem Mikromanipulator mit Injektionskapillare und einer Druckeinheit, die an eine Sauerstoffflasche angeschlossen ist. Eine ausgezogene Glaskapillare (GB 100-TF 8P, Science Products) wird mit 0,5µl Injektionslösung befüllt. Die Kapillare wird in den Mikromanipulator eingesetzt und an die Druckeinheit angeschlossen. An einer gebrochenen Kante eines Deckgläschens bricht man die Spitze der Kapillare ein wenig, so dass sie sehr scharfkantig ist und nur wenig Flüssigkeit bei Betätigung der Druckeinheit freigibt.

### 2.17.2 Vorbereitung der Embryonen und Injektion der Plasmid-DNA

Embryonen aus halbstündigen Eiablagen werden dechorionisiert (s. Kap. 2.9) und auf einem Stück Apfelsaftagar hintereinander aufgereiht. Dabei ist darauf zu achten, dass alle Embryonen die gleiche anterior-posterior Orientierung aufweisen. Ein zuvor dünn mit Heptankleber bestrichenes Deckgläschen wird vorsichtig auf die Embryonen gedrückt und wieder abgezogen. Als Folge bleiben die Embryonen am Heptankleber haften. Nun lässt man die Embryonen trocknen. Die Trocknungszeit richtet sich nach Raumtemperatur und Luftfeuchtigkeit. Testweise empfiehlt es sich, mit einer Trocknungszeit von 8min 30s zu beginnen. Nach dem Trocknen werden die Embryonen mit einem Tropfen 10s-Voltalef-Öl überschichtet.

Das Deckgläschen wird auf einem Objektträger mit einem Tropfen Glycerin fixiert und in den Objektträgertisch des Mikroskops eingespannt. Nun injiziert man eine kleine Menge Injektionslösung in den posterioren Pol des Embryos. Läuft der Embryo bei dieser Prozedur aus, so ist entweder die Kapillare nicht spitz genug oder der Embryo ist nicht lange genug getrocknet worden. Falls Schwierigkeiten auftreten, mit der Nadel in den Embryo einzustechen, ist die Kapillare in der Regel zu stumpf oder verstopft. Nach dem Injizieren werden nicht injizierte und zu alte Embryonen abgetötet. Das Deckgläschen mit den injizierten Embryonen wird in ein kleines Wägschälchen überführt und mit 3s-Voltalef-Öl überschichtet (Abb. 2.2). Die Embryonen werden bis zum Schlüpfen (ca. 48h) bei 18°C gehalten. Die geschlüpften Larven werden abgesammelt und in ein kleines Zuchtgefäß, das mit etwas „instant drosophila medium Blue“ (Carolina Biological Supply Company) versetzt wurde, überführt.



**Abb. 2.2: Vorbereitung und Injektion der Embryonen**

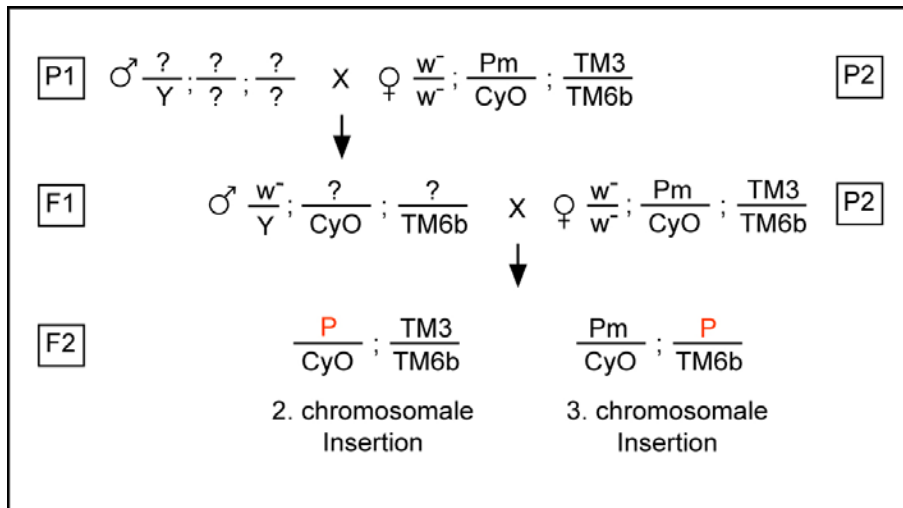
Embryonen aus halbstündigen Eiablagen werden dechorionisiert (1, 2) und auf einem Stück Apfelsaftagar aufgereiht (3, 4). Anschließend überführt man die Embryonen auf ein mit Heptankleber beschichtetes Deckglas (5). Nach dem Trocknen werden die Embryonen mit 10s-Voltalef-Öl überschichtet (6). Mit Hilfe des Mikromanipulators wird die Plasmid-DNA in den posterioren Pol des Embryos injiziert (7). Nach dem Injizieren werden zu alte und nicht injizierte Embryonen abgetötet (8). Danach wird das Deckglas mit den Embryonen in Wägschälchen überführt (9) und mit 3s-Voltalef-Öl überschichtet. Abbildung verändert nach C.Berger und V. Linne.

## 2.18 Etablieren transgener Fliegenstämme und Bestimmung des Insertionschromosoms

Aus den Larven entwickeln sich nach etwa 100h die adulten Fliegen. Diese Fliegen werden abgesammelt und einzeln mit *white*<sup>-</sup>-Fliegen gekreuzt. Fliegen der F1-Generation, die eine rötliche Augenfarbe aufweisen, haben das P-Element inseriert. Die aus einer Kreuzung geschlüpften rotäugigen Fliegen werden miteinander verpaart, um den Stamm zu etablieren.

Zur Bestimmung des Chromosoms, auf dem das P-Element inseriert ist, werden die transgenen Männchen mit *white*<sup>-</sup>-Weibchen gekreuzt, die zweit- und dritts-chromosomale Doppelbalancer besitzen. Balancerchromosomen können aufgrund zahlreicher Inversionen nicht rekombinieren. Da Balancerchromosomen rezessive Letalmutationen tragen, können sie nur heterozygot auftreten. Darüber hinaus verfügen sie über dominante Marker, anhand derer man die Anwesenheit eines Balancerchromosoms an der Imago nachweisen kann.

Haben in der F1-Generation nur die Weibchen rote Augen, so ist das P-Element auf dem X-Chromosom inseriert, da die Männchen aus dieser Kreuzung ihr X-Chromosom, auf dem sich das *white*<sup>-</sup>-Gen befindet, von einem Weibchen des Balancer-Stammes erhalten haben. Falls es sich nicht um eine X-chromosomale Insertion handelt, werden rotäugige Männchen aus der F1-Generation wiederum mit Weibchen des Balancer-Stamms gekreuzt. Das Insertionschromosom kann durch die Kombination der Marker, welche die Fliegen der F2-Generation aufweisen, bestimmt werden (Abb. 2.3). Viertchromosomale Insertionen kommen aufgrund der geringen Größe des vierten Chromosoms nur sehr selten vor.



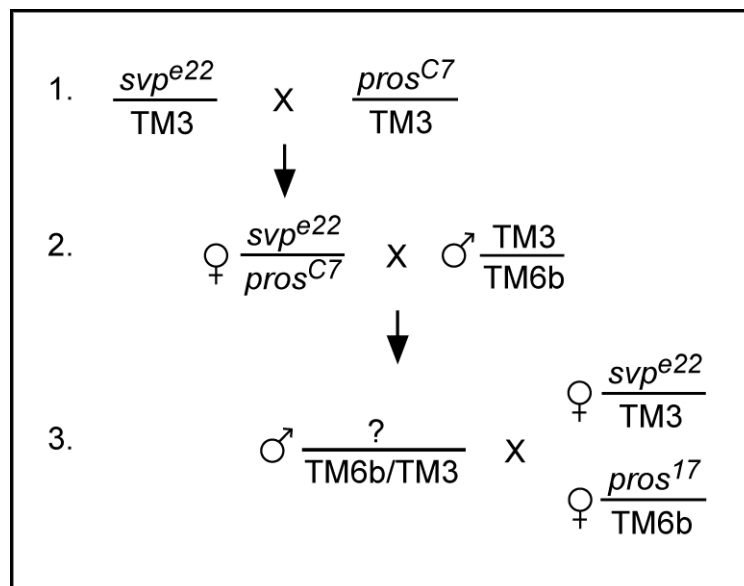
**Abb. 2.3: Kreuzungsschema zur Bestimmung des P-Element-tragenden Chromosoms**

Zur Bestimmung des P-Element-tragenden Chromosoms werden Männchen des P-Element-Insertionsstammes mit *white*<sup>-</sup>-Weibchen gekreuzt, die zweit- und drittchromosomale Doppelbalancer besitzen. Sind in der F1-Generation alle Männchen weißäugig, so handelt es sich um eine X-chromosomale Insertion. Falls dies nicht der Fall ist, werden Männchen aus der F1-Generation mit Weibchen des *white*<sup>-</sup>-Balancerstammes gekreuzt. Aus der Kombination der Marker, welche die Fliegen der F2-Generation aufweisen, lässt sich das Insertionschromosom bestimmen.

## 2.19 Herstellung der *seven-up,prospero*-Doppelmutante

Die Gene *svp* und *pros* befinden sich auf dem rechten Arm des dritten Chromosoms (*svp*: 87B4-5, *pros*: 86E2-4). Um einen Stamm herzustellen, der für beide Gene mutant ist, müssen die beiden mutanten Chromosomen miteinander rekombiniert werden. Meiotische Rekombination findet bei *Drosophila* nur in Weibchen statt. Um diese Chromosomen zu rekombinieren, werden die *pros*- und *svp*-Mutanten zunächst gekreuzt (Abb. 2.4, 1.). Aus der F1-Generation werden jungfräuliche Weibchen abgesammelt, die kein Balancerchromosom haben. In diesen Weibchen können die homologen Chromosomen in den Keimbahnzellen rekombinieren. Die Weibchen werden mit Männchen gekreuzt, die einen drittchromosomalen Doppelbalancer besitzen (Abb. 2.4, 2.). Im nächsten Schritt testet man, ob eine Rekombination stattgefunden hat, d.h. ob die Nachkommen dieser Kreuzung beide Mutationen auf einem Chromosom tragen. Dazu wird jeweils ein männlicher Nachkomme aus dieser Kreuzung für einige Tage mit drei bis fünf *pros*- und *svp*-mutanten Jungfrauen verpaart (Abb. 2.4, 3.). Falls vorhanden, benutzt man für diese Kreuzung ein anderes Allel als man für die Rekombination verwendet hat. Dadurch lassen sich falsch-positive Rekombinationsereignisse aufgrund einer Rekombination anderer letaler Faktoren auf dem Allel-tragenden Chromosom ausschließen. Nach der Befruchtung

werden die *pros*- und *svp*-mutanten Weibchen voneinander getrennt und zur Eiablage in neue Kunststoffzuchtgefäße gesetzt. Gehen aus beiden Kreuzungen nur Fliegen hervor, die einen drittchromosomalen Balancer tragen, so sind die beiden Mutationen auf einem Chromosom rekombiniert. Insgesamt mussten 1.400 Kreuzungen analysiert werden, um eine positive Rekombination zu finden. *svp* und *pros* sind 865.145bp voneinander getrennt. Geht man davon aus, dass ein Centimorgan 350.000-450.000bp umfasst (dieser Wert entspricht einem Centimorgan auf dem X-Chromosom, persönliche Mitteilung Gert Pflugfelder, Mainz), wäre eine Rekombinationshäufigkeit von etwa 2% zu erwarten gewesen.



**Abb. 2.4: Kreuzungsschema zur Herstellung einer *pros,svp*-Doppelmutante**

Zur Herstellung eines *pros,svp*-doppelmutanten Stammes, werden *pros*-Mutanten mit *svp*-Mutanten gekreuzt (1). Weibchen der F1-Generation, die keinen drittchromosomalen Balancer tragen, werden mit Männchen eines drittchromosomalen Doppelbalancerstammes gekreuzt (2). Die Männchen, die aus dieser Kreuzung entstehen, werden wiederum einzeln mit *pros* und *svp*-mutanten Weibchen gekreuzt (3). Falls alle Nachkommen aus diesen Kreuzungen einen drittchromosomalen Balancer tragen, wurden die beiden Allele auf einem Chromosom rekombiniert.

## 2.20 Quantifizierung der Expressionsstärke der *UAS-hb*-Konstrukte in den Insertionsstämmen

Um die Expressionsstärke der *UAS-hb*-Konstrukte (s. Kap. 2.4 und Abb. 3.25) in den Insertionsstämmen zu bestimmen, wurden die *hb*-Varianten in Zellen überexprimiert, die normalerweise Hb-negativ sind. Dazu wurden die Konstrukte mit *MZVum-GAL4* überexprimiert. GAL4 wird in diesem Stamm unter anderem in den drei Hb-negativen VUM-Neuronen exprimiert (Landgraf et al., 2003), die aufgrund ihrer medioventralen

Lage im ZNS und ihrer Größe gut zu erkennen sind. An Embryonen aus dieser Kreuzung wurde eine Antikörperfärbung gegen Hb vorgenommen. Die Expression von Hb in den VUM-Neuronen wurde mit der endogenen Hb-Expression im selben Embryo verglichen. Als Vergleichszellen wurde eine gut zu identifizierende Zelle gewählt, die dorsal im Bauchmark in einem Verbund von drei Zellen lokalisiert ist. Am Laserscanning-Mikroskop wurden konfokale Serien des Bauchmarks der Embryonen aufgenommen. Die Intensität des Lasers wurde so reguliert, dass die Fluoreszenzintensität der VUM-Neurone gerade nicht mehr im Sättigungsbereich des Detektors war. Mit der Funktion „Quantify“ der Leica Confocal Software kann die maximale Expression in einem angegebenen Bereich einer Ebene berechnet werden. Es wurden jeweils die Ebenen gewählt, in der die zu messenden Zellen die größte Signalstärke aufwiesen. Pro Embryo wurden jeweils 3-7 Messwerte für die VUM-Neurone und die dorsal gelegene Zelle erhoben. Dieser Vorgang wurde an je vier Embryonen einer Kreuzung durchgeführt. Für jeden Embryo wurde der Quotient aus den Mittelwerten der maximalen Expression der VUM-Neurone und der dorsal lokalisierten Zelle errechnet. Aus den vier Werten (für jeden Embryo der Messreihe) wurde wiederum der Mittelwert ermittelt. Tabelle 2-6 zeigt die durchschnittliche Expressionsstärke für die jeweiligen Insertionsstämme. Die Quantifizierung der Expressionsstärke für *UAS-hb\*Zn2* wurde bereits von Viktoria Linne im Rahmen ihrer Diplomarbeit durchgeführt. Der Wert betrug 2,96 und war damit etwas höher als die damals ermittelte Expressionsstärke von *UAS-hb* (2,67).

MZVum-GAL4 x	Stärke der Expression	Standardabweichung
<i>UAS-hb</i>	2,98	0,84
<i>UAS-hbΔA</i>	1,75	0,37
<i>UAS-hbΔD</i>	2,74	0,61

Tabelle 2-6: Expressionsstärke der *UAS-hb*-Konstrukte

## 2.21 Herstellung der *hb*- und *svp*-RNA-Sonden

Zum Nachweis der *hb*- und *svp*-mRNA, wurden mittels *in vitro*-Transkription der *hb*- und *svp*-cDNA komplementäre RNA-Sonden hergestellt. Die beiden cDNAs waren bereits in Vektoren kloniert (Margolis et al., 1995; Mlodzik et al., 1990). Die *hb*-cDNA befand sich im pBluescript II KS-Vektor (flankiert von *Xba*I-Restriktionsschnittstellen), die cDNA von *svp* war in den pBluescript II SK-Vektor einkloniert worden (flankiert von *Eco*RI-Restriktionsschnittstellen).

Diese Vektoren besitzen an beiden Seiten der „multiple cloning site“ einen Promotor für die T3 bzw. T7-RNA-Polymerase (s. Abb. 7.1 und 7.2). Durch die Wahl der entsprechenden Polymerase können beliebig beide Stränge transkribiert werden. Dazu wurden die Vektoren zunächst durch Restriktionsenzyme linearisiert (s. Kap. 2.29 und Tab. 2.9). Die Schnittstellen sind so gewählt worden, dass sie sich am späteren 3'-Ende der RNA befinden. Auf diese Weise kann ausgeschlossen werden, dass die RNA Sequenzen des Vektors enthält. Es empfiehlt sich Restriktionsenzyme zu verwenden, die keine überhängenden 3'-Enden produzieren, da diese ebenfalls als Startpunkt der RNA-Polymerase dienen können (Schenborn und Mierendorf, 1985). Sollten sich 3'-Überhänge nicht vermeiden lassen, so können diese mit der Klenow- oder der T4-DNA-Polymerase geglättet werden. Nach der *in vitro*-Transkription wird die markierte RNA durch eine ethanolische Fällung aufgereinigt (s. Kap. 2.21.1 und 2.31.3). Um das Degradieren der RNA zu verhindern, muss unter RNase-freien Bedingungen gearbeitet werden (zur Herstellung RNase-freier Lösungen s. Kap. 2.3).

### 2.21.1 *In vitro*-Transkription

Die Markierung der *svp*-RNA erfolgte mit DIG-markiertem UTP, die RNA von *hb* wurde mit UTP-FITC markiert. Es wurden die RNA-Polymerasen T3 (*hb*) und T7 (*svp*) verwendet. Die *in vitro*-Transkription wurde nach den folgenden Angaben des Herstellers durchgeführt (Fluorescein bzw. Dig RNA Labeling Mix, Roche).

Zur Herstellung eines Transkriptionsansatzes von 20µl werden 1µg der linearisierten Plasmid-DNA, 2µl „Labeling Mix“, 2µl 10fach Puffer zusammenpipettiert und gegebenenfalls mit DEPC-H<sub>2</sub>O auf 18µl aufgefüllt. Nach Zugabe von 2µl RNA-Polymerase wird die Lösung gemischt und 2h bei 37°C inkubiert. Zum Abstoppen der

Reaktion gibt man 2µl DNase I dazu, um die DNA-Matrize zu degradieren. Die Aktivität der RNA-Polymerase wird durch Zugabe von 2µl 0,2M EDTA inhibiert. Anschließend wird die RNA gefällt (s. Kap: 2.31.3).

## 2.22 Herstellung von Enhancerfragmenten aus der regulatorischen Region von *hunchback*

Um enhancertragende Bereiche in der genomischen Region von *hb* zu identifizieren, wurden zunächst die potentiell regulatorischen Regionen des *hb*-Gens mittels PCR amplifiziert, wobei der Bac-Klon BACR01F13 (AC009512) als Matrize diente. Das PCR-Produkt wurde anschließend aufgereinigt und in den pCRII-Topo-cloning-Vektor (Invitrogen, s. Abb. 7.3) subkloniert. Die Inserts wurden mit geeigneten Restriktionsendonucleasen aus dem Topo-Vektor geschnitten und in den Enhancervektor C4PLZ kloniert. Der C4PLZ-Vektor verfügt über ein *white*<sup>+</sup>-Mini-Gen und ein LacZ-Reporter-Gen, das mit einem basalen Promoter fusioniert ist (Wharton und Crews, 1993; s. Abb. 7.4).

## 2.23 PCR

Die PCR (polymerase chain reaction) wurde zum Amplifizieren potentiell regulatorischer Regionen von *hb* und zur Bestimmung der Anwesenheit und Orientierung der Inserts im Topo- bzw. im C4PLZ-Vektor verwendet.

### 2.23.1 Herstellung der Amplifikate

Zur Herstellung der PCR-Produkte von UP2, UP3, HZ4+1kb up, DS1 und DS2 wurde das „Expand Long Template PCR System“ (Roche) verwendet. Dieses PCR-System basiert auf einem Polymerasegemisch, das eine Taq-Polymerase und eine Polymerase mit 3′-5′-Exonucleaseaktivität enthält. Dies ermöglicht die weitestgehend fehlerfreie Amplifikation von längeren PCR-Produkten. DS1-1, DS1-2 und DS1-3 wurden mit der Pfu-Polymerase (MBI Fermentas) amplifiziert. Sie verfügt ebenfalls über eine 3′-5′-Exonucleaseaktivität. Die verwendeten Primer sind in

Tabelle 2-7 aufgeführt. Die PCR-Reaktionen wurden nach den Angaben der Hersteller durchgeführt.

Amplifikat	5'-Primer	3'-Primer
UP3	5'-CGA GAT GAG TAA CTG GTA AGT GAA TTT CC-3'	5'-GCA TCT TTA TGA ATA CGC TGC GAC TTC G-3'
UP2	5'-CGA GAG TGT AAG TAT ATG CAT ATG C-3'	5'-CCA CTA CAT TTA CCA CAA ATA GGA TCC-3'
HZ4+1kb up	5'-GCA TAT TTT TGG GCA TGT GGG AAA CTG G-3'	5'-GCT GGA AAT TAA GGC CAC TAA GTC G-3'
DS1	5'-CCT AAC TGT ATT GAA CTG TAG CCA CC-3'	5'-GGA GGA TTA CCA TCG CTT TCA AGG-3'
DS1-1	5'-CCA ATG GAA CTG TCA ACA CG-3'	5'-GGA CTC TCC ACC TAC TCT TC-3'
DS1-2	5'-GGA TTT GGT GTG GGT TAC G-3'	5'-GTC AGC ACA TCC TTG GTG C-3'
DS1-3	5'-CGT CCA TCG TGT CCA CTC C-3'	5'-GGT GGA TGT GTT TCG AGA GC-3'
DS2	5'-GCT ACA AAC AAT GCC ACT TTT CGT GC-3'	5'-GGA AGC GAA GTT GAT GCC TCA CC-3'

Tabelle 2-7: Primer zum Amplifizieren potentiell regulatorischer Bereiche von *hunchback*

### 2.23.2 PCR zur Bestimmung der Anwesenheit und Orientierung eines Inserts im Vektor

Um zu prüfen, ob Inserts erfolgreich in einen Vektor ligiert worden sind bzw. um deren Orientierung im Vektor zu bestimmen, wurden PCRs mit jeweils einem Vektor- und einem Insert-spezifischen Primer durchgeführt. Dazu wurden Bakterienkolonien mit einer Pipettenspitze direkt in den PCR-Ansatz überführt und danach in eine über Nacht-Kultur getaucht (s. Kap. 2.27.1). Dies hat den Vorteil, dass nach einer positiven PCR-Reaktion, die entsprechende Plasmid-DNA zur Präparation bereit steht.

Bei der PCR-Reaktion wurde der anfängliche Denaturierungsschritt auf 15min (bei 95°C) verlängert, um die Bakterienwand aufzubrechen und die DNA für die PCR-Reaktion zugänglich zu machen. Die verwendeten vektorspezifischen Primer sind in Tabelle 2-8 aufgeführt. Die PCRs wurden mit der Taq-Polymerase durchgeführt.

Bezeichnung	Vektor	Sequenz
C4PLZ Reverse Primer	C4PLZ	5'-TCA AAT ACC CTT GGA TCG AAG-3'
M13 Reverse Primer	Topo	5'-CAG GAA ACA GCT ATG AC-3'
M13 Forward Primer	Topo	5'-GTA AAA CGA CGG CCA G-3'
T7 Primer	Topo	5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG-3'

**Tabelle 2-8: Vektorspezifische Primer zur Überprüfung der Anwesenheit und Orientierung von Inserts**

## 2.24 Aufreinigung des PCR-Produkts

Um störende Salze, Primer und die Polymerasen aus PCR-Ansätzen zu entfernen, wurden alle PCR-Produkte mit dem „PCR Purification Kit“ (Qiagen) gemäß den Angaben des Herstellers aufgereinigt. Diese Methode basiert auf der Adsorption der DNA an einer Silikat-Matrix in Anwesenheit chaotroper Substanzen, die eine Hydratation der DNA verhindern. Puffer mit hoher Salzkonzentration verstärken die Adsorption, Puffer mit geringer Salzkonzentration ermöglichen die Elution der DNA.

## 2.25 Subklonierung von PCR-Produkten in den Topo-Vektor

Das „Topo Cloning Kit“ (Invitrogen) stellt eine Erleichterung für die Subklonierung von PCR-Produkten in den pCRII-Topo-cloning-Vektor dar. Sie ist für die Ligation von PCR-Produkten entwickelt worden, die mit der Taq-Polymerase amplifiziert worden sind. An den 3'-Enden des bereits linearisiert vorliegenden Vektors befindet sich jeweils ein Desoxythymidin-Rest. Diese beiden 3'-Enden können mit Desoxyadenosin-Resten des PCR-Produktes ligieren, die durch die Terminale Transferase-Aktivität der Taq-Polymerase generiert werden. Diese Methode erspart den Einsatz von Restriktionsenzymen. Die Ligation wurde nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Nach der Ligation wurden *E. coli* „One Shot“-Zellen mit 2 oder 4 µl des Ligationsansatzes transformiert. Der Topo-Vektor verfügt über eine Ampicillin-Resistenz, daher können transformierte Bakterien auf ampicillinhaltigen-Agarplatten selektioniert werden. Um Insert-tragende und -freie Kolonien

voneinander zu unterscheiden, wird die  $\alpha$ -Komplementationsmethode benutzt. Die verwendeten Bakterien haben eine chromosomale Deletion für das  $\beta$ -Galaktosidase-Gen. Die „multiple cloning site“ des Vektors liegt innerhalb der Sequenz des Gens für die  $\alpha$ -Untereinheit der  $\beta$ -Galaktosidase, die für die Komplementation der Deletion notwendig ist. Eine Insertion innerhalb der „multiple cloning site“ verhindert die Komplementation und inhibiert damit auch die Fähigkeit der Bakterien, X-Gal in einen blauen Farbniederschlag umzuwandeln. Weiße Kolonien sollten daher das PCR-Produkt inseriert haben.

## **2.26 Generierung eines Desoxyadenosin-Überhangs**

Im Gegensatz zur Taq-Polymerase verfügt die Pfu-Polymerase nicht über eine Terminale Transferase-Aktivität und hängt daher kein zusätzliches Desoxyadenosin an das 3'-Ende des neu synthetisierten Strangs. Dies ist aber eine Voraussetzung für eine Topo-Klonierung (s. Kap. 2.25). Aus diesem Grund wird nach erfolgter PCR an die 3'-Enden des PCR-Produkts ein Desoxyadenosin angebracht. Hierfür gibt man zu 30 $\mu$ l PCR-Produkt 1 $\mu$ l dATP (100mM), 4 $\mu$ l 10x Taq-Puffer, 1 $\mu$ l Taq-Polymerase (2u/ $\mu$ l), 1,6 $\mu$ l MgCl<sub>2</sub> (25mM) sowie 2,4 $\mu$ l H<sub>2</sub>O. Dieser Ansatz wird dann für 30min bei 72°C in die PCR-Maschine gegeben.

## **2.27 Gewinnung von Plasmid-DNA**

Zur Gewinnung von Plasmid-DNA wird zunächst das entsprechende Plasmid in Bakterien eingebracht (s. 2.35). Um Plasmid-DNA in ausreichenden Mengen herzustellen, vermehrt man eine Bakterienkolonie, die das gewünschte Plasmid trägt. Dazu wird eine Bakterienkolonie in flüssiges Nährmedium überführt und über Nacht inkubiert. Die optimale Wachstumstemperatur der Bakterien beträgt 37°C. Durch Schütteln der Flüssigkultur während der Inkubationszeit wird sichergestellt, dass die Bakterien ausreichend mit Sauerstoff versorgt sind.

### **2.27.1 Präparation von Plasmid-DNA im kleinen Maßstab**

Eine einzelne Bakterienkolonie wird mit einem sterilen Zahnstocher oder einer kleinen Pipettenspitze aufgenommen und in ein Reagenzglas mit 5ml LB-Amp.-Medium überführt und über Nacht bei 37°C geschüttelt. Am nächsten Morgen zentrifugiert man 3ml der Lösung (5.000U/min, 5min). Dabei werden die Bakterien präzipitiert. Die Präparation der Plasmid-DNA wird unter Zuhilfenahme des „Mini Prep Kits“ (Qiagen) nach dem Handbuch des Herstellers durchgeführt. Diese Art der Plasmid-Präparation erfolgt nach dem Prinzip der alkalischen Lyse. Die Bakterienzellen werden durch die Zugabe eines Detergens aufgeschlossen, dadurch gelangen die Plasmide in Lösung. Ein Zentrifugationsschritt präzipitiert das mit der Zellwand verbundene bakterielle Chromosom und wird so von der Plasmid-DNA getrennt. Anschließend erfolgt eine Aufreinigung der Plasmid-DNA vom Überstand durch Anionen-Austauschchromatographie.

### **2.27.2 Präparation von Plasmid-DNA im großen Maßstab**

Für die Injektion der P-Elemente werden mindestens 20µg Plasmid-DNA pro Injektionsansatz benötigt. Um diese Mengen an DNA zu gewinnen, werden „Midi“-Präparationen durchgeführt. Dazu überführt man eine Bakterienkolonie in 150ml LB-Amp.-Lösung und schüttelt diese über Nacht bei 37°C. Die Zellen werden durch Zentrifugation präzipitiert (13.000U/min, 15min). Nachfolgend wird das „Midi Prep Kit“ (Qiagen) nach den Angaben des Herstellers verwendet. Das „Midi Prep Kit“ basiert ebenfalls auf dem Prinzip der alkalischen Lyse.

## **2.28 Konzentrationsbestimmung von Nucleinsäurelösungen**

Der Nucleinsäuregehalt einer Lösung kann mittels Photometrie bzw. mit Hilfe der Gel-Elektrophorese festgestellt werden. Die photometrische Methode bestimmt die Konzentration der Nucleinsäurelösung durch die Messung der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 260nm. Sie ist zuverlässig bei größeren Mengen an DNA. Um geringe Mengen an DNA zu quantifizieren (unter 100ng/µl), verwendet man die Agarosegel-Elektrophorese. Bei dieser Methode liegt die Nachweisgrenze bei etwa 5ng DNA pro Bande.

### **2.28.1 Photometrische Konzentrationsbestimmung**

Zunächst erfolgt eine Eichung des Photometers mit dem gleichen Puffer, in dem die DNA gelöst ist. Das Photometer wird auf die Messung der optischen Dichte für doppelsträngige DNA (260nm) eingestellt. Zudem muss die Verdünnung der DNA angegeben werden, die üblicherweise 1:100 beträgt. Im zweiten Schritt zieht man 1µl des Puffers ab und ersetzt ihn durch 1µl DNA. Die Lösung vermischt man durch mehrmaliges Auf- und Abziehen der Flüssigkeit mit der Pipette, wobei keine Luftbläschen entstehen dürfen. Nun erfolgt die Messung der DNA-Konzentration. Um das Messergebnis zu verifizieren, wird erneut 1µl der DNA-Lösung hinzugeben, gemischt und die Messung wiederholt. Die zweite Messung sollte dann ca. das Doppelte des ersten Messwertes ergeben. Bei allen Messungen ist darauf zu achten, dass die Küvette immer in der gleichen Orientierung in das Photometer gestellt wird.

### **2.28.2 Konzentrationsbestimmung mittels Gel-Elektrophorese**

Hierfür wird ein Aliquot eines DNA-Größenmarkers zusammen mit einem Aliquot der zu messenden Lösung auf einem Gel aufgetragen. Der Größenmarker kann als Mengenmarker verwendet werden, da die Länge der Fragmente und die aufgetragene Menge der Marker-DNA bekannt ist. Nachdem die DNA elektrophoretisch aufgetrennt worden ist (s. 2.32), wird die Intensität der Bande des zu messenden Aliquots mit den Banden des Größenmarkers verglichen. Die Bande des Markers, welche die gleiche Intensität wie das Aliquot aufweist, enthält die gleiche Menge an DNA.

## **2.29 Restriktion von DNA und verwendete Enzyme**

Restriktionsendonucleasen sind Enzyme, die spezifische DNA-Sequenzen erkennen und in der DNA an der Erkennungssequenz oder in ihrer Nähe Doppelstrangbrüche erzeugen. Dabei entstehen glatte oder überhängende Enden. Für Klonierungszwecke empfiehlt es sich mit Enzymen zu arbeiten, die überhängende Enden erzeugen, denn das erleichtert die spätere Ligation. In dieser Arbeit wurden ausschließlich TypII-Restriktionsenzyme verwendet. Bei diesen Enzymen sind Erkennungs- und Schnittstelle identisch. Restriktionsenzyme benötigen spezielle

Bedingungen zur optimalen Funktion (Puffer, Temperatur; zu ersehen aus der Enzymaktivitätsliste des Herstellers).

Zur Bestimmung der Orientierung des Inserts in einem Vektor wurden etwa 250-500ng der entsprechenden Plasmid-DNA in einem Volumen von 20µl oder 40µl 1h mit den entsprechenden Enzymen inkubiert.

Um Vektoren und Inserts für eine Ligation zu restringieren, wurden jeweils 5µg des C4PLZ-Vektors und des Topo-Vektors mit Insert in einem Volumen von 100µl 4h bis über Nacht inkubiert. Die Inkubationen wurden bei 37°C durchgeführt.

<b>Insert</b>	<b>verwendete Restriktionsenzyme</b>
UP3	<i>EcoRI</i>
UP2	<i>KpnI und NotI</i>
HZ4+1kbUP	<i>EcoRI</i>
DS1	<i>EcoRI</i>
DS1-1	<i>BamHI und NotI</i>
DS1-2	<i>EcoRI</i>
DS1-3	<i>BamHI und NotI</i>
DS2	<i>KpnI und NotI</i>
<i>hb</i> -cDNA in pKS	<i>NotI</i>
<i>svp</i> -cDNA in pSK	<i>NotI</i>

**Tabelle 2-9: In dieser Arbeit verwendete Restriktionsendonucleasen**

### 2.30 Dephosphorylierung

Um eine Selbstligation des Vektors zu unterbinden, werden die Enden des linearisierten Vektors dephosphoryliert. Dazu gibt man nach erfolgter Restriktion 1µl „Shrimp“ Alkalische Phosphatase (SAP, MBI Fermentas) zum Ligationsansatz und inkubiert 30min bei 37°C. Danach erfolgt die Inaktivierung der SAP durch Hitzeeinwirkung (20min bei 65°C).

## 2.31 Konzentrierung und Aufreinigung von Nucleinsäuren

Nach einer Dephosphorylierung bzw. einer Restriktion müssen vor der Weiterverarbeitung störende Salze und Proteine aus der DNA-Lösung entfernt werden. Um Proteine aus Lösungen zu beseitigen, führt man eine Phenol-Chloroform-Extraktion durch. Salze können durch ethanolische Fällungen entfernt werden. Diese beiden Methoden ermöglichen zudem eine Konzentrierung der DNA-Lösung.

### 2.31.1 Phenol-Chloroform-Extraktion

Am einfachsten ist die Phenol-Chloroform-Extraktion mit Hilfe von „Phaselock Caps“ (Eppendorf) durchzuführen. Diese enthalten ein Gel, das sich bei der Phasentrennung durch Zentrifugation zwischen die organische und wässrige Phase einfügt. Man gibt in zuvor abzentrifugierte „Phaselock Caps“ die DNA-Lösung und fügt dasselbe Volumen an Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) hinzu. Die beiden Flüssigkeiten werden durch vorsichtiges Schütteln des Reaktionsgefäßes vermischt und anschließend zentrifugiert (13.000U/min, 5min). Phenol denaturiert die Proteine, die in der Interphase aggregieren. Chloroform denaturiert ebenfalls Proteine und stabilisiert die Phasengrenze. Dadurch trennen sich die wässrige und die organische Phase. Die Proteine sammeln sich in der schwereren organischen Phase, während die DNA in der oberen wässrigen Phase verbleibt. Zwischen den beiden Phasen lagert sich das Gel ab, wodurch das Abziehen der wässrigen Phase erleichtert wird. Die DNA-Lösung wird in ein zweites „Phaselock Cap“ überführt und mit demselben Volumen an Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) versetzt. Anschließend schüttelt man das Reaktionsgefäß und zentrifugiert es (13.000U/min, 5min). Der Isoamylalkohol entfernt die Reste an Phenol aus der Lösung. Die obere wässrige Phase enthält die aufgereinigte DNA.

### 2.31.2 Ethanolische Fällung von DNA

Man versetzt die DNA-Lösung mit dem 2,5fachen Volumen an Ethanol (100%) und mit 1/10 Volumen Na-Acetat (3M, pH5,2). Als Folge fällt die DNA spontan aus. Bei

einer DNA-Konzentration über 250ng/μl ist eine Fällung bei Raumtemperatur effizienter als bei -20°C. Bei geringeren Konzentrationen sollte über Nacht bei einer Temperatur von -20°C gefällt werden (Mühlhardt, 2003). Die Natrium-Ionen maskieren die negative Ladung der DNA und verdrängen das in Ethanol gelöste Wasser. Auf diese Weise präzipitiert die DNA als DNA-Salz-Komplex. Anschließend wird die gefällte DNA zentrifugiert (14.000U/min, 35min, 4°C). Danach zieht man das Ethanol ab und gibt ca. 200μl Ethanol (70%) hinzu und zentrifugiert (14.000U/min, 10min, 4°C). Nach dem Abziehen des Ethanols, wird das Präzipitat in der Vakuumzentrifuge getrocknet und in EB-Puffer (Qiagen) oder H<sub>2</sub>O resuspendiert.

### 2.31.3 Ethanolische Fällung von RNA

Um RNA aus einem *in vitro*-Transkriptionsansatz von 25μl zu fällen, gibt man 2,5μl LiCl und 70μl Ethanol (100%) hinzu. Nach einer Inkubationszeit von 30min bei -20°C wird die Lösung zentrifugiert (14.000U/min, 60min, 4°C). Anschließend wird das Ethanol abgezogen, 500μl Ethanol (70% in DEPC-H<sub>2</sub>O) zugegeben und nochmals zentrifugiert (14.000U/min, 10min, 4°C). Danach zieht man den Überstand ab, trocknet das Präzipitat in der Vakuumzentrifuge und resuspendiert es in 30μl DEPC-H<sub>2</sub>O.

## 2.32 Agarosegel-Elektrophorese

Die Agarosegel-Elektrophorese ermöglicht die Auftrennung von DNA in einem elektrischen Feld. Dabei wandern die negativ geladenen DNA-Moleküle zum Pluspol, wobei sich kleinere DNA-Moleküle schneller als große Moleküle durch das Gel bewegen. Die Länge der DNA-Stränge kann durch den Vergleich mit einem Größenmarker bestimmt werden. Eine Detektion der DNA-Fragmente erfolgt über die UV-Illumination von Ethidiumbromid, das zwischen die DNA-Stränge interkaliert. Um große Fragmente (über 7kb) zu trennen, wird ein Agarosegel mit niedriger Konzentration verwendet (0,5%). Kleinere Fragmente (0,1-2kb) werden durch höherprozentige Gele (2,0%) besser aufgetrennt. Als Standard wird ein 0,7 prozentiges Gel benutzt, mit dem Fragmente von 0,8 bis 12kb aufgetrennt werden können. Die Spannung beträgt üblicherweise 90V. Eine bessere Auftrennung erhält man aber, wenn man eine geringere Spannung wählt.

Zur Herstellung eines Gels wird die entsprechende Menge Agarose (w/v) in TAE (Tris-Acetat-EDTA)-Puffer gelöst und mehrmals in der Mikrowelle aufgekocht, bis sich die Agarose vollständig gelöst hat. Nach kurzem Abkühlen gibt man Ethidiumbromid (0,4ng/ml) hinzu und gießt die Lösung in eine vorbereitete Gelkammer. Nachdem das Gel polymerisiert ist (ca. 30min), wird es in eine Elektrophoresekammer überführt und mit TAE-Puffer überschichtet. Je nach Fassungsvermögen der Geltaschen werden DNA-Proben mit einem Volumen von 12µl bzw. 24µl angesetzt. Dazu gibt man „Loading Dye“ (6fach, MBI Fermentas) zur DNA-Lösung und füllt gegebenenfalls mit H<sub>2</sub>O auf. Anschließend werden die DNA-Proben in die Geltaschen pipettiert. Danach wird eine Spannung angelegt, wobei sich die Laufzeit nach der Höhe der Spannung richtet (bei 90V ca. 30 min).

### **2.33 Gelextraktion**

Restringierte DNA wird nach erfolgter Gel-Elektrophorese (s. 2.32) mit einem Skalpell aus dem Gel auf dem Transilluminator herausgeschnitten. Dabei sollte zügig gearbeitet werden, um eine Schädigung der DNA durch das UV-Licht zu vermeiden. Die Aufreinigung erfolgt mit dem „QiaQuick Gel Extraction Kit“ (Qiagen) nach den Angaben des Herstellers.

### **2.34 Ligation**

Bei einer Ligation sollte das Verhältnis von Insert zu Vektor etwa 3-5:1 betragen. Eine Ligation wird in einem Volumen von 20µl angesetzt und enthält neben der zu ligierenden DNA 2µl des 10fach Ligationspuffers (MBI Fermentas) und 1µl der T4-DNA-Ligase (MBI Fermentas). Die Menge an C4PLZ-Vektor beträgt in der Regel 100-200ng. Nach Zugabe der entsprechenden Menge des Inserts wird gegebenenfalls mit H<sub>2</sub>O aufgefüllt. Der Ligationsansatz wird 48h bei 12°C inkubiert. 2-4µl des Ligationsansatzes werden transformiert.

### 2.35 Transformation

Für die Transformation des C4PLZ-Vektors werden die elektrokompenten Zellen RR1 aus *E. coli* verwendet. Zunächst degradiert man eventuell noch vorhandene DNA in den Transformations-Küvetten, indem man die Küvetten 30min UV-Licht aussetzt und anschließend auf Eis abkühlt. Die elektrokompenten Zellen werden auf Eis aufgetaut. Man gibt 2µl oder 4µl des Ligationsansatzes zu 75µl RR1-Zellen und überführt die Zellen in eine Küvette. Ein kurzer Impuls von 2,5kV macht die Bakterienzellen für das Plasmid aufnahmefähig. Direkt nach der Elektroporation gibt man 250µl LB-Medium hinzu und inkubiert die Zellen 1h bei 37°C auf dem Schüttler. Diese Inkubationszeit ist notwendig, damit die Zellen die neu integrierten Resistenz-Gene exprimieren und auf dem Selektionsmedium wachsen können. Anschließend werden die Bakterien auf LB-Amp.-Platten ausplattiert und über Nacht bei 37°C wachsen gelassen.

## 3 Ergebnisse

Das embryonale ventrale Nervensystem von *Drosophila melanogaster* wird von neuronalen Stammzellen, den so genannten Neuroblasten (NB) generiert. Dabei bringt jeder NB einen Zellstammbaum hervor, in dem die jeweiligen Zelltypen in einer festgelegten Reihenfolge geboren werden (Bossing et al., 1996; Schmid et al., 1999; Schmidt et al., 1997). Die Reihenfolge wird durch die sequenzielle und transiente Expression von Transkriptionsfaktoren im NB festgelegt. Das jeweilige Set an exprimierten Transkriptionsfaktoren vererbt der NB bei der Teilung an die gerade geborene Ganglienmutterzelle (GMZ), die durch die Expression jener Transkriptionsfaktoren zeitlich spezifiziert wird (Brody und Odenwald, 2000; Isshiki et al., 2001; Novotny et al., 2002).

*hunchback (hb)* wird mit wenigen Ausnahmen (bspw. NB3-3) in den meisten NB bereits während der Delamination exprimiert und spezifiziert die früh geborenen Nachkommen von NB (Isshiki et al., 2001; Novotny et al., 2002). Nach dem Generieren früh geborener, durch Hb spezifizierter GMZ, ist es notwendig, dass die Expression von Hb im NB abgeschaltet wird. Andernfalls kann der NB nicht zur nächsten zeitlichen Identität übergehen (Isshiki et al., 2001; Novotny et al., 2002), die in der Regel von *Krüppel (Kr)* bestimmt wird (Isshiki et al., 2001). Während *hb* im NB abgeschaltet werden muss, wird die *hb*-Expression in der Schwesterzelle des NB, der GMZ, jedoch beibehalten. Wie ist es möglich, nur in einer der beiden Geschwisterzellen *hb* abzuschalten?

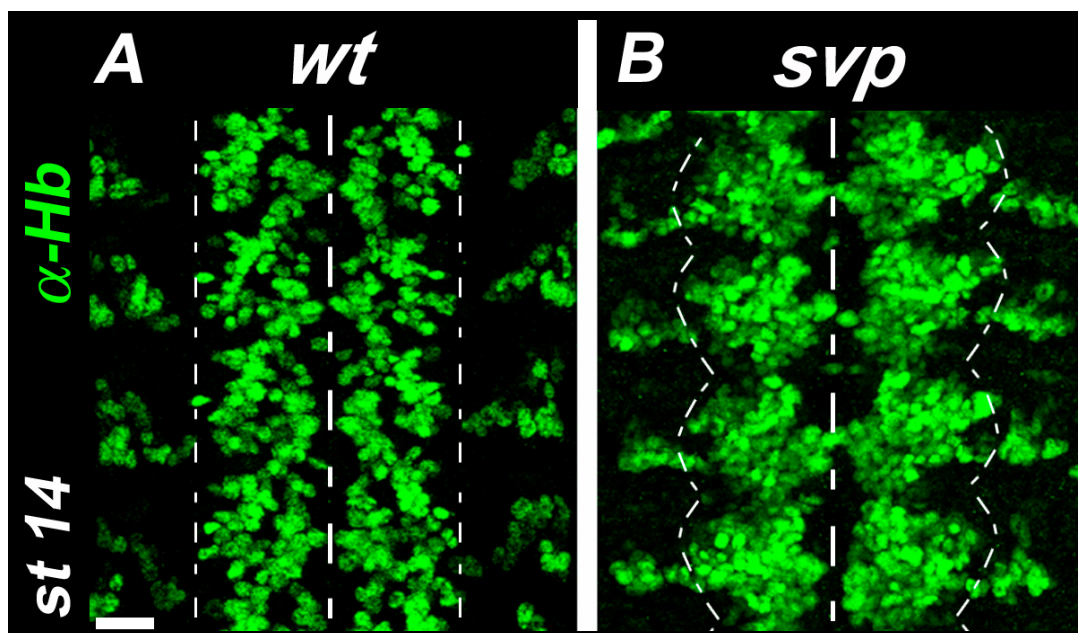
Ziel dieser Arbeit war, den Mechanismus der differentiellen Regulation von *hb* in NB und GMZ aufzuklären. Dazu musste herausgefunden werden, welche(r) Faktor(en) das Abschalten von *hb* im NB regulieren und weshalb dieser Mechanismus nicht in der GMZ greift.

### 3.1 Seven-up beendet die Hunchback-positive Phase in Neuroblasten

Im ventralen Nervensystem (VNS) von *seven-up (svp)*-mutanten Embryonen finden sich deutlich mehr Hb-positive Zellen als im Wildtyp (WT, vgl. Abb. 3.1 A und B). Daher könnte Svp ein Faktor sein, der für die Abschaltung von Hb im NB zuständig ist. Um diese Frage zu klären, ist es notwendig die Hb-Expression in *svp*-mutanten

Embryonen in definierten Zellstammbäumen zu verfolgen. Auf diese Weise kann festgestellt werden, ob ein Verlust von *Svp* tatsächlich zu einer verlängerten Hb-Expression führt, oder ob eine erhöhte Anzahl Hb-positiver Zellen in *svp*-Mutanten die Folge einer generellen Zellvermehrung ist.

Die Analysen wurden an den NB-Zellstammbäumen NB7-3, NB6-4T, NB7-1 sowie NB2-4T durchgeführt<sup>2</sup>. NB7-3 und 6-4T sind Zellstammbäume, die jeweils eine Hb-positive Tochterzelle generieren, NB7-1 und NB2-4T bringen dagegen zwei Hb-positive GMZ hervor. Für die Analysen wurde das Funktionsverlust-Allel *svp*<sup>e22</sup> verwendet.



**Abb. 3.1: Im Bauchmark von *seven-up*-mutanten Embryonen ist die Anzahl der Hunchback-positiven Zellen stark erhöht**

Dargestellt sind jeweils vier Segmente. Anterior ist oben. Dünn gestrichelte Linien umranden das Bauchmark, dick gestrichelte Linien repräsentieren die Mittellinie. Balken: 20  $\mu$ m.

**A:** Hb-Expression im Bauchmark eines wildtypischen Embryos im Stadium (st) 14.

**B:** Hb-Expression im Bauchmark eines *svp*-mutanten Embryos im Stadium 14. Im Vergleich zum WT (A) zeigt sich eine stark erhöhte Anzahl von Hb-positiven Zellen.

<sup>2</sup> Die Zellstammbäume des NB6-4 und NB2-4 haben tagmaspezifische Unterschiede. Ein T zeigt an, dass hier der thorakale NB gemeint ist.

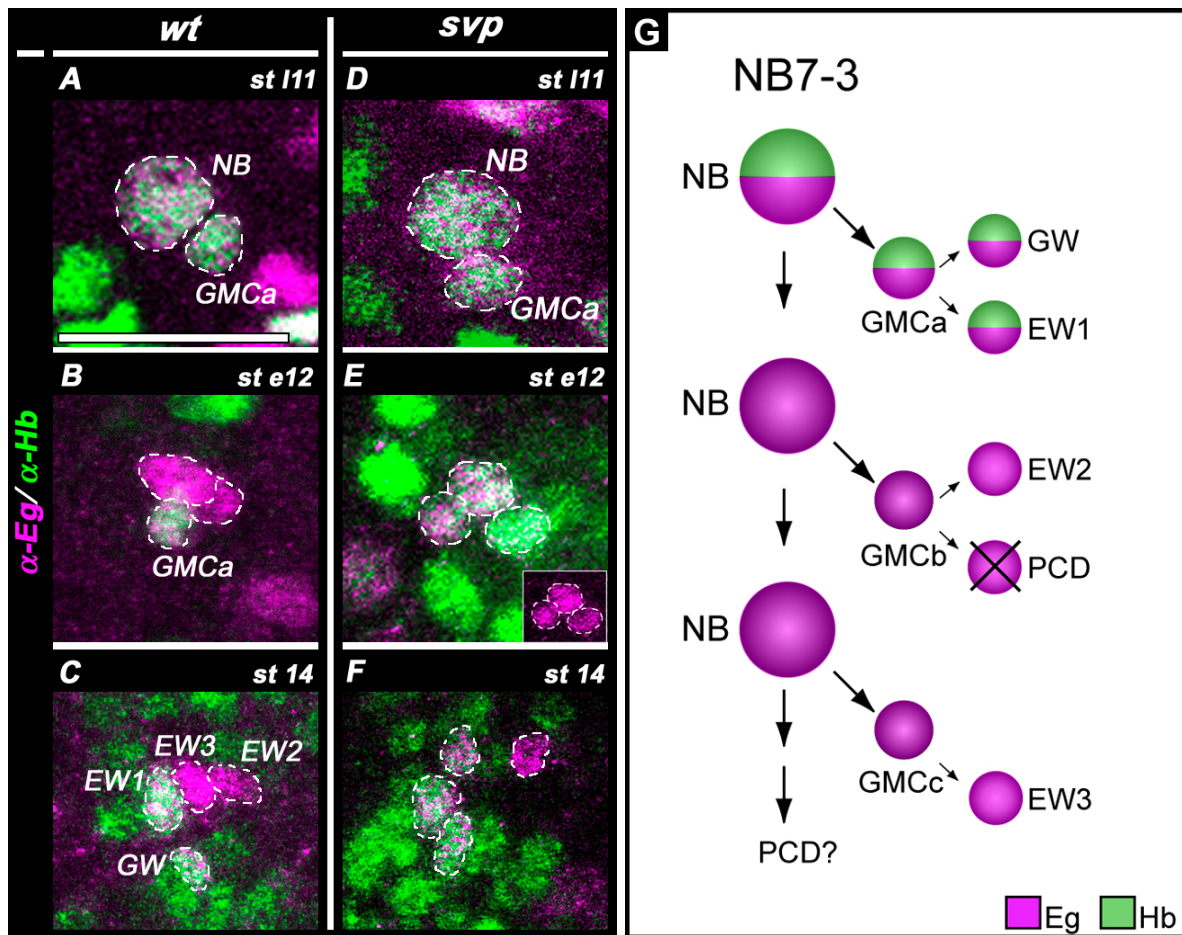
### 3.1.1 Bei Verlust der Seven-up-Funktion wird Hunchback im NB7-3 nicht rechtzeitig abgeschaltet

Der NB7-3 generiert drei GMZ, aus denen das Motorneuron GW und die Interneurone EW1, EW2 und EW3 hervorgehen (Nomenklatur nach Higashijima et al., 1996). GW und EW1 sind die Nachkommen der ersten GMZ (GMZ7-3a) und exprimieren Hb. Aus der zweiten GMZ (GMZ7-3b) gehen EW2 und ein zweites Neuron hervor, welches unmittelbar abstirbt (Isshiki et al., 2001; Novotny et al., 2002). Die dritte GMZ (GMZ7-3c) teilt sich nicht, sondern differenziert direkt zu EW3 (Karcavich und Doe, 2005; Abb. 3.2 G).

Alle Zellen des Zellstammbaums NB7-3 lassen sich durch die Expression des Markers Eagle (Eg) identifizieren (Higashijima et al., 1996). So kann mittels einer  $\alpha$ -Hb/ $\alpha$ -Eg-Doppelantikörperfärbung<sup>3</sup> in verschiedenen Entwicklungsstadien die Dynamik der Hb-Expression im Zellstammbaum NB7-3 analysiert werden. Bereits zum Zeitpunkt der Delamination exprimiert der NB7-3 Hb. Mit der ersten Teilung generiert der NB7-3 die Hb-positive GMZ7-3a. Zu diesem Zeitpunkt ist der NB ebenfalls noch Hb-positiv (Abb. 3.2 A). Vor der nächsten Teilung wird *hb* im NB abgeschaltet. Im so genannten Dreizell-Stadium, in dem der Zellstammbaum aus dem NB sowie GMZ7-3a und GMZ7-3b besteht, ist demnach die GMZ7-3a die einzige Hb-positive Zelle (Abb. 3.2 B). Im Stadium (St) 14 ist die Entwicklung des Zellstammbaums NB7-3 abgeschlossen. GW und EW1, die Nachkommen von GMZ7-3a exprimieren Hb, während EW2 und EW3, die Nachkommen von GMZ7-3b und GMZ7-3c, Hb-negativ sind (Abb. 3.2 C). In *svp*-mutanten Embryonen generiert der NB7-3 zunächst ebenfalls eine Hb-positive GMZ (Abb. 3.2 D). Im Gegensatz zum WT wird *hb* aber nicht nach der ersten Teilung des NB abgeschaltet (Abb. 3.2 E). Dies führt zu einer erhöhten Anzahl Hb-positiver Zellen im Stadium 14 (Abb. 3.2 F). In 75% der Hemisegmente können drei oder vier Hb-positive Zellen detektiert werden (n=103 Hemisegmente). Eine Vermehrung Hb-negativer Zellen kann nicht festgestellt werden.

---

<sup>3</sup> Im Zusammenhang mit Antikörperfärbungen steht  $\alpha$  für anti. Dies bedeutet, dass der Antikörper das angeführte Protein spezifisch erkennt und bindet.



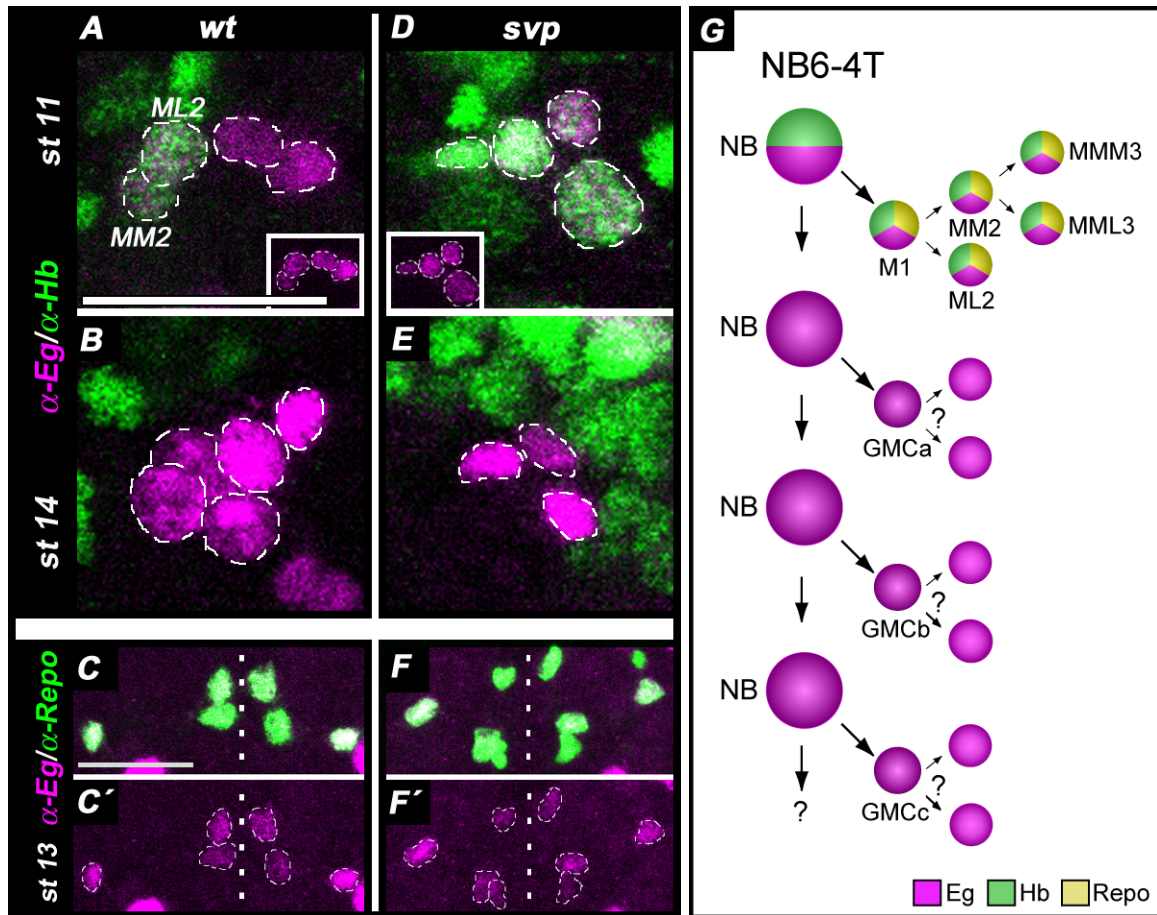
**Abb. 3.2: In seven-up-Mutanten wird *hunchback* im NB7-3 verspätet abgeschaltet**  
 Antikörperfärbung gegen Hb (grün) und den NB7-3-Zellstammbaummarker Eagle (Eg, magenta). Dargestellt sind jeweils die Zellen des Zellstammbaums NB7-3 eines Hemisegments (weiß umrandete Zellen). Anterior ist oben, die Mittellinie befindet sich links. Balken: 20µm.  
**A-C:** Hb-Expression im WT. A: NB7-3 nach der ersten Teilung. Der NB und die GMZ7-3a exprimieren Hb. B: NB7-3 nach der zweiten Teilung. GMZ7-3a exprimiert Hb, während der NB und die GMZ7-3b Hb-negativ sind. C: Zellstammbaum NB7-3 im Stadium 14: GW und EW1, die Nachkommen von GMZ7-3a sind Hb-positiv; EW2 und EW3, die Nachkommen von GMZ7-3b und GMZ7-3c exprimieren kein Hb. **D-F:** Hb-Expression in *pros*-Mutanten. D: NB7-3 in *svp*-mutanten Embryo nach der ersten Teilung. Der NB und GMZ7-3a exprimieren Hb. E: Nach der zweiten Teilung hat der NB Hb noch nicht abgeschaltet. Alle Zellen sind Hb-positiv. Inset zeigt α-Eg-Antikörperfärbung alleine. F: Im Stadium 14 findet sich eine erhöhte Anzahl Hb-positiver Zellen. Drei von vier Neuronen sind Hb-positiv. **G:** Schematische Darstellung des Zellstammbaums NB7-3.

### 3.1.2 Im Zellstammbaum NB6-4T führt der Funktionsverlust von Seven-up zu einer Reduktion von Neuronen, einhergehend mit einer erhöhten Anzahl von Gliazellen.

Der thorakale NB6-4T generiert, ebenso wie der NB7-3, nur eine Hb-positive Tochterzelle (Isshiki et al., 2001). Es handelt sich bei dieser Zelle um die gliale Vorläuferzelle M1, die drei Cell body-Gliazellen hervorbringt (Akiyama-Oda et al., 1999). Nach der ersten Teilung wird Hb im NB6-4T abgeschaltet. Aus dem

neuronalen Teil des Zellstammbaums NB6-4T gehen fünf bis sechs Neurone hervor (Schmidt et al., 1997), die lateral der Cell body-Gliazellen in einem Cluster lokalisiert sind. Bislang ist jedoch nicht geklärt, aus wie vielen GMZ diese Neurone entstehen. Alle Zellen des Zellstammbaums NB6-4T sind durch die Expression von Eg identifizierbar (Higashijima et al., 1996), allerdings wird die Expression von Eg in den glialen Zellen fortwährend schwächer. Im Stadium 14 ist sie in diesen Zellen in der Regel kaum noch zu detektieren.

Im Stadium 11 besteht der wildtypische Zellstammbaum NB6-4T aus vier Zellen. Zwei davon sind Hb-negativ. Bei diesen beiden Zellen handelt sich um den NB und die GMZ6-4Ta. Die beiden Hb-positiven Zellen sind ML2 und MM2, die Tochterzellen von M1. (Abb. 3-3 A, Nomenklatur nach Akiyama-Oda et al., 1999). Im *svp*-mutanten Zellstammbaum NB6-4T exprimieren im Vierzell-Stadium (in diesem Stadium besteht der Zellstammbaum aus vier Zellen) alle Zellen Hb (Abb. 3.3 D). Offensichtlich wird *hb* nicht nach der ersten Teilung im NB abgeschaltet. Weiterhin lässt sich eine Reduktion des neuronalen Anteils des Zellstammbaums NB6-4T feststellen. Im Stadium 14 findet man durchschnittlich 2,94 Zellen (n= 43 Hemisegmente) statt der üblichen fünf im WT ( $\bar{\varnothing}$  4,93 Zellen/Hemisegment, n= 30 Hemisegmente, vgl. Abb. 3.3 B mit Abb. 3.3 E). Die Anzahl der Gliazellen ist dagegen erhöht (vgl. Abb. 3.3 C mit Abb. 3.3 F). In drei Viertel der thorakalen Hemisegmente im WT finden sich drei Cell body-Gliazellen, während ein Viertel der Hemisegmente vier Cell body-Gliazellen aufweist (n=43 Hemisegmente). In *svp*-mutanten Embryonen können in mehr als der Hälfte der thorakalen Hemisegmente vier Cell body-Gliazellen detektiert werden (n= 34 Hemisegmente).



**Abb. 3.3: In *seven-up*-Mutanten wird *hunchback* im NB6-4T verspätet abgeschaltet**

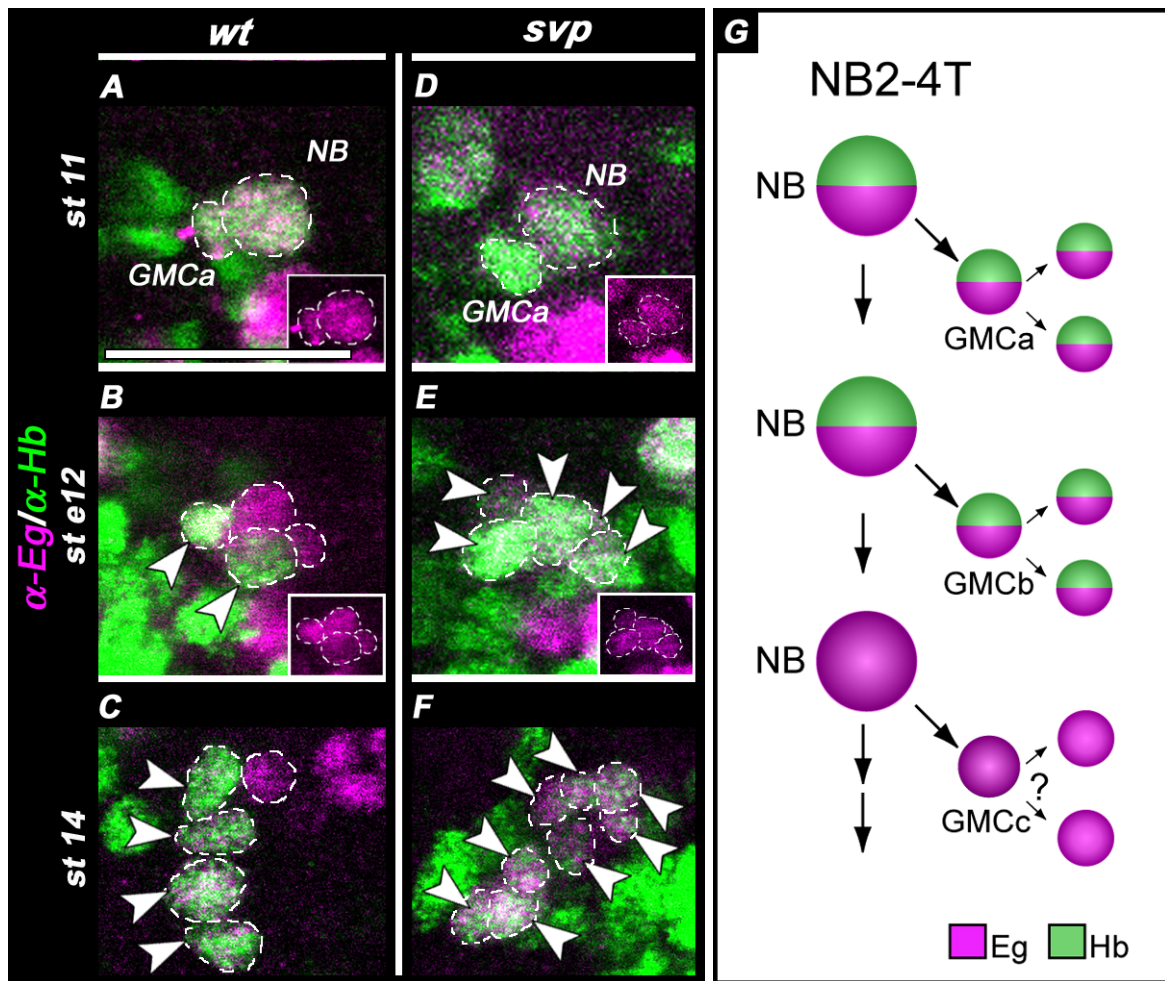
Antikörperfärbung gegen NB6-4T-Zellstammbaummarker Eg (magenta) und Hb (grün, A, B, D und E) bzw. gegen Eg (magenta) und den glialen Marker Reverse polarity (Repo (Xiong et al., 1994) grün, C und F). In A, B, D, und E sind die Zellen des Zellstammbaums NB6-4T in jeweils einem Hemisegment dargestellt (weiß umrandete Zellen), die Mittellinie befindet sich links. In C, C', F und F' sind die Gliazellen des Zellstammbaums NB6-4T in jeweils einem Segment gezeigt, die gerade gestrichelte Linie repräsentiert die Mittellinie. Anterior ist oben. Balken: 20µm.

**A-C'**: WT. A: Zellstammbaum NB6-4T im Stadium 11. Die gliale Vorläuferzelle M1 hat sich bereits einmal geteilt und die beiden Hb-positiven Zellen ML2 und MM2 hervorgebracht. Der NB hat zu diesem Zeitpunkt GMZ6-4Ta generiert. B: Der neuronale Anteil des Zellstammbaums NB6-4T besteht in Stadium 14 aus fünf Zellen. C, C': Gliazellen des Zellstammbaums NB6-4T im Stadium 13. Zwei Gliazellen befinden sich nahe der Mittellinie (MMM3 und MML3), eine Zelle ist weiter lateral lokalisiert (ML2). **D-F'**: *svp*-Mutanten D: Nach der ersten Teilung hat der NB6-4T *hb* nicht abgeschaltet. Alle vier Zellen sind Hb-positiv. E: Der neuronale Anteil des Zellstammbaums NB6-T ist reduziert. F, F': Häufig finden sich vier statt drei Gliazellen in *svp*-mutanten Zellstammbaum NB6-4T. **G**: Schematische Darstellung des Zellstammbaums NB6-4T.

### **3.1.3 In *seven-up*-Mutanten ist die Anzahl der Hunchback-positiven Neurone im Zellstammbaum NB2-4T erhöht**

Die Zellen des thorakalen Zellstammbaums NB2-4T lassen sich ebenfalls durch *Eg* identifizieren (Higashijima et al., 1996; Abb. 3.4 G). Die ersten beiden GMZ des Zellstammbaums NB2-4T exprimieren *Hb* (Abb. 3.4 B). Nachdem der NB GMZ2-4Tb generiert hat, schaltet er *hb* ab und produziert mindestens noch eine weitere *Hb*-negative GMZ (Abb. 3.4 B). Aus GMZ2-4Ta und GMZ2-4Tb gehen vier *Hb*-positive Neurone hervor (Abb. 3.4 C). Unmittelbar antero-lateral angrenzend an diese *Hb*-positiven Neurone finden sich ein bis zwei *Hb*-negative Neurone, die vermutlich die Nachkommen der *Hb*-negativen GMZ2-4Tc sind (Abb. 3.4 C).

In *svp*-mutanten Embryonen behält der NB auch nach der zweiten Teilung die *Hb*-Expression bei. Abb. 3.4 E zeigt den Zellstammbaum NB2-4T in einem *svp*-mutanten Embryo im frühen Stadium 12. Hier finden sich fünf *Hb*-positive Zellen. Vermutlich handelt es sich um die Nachkommen der ersten GMZ, sowie den NB, die GMZ2-4Tb und die GMZ2-4Tc. Daraus resultiert eine erhöhte Anzahl *Hb*-positiver Neurone im Stadium 14 (Abb. 3.3 F). Durchschnittlich findet man 5,37 *Hb*-exprimierende Zellen ( $n=35$  Hemisegmente), statt vier im WT. Es kann nicht festgestellt werden, ob eine Vermehrung *Hb*-negativer Zellen des Zellstammbaums NB2-4T vorliegt, da die *Eg*-positiven/*Hb*-negativen Zellen in der Umgebung nicht eindeutig bestimmten Zellstammbäumen zugeordnet werden können.



**Abb. 3.4: In *seven-up*-Mutanten ist die Anzahl Hunchback-positiver Zellen im Zellstammbaum NB2-4T erhöht**

Antikörperfärbung gegen den NB2-4T-Zellstammbaummarker Eg (magenta) und Hb (grün). Insets zeigen die  $\alpha$ -Eg-Antikörperfärbung alleine. Dargestellt sind jeweils die Zellen des Zellstammbaums NB2-4T in einem Hemisegment (weiß umrandete Zellen). Anterior ist oben, die Mittellinie befindet sich links. Balken: 20 $\mu$ m.

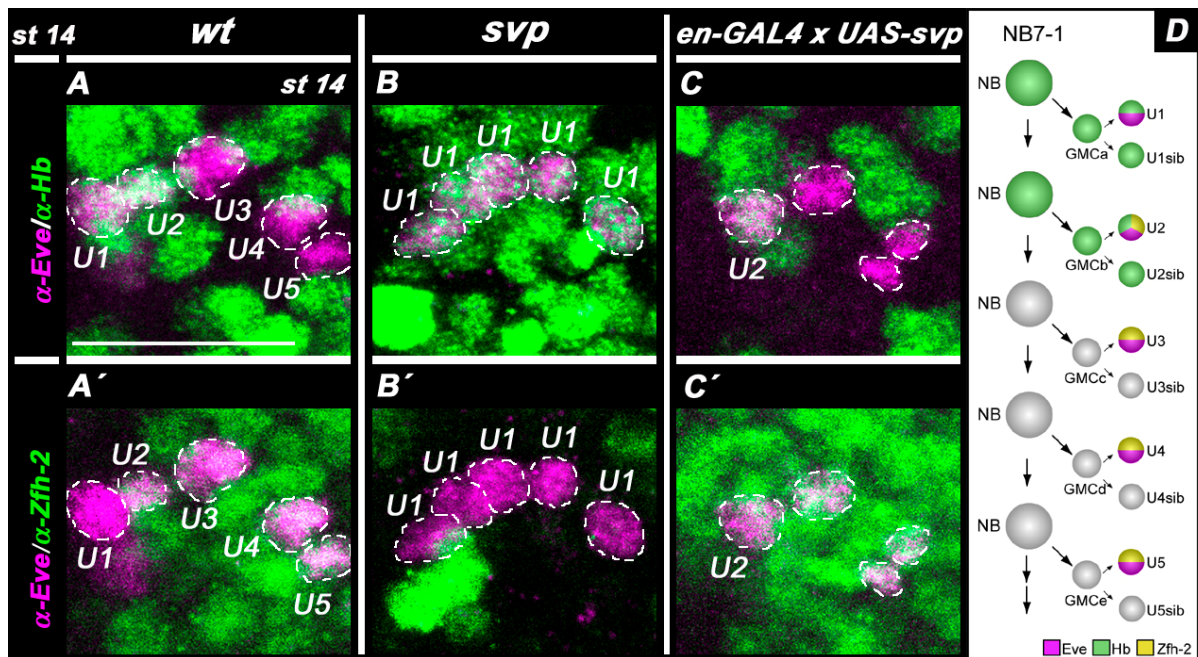
**A-C:** Hb-Expression im WT. **A:** NB2-4T nach der ersten Teilung, der NB und die GMZ2-4Ta sind Hb-positiv. **B:** Zellstammbaum NB2-4T im frühen Stadium 12. Der NB hat zwei Hb-positiv GMZ (Pfeile) und eine Hb-negative GMZ generiert. **C:** Zellstammbaum NB2-4T im Stadium 14: Die Nachkommen von GMZ2-4Ta und GMZ2-4Tb sind Hb-positiv (Pfeile), zudem ist ein Hb-negatives Neuron zu sehen, das vermutlich Nachkomme der GMZ2-4Tc ist. **D-F:** Hb-Expression in *svp*-Mutanten. **D:** Nach der ersten Teilung des NB2-4T sind beide Zellen Hb-positiv. **E:** In *svp*-Mutanten schaltet der NB2-4T Hb nach der zweiten Teilung nicht ab. Im frühen Stadium 12 sind alle Zellen Hb-positiv. **F:** Im Stadium 14 findet man bis zu acht Hb-positiv Zellen im Zellstammbaum NB2-4T. **G:** Schematische Darstellung des Zellstammbaums NB2-4T.

### **3.1.4 In *seven-up*-Mutanten werden im Zellstammbaum NB7-1 hauptsächlich Zellen generiert, die das Genexpressionsmuster der Nachkommen von GMZ7-1a aufweisen**

Die ersten fünf GMZ des NB7-1 bringen jeweils ein U-Neuron und ein Usib-Neuron hervor. Die U-Neurone werden nach der Reihenfolge ihrer Entstehung U1 bis U5 genannt und sind durch die Expression von *Even-skipped* (*Eve*) identifizierbar (Pearson und Doe, 2003; Abb. 3.5 D). U1 und U2, Nachkommen der GMZ7-1a und GMZ7-1b, exprimieren *Hb* (Abb. 3.5 A). U2 exprimiert im Gegensatz zu U1 *Zfh-2*, was die Unterscheidung dieser beiden Zellen ermöglicht. *Zfh-2* wird ebenfalls in U3, U4 und U5 exprimiert (Pearson und Doe, 2003; Abb. 3.5 A').

In *svp*-mutanten Embryonen variiert die Zahl der U-Neurone zwischen fünf und elf. Durchschnittlich gibt es 6,11 U-Neurone (n=68 Hemisegmente). Die meisten U-Neurone sind *Hb*-positiv und *Zfh-2*-negativ (Abb. 3.5 B, B',  $\bar{\phi}$  4,82 Zellen/Hemisegment), weisen also U1-Charakteristika auf. Etwa eine Zelle pro Hemisegment (0,89) ist *Hb/Zfh-2*-doppelpositiv und zeigt somit ein Expressionsmuster, welches typisch für ein U2-Neuron ist. Lediglich 0,39 Neurone pro Hemisegment sind *Hb*-negativ und *Zfh-2*-positiv, haben also Charakteristika der spät geborenen U-Neurone U3, U4 und U5.

Wird die längste Isoform von *Svp* (*Svp1*) via *en-GAL4* (Tabata et al., 1995) im NB7-1 überexprimiert, so finden sich vorwiegend vier statt fünf U-Neurone. In 76% der Hemisegmente ist nur eines dieser U-Neurone *Hb*-positiv und weist zudem Expression von *Zfh-2* auf (Abb. 3.5 C, C', n=143 Hemisegmente). Es handelt sich also um ein U2-Neuron. Demnach führt das Fehlen der *Svp*-Funktion zu einer Überproduktion von U1-Neuronen auf Kosten von Zellen mit „spätem“ Schicksal, wohingegen eine Überexpression von *Svp* das Fehlen von U1 zur Folge hat.



**Abb. 3.5:** Das Fehlen von Seven-up hat eine Vermehrung von U1 zur Folge, eine Überexpression von Seven-up führt zum Verlust von U1.

Antikörperfärbung gegen den U-Neuronen-Marker Eve (magenta) und Hb (grün, A, B, C), bzw. Zfh-2 (grün, A', B', C') im Stadium 14. Dargestellt sind jeweils die U-Neurone eines Hemisegments (weiß umrandete Zellen). Anterior ist oben, die Mittellinie befindet sich links. Balken 20µm.

**A:** Im WT exprimieren U1 und U2, die Nachkommen der GMZ7-1a und GMZ7-1b, Hb. U3, U4 und U5, die Nachkommen der GMZ7-1c, GMZ7-1d und GMZ7-1e sind hingegen Hb-negativ. **A':** Mit Ausnahme von U1 exprimieren alle U-Neurone Zfh-2. **B:** In *svp*-mutanten Embryonen sind die meisten U-Neurone Hb-positiv und Zfh-2 negativ (**B'**), weisen also ein Expressionsmuster auf, das typisch für U1 ist. **C, C':** Eine Überexpression von Svp1 im NB7-1 führt zum Verlust des U1-Neurons. **D:** Schematische Darstellung der ersten fünf Teilungen des NB7-1.

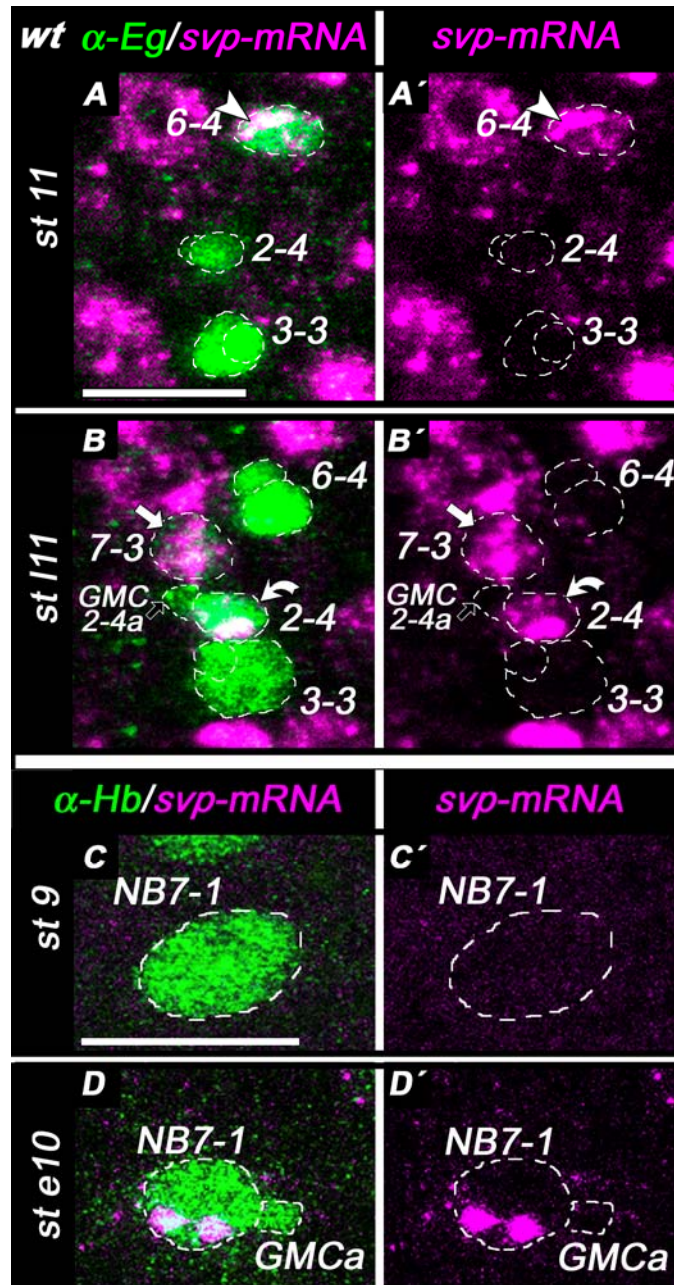
### 3.2 Regulation der Seven-up-Expression

Ein Verlust der Svp-Funktion führt zu einem verspäteten Abschalten von *hb* im NB. Dementsprechend kann in allen untersuchten Zellstammbäumen eine erhöhte Anzahl Hb-positiver Zellen detektiert werden, die oft einhergeht mit der Reduktion von Zellen mit „spätem“ Schicksal.

Offensichtlich ist die Svp-Aktivität für eine zeitlich koordinierte Expression von Hb erforderlich. Dies kann entweder durch den Zeitpunkt der Svp-Expression reguliert sein oder eine posttranslationale Modifikation von Svp ist notwendig, um Hb abzuschalten. Um ersteres zu testen, wurde das Expressionsmuster von Svp in den Zellstammbäumen NB7-3, NB6-4T, NB2-4T und NB7-1 analysiert.

### **3.2.1 *seven-up*-mRNA wird unmittelbar vor der Teilung exprimiert, nach der *hunchback* im Neuroblasten abgeschaltet wird**

Bei der Analyse der *svp*-mRNA-Expression im WT kann folgende Aussage getroffen werden: alle untersuchten NB beginnen mit der Transkription unmittelbar bevor die Teilung erfolgt, nach der *hb* im NB abgeschaltet wird. So exprimieren der NB6-4T und NB7-3, die jeweils eine Hb-positive Tochterzelle hervorbringen, *svp* schon vor der ersten Teilung (Abb. 3.6 A, A' und B, B'). Im NB6-4T ist die *svp*-Expression nur transient, da die Transkription nach der ersten Teilung eingestellt wird (Abb. 3.6 B, B'). In den Neuroblasten NB2-4T und NB7-1, die *hb* nach der zweiten Zellteilung abschalten, kann das *svp*-Transkript kurz vor der zweiten Teilung detektiert werden. In GMZ2-4Ta und GMZ7-1a wird *svp* nicht exprimiert (Abb.3.6 B, B' und Abb. 3.6 D, D').



**Abb. 3.6: seven-up-mRNA-Expression in NB6-4T, NB7-3, NB2-4T und NB7-1**

*In situ*-Hybridisierung gegen *svp* (magenta) kombiniert mit einer Antikörperfärbung gegen Eg (grün, A, B) und Hb (grün, C, D) an wildtypischen Embryonen. Die NB und deren GMZ sind umrandet. Anterior ist oben, die Mittellinie befindet sich links. Balken: 20µm.

**A, B:** *svp*-Expression in NB7-3, NB2-4T und NB6-4T. Der NB6-4T exprimiert vor der ersten Teilung *svp*-mRNA (Pfeilspitze in A), nach der Mitose stoppt die Expression (B'). NB2-4T beginnt kurz vor der zweiten Teilung *svp* zu exprimieren (gebogener Pfeil in B, B'). *svp* wird nicht in der ersten GMZ des NB2-4T exprimiert (schwarzer Pfeil in B, B'). NB7-3 exprimiert *svp* schon vor der ersten Teilung (Pfeil in B, B'). **C, D:** *svp*-Expression im NB7-1. Der NB7-1 beginnt *svp* kurz vor der zweiten Teilung zu exprimieren (D, D'). *svp*-mRNA ist weder vor der ersten Teilung im NB zu detektieren (C, C'), noch zeigt die GMZ7-1a *svp*-Expression (D, D').

### 3.2.2 Seven-up-Protein wird sowohl im Neuroblasten als auch der letztgeborenen Hunchback-positiven Ganglienmutterzelle eines Zellstammbaums exprimiert

Seit kurzem ist ein Antikörper gegen Svp vorhanden (Kanai et al., 2005). Daher war es möglich, die Svp-Protein-Expression mit der *svp*-mRNA-Expression zu vergleichen.

Die Expression des Svp-Proteins in den Zellstammbäumen des NB6-4T, NB7-3 und NB2-4T ist sehr dynamisch. In NB6-4T kann Svp nach der ersten Teilung sowohl im NB als auch in der Gliavorläuferzelle M1 detektiert werden (Abb. 3.7 A, A'). Ähnlich wie das *svp*-Transkript, ist auch das Svp-Protein nur transient im NB6-4T und dessen Nachkommenzellen vorhanden. Bereits im späten Stadium 11 ist Svp nicht mehr im Zellstammbaum NB6-4T detektierbar (Abb. 3.7 B, B').

Im NB7-3 wird Svp-Protein bereits vor der ersten Teilung exprimiert. Diese Expression ist jedoch sehr schwach (Abb. 3.7 A, A'). Nach dieser Teilung sind sowohl der NB als auch die GMZ7-3a Svp-positiv (Abb. 3.7 B, B'). Nachdem sich der NB7-3 zum zweiten Mal geteilt hat, findet sich Svp sowohl in der GMZ7-3a, als auch in der GMZ7-3b. Die Svp-Expression im NB ist zu diesem Zeitpunkt bereits schwach, wohingegen die GMZ7-3a in der Regel die stärkste Expression von Svp zeigt (Abb. 3.7 C, C'). Die Hb-positiven Nachkommenzellen der GMZ7-3a sind im Stadium 14 Svp-negativ. Jedoch zeigt das EW1-Neuron des Zellstammbaums NB7-3 Svp-Expression (Abb. 3.7 D, D' und Abb. 3.17 A', B').

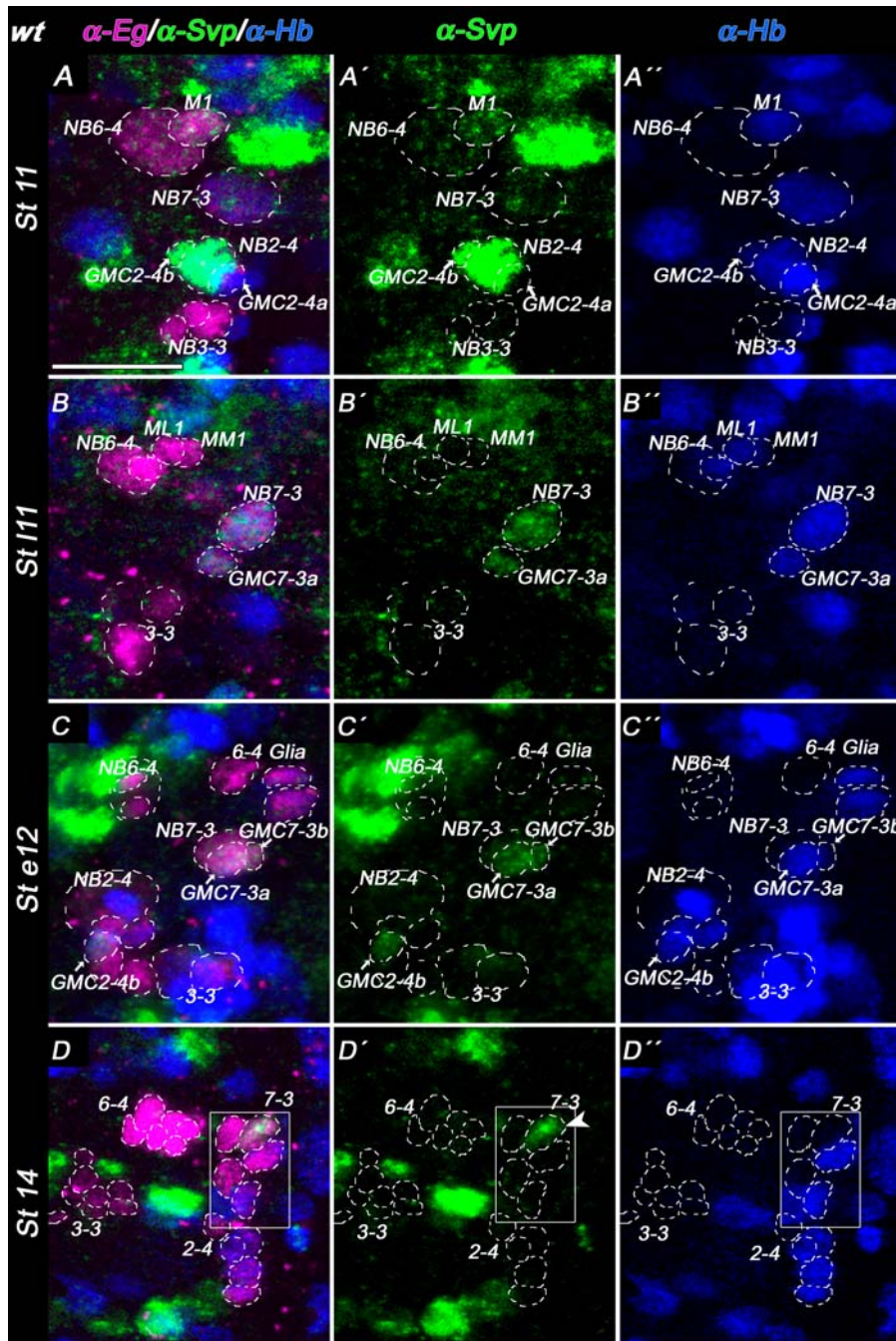
Die GMZ2-4Ta ist erwartungsgemäß Svp-negativ. Nach der zweiten Teilung des NB2-4T exprimieren die GMZ2-4Tb und der NB Svp (Abb. 3.7 A'). Vor der dritten Teilung ist kein Svp mehr im NB2-4T zu detektieren, wohingegen die GMZ2-4Tb immer noch Svp-positiv ist (Abb. 3.7 C, C'). Im Stadium 14 kann in keiner der Zellen des Zellstammbaums NB2-4T Svp nachgewiesen werden (Abb. 3.7 D, D').

Im NB7-1 wurde die Svp Expression nicht untersucht. Grund dafür ist, dass die Antikörper gegen den NB7-1-Marker Engrailed (En) und gegen Svp beide aus Maus stammen. Daher war eine Doppelantikörperfärbung nicht möglich.

Vergleicht man die Daten aus der Analyse der Svp-Protein-Expression mit denen der *svp*-mRNA-Expression, so scheint es, dass die Translation von Svp deutlich verzögert einsetzt. Trotz der *svp*-Transkription findet sich kaum Svp-Protein in den NB bevor die Teilung erfolgt, die das Abschalten von *hb* im NB zur Folge hat (Abb. 3.7 A, A', Daten für NB6-4T und NB2-4T nicht gezeigt). Nach dieser Teilung sind sowohl der NB als auch die gerade geborene GMZ Svp-positiv. Während im NB die

Svp-Expression zur Abschaltung von *hb* führt, bleibt in den letztgeborenen Hb- und Svp-positiven GMZ die Hb-Expression jedoch erhalten.

Aus den Beobachtungen ergeben sich zwei Fragen. Erstens: wenn Svp in NB die *hb*-Expression beendet, warum wird Hb dann nicht auch in Svp-positiven GMZ abgeschaltet? Zweitens: ist die Translation von Svp tatsächlich von der Mitose abhängig? In den folgenden Kapiteln sollen diese Fragen beantwortet werden.



**Abb. 3.7: Seven-up-Expression in den Zellstambäumen NB6-4T, NB7-3 und NB2-4T**

Antikörperfärbung gegen den NB6-4T-, NB7-3- und NB2-4T-Zellstambaummarker Eg (magenta), Svp (grün) und Hb (blau) an wildtypischen Embryonen. Anterior ist oben, die Mittellinie befindet sich rechts. Balken: 20 µm.

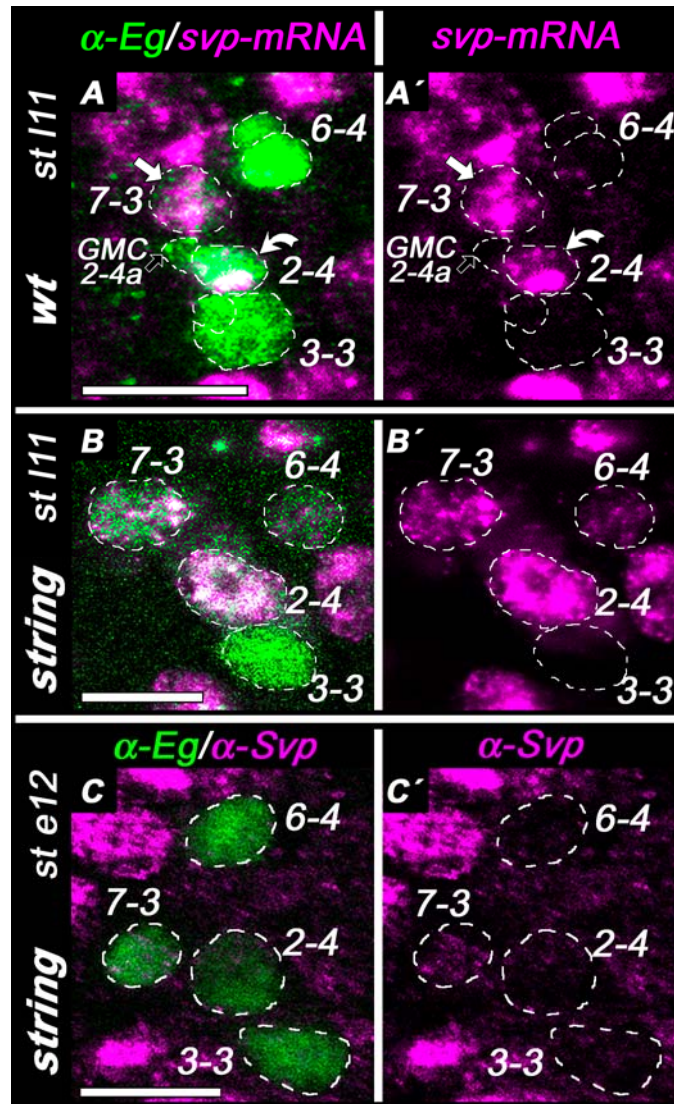
**A, A', A'':** Stadium 11: der NB6-4T hat sich bereits einmal geteilt, beide Zellen sind Svp-positiv. Der NB7-3 exprimiert vor der ersten Teilung nur wenig Svp. Im Zellstambaum NB2-4T findet sich Svp im NB und der GMZ2-4Tb, die GMZ2-4Ta ist Svp-negativ. **B, B', B'':** Spätes Stadium 11: alle Zellen des Zellstambaums NB6-4T sind Svp-negativ. Der NB7-3 hat sich einmal geteilt. Beide Zellen sind Svp-positiv. **C, C', C'':** Frühes Stadium 12: Nach der zweiten Teilung findet sich nur noch wenig Svp-Protein im NB7-3. Die beiden GMZ des NB7-3 sind Svp-positiv. Die stärkste Expression von Svp weist die GMZ7-3a auf. Nach der zweiten Teilung ist der NB2-4T Svp-negativ. GMZ2-4Tb ist jedoch noch Svp-positiv. **D, D', D'':** Stadium 14. Svp wird weder im Zellstambaum NB2-4T noch in den Neuronen des Zellstambaums NB6-4T exprimiert. Eine Zelle des Zellstambaums NB7-3 weist Svp-Expression auf. Bei dieser Zelle handelt es sich um EW2. In thorakalen Segmenten besteht der NB7-3 aus fünf Zellen, da hier die Geschwisterzelle von EW2 nicht abstirbt. Das weiß umrandete Inset ist aus einer anderen fokalen Ebene hinzugefügt worden.

### 3.2.3 Seven-up-Expression in G2-arretierten Neuroblasten

Vor der Mitose, nach der *hb* im NB abgeschaltet wird, liegen große Mengen an *svp*-Transkript vor. Es findet jedoch nur sehr wenig Translation statt. Unmittelbar nach der Mitose kann man das Svp-Protein in den beiden Tochterzellen detektieren. Die Annahme, dass eine Verstärkung der *svp*-Translation Mitose-abhängig ist, liegt daher nahe.

Die Abschaltung von *hb* bedarf einer vorhergehenden Mitose (Grosskortenhaus et al., 2005; Isshiki et al., 2001). In Mutanten, in denen die Mitose inhibiert wird, wie bspw. bei *string*-Mutanten wird *hb* nicht abgeschaltet. String (Stg) ist das Homolog der Phosphatase Cdc25, welche die Transition von der G2- zur M2-Phase in Gang setzt (Edgar und O'Farrell, 1989). In solchen Embryonen ist die erste Mitose der NB inhibiert (Cui und Doe, 1995). Die meisten NB exprimieren in Zellzyklus-arretierten *string*-Mutanten Hb, und das zu einer Zeit, in der im WT die Hb-positive Phase längst abgeschlossen ist (Isshiki et al., 2001). Eine mögliche Erklärung für diesen Phänotyp wäre, dass Svp in *string*-Mutanten nicht translatiert wird und daher die *hb*-Transkription nicht beenden kann.

In *string*-mutanten Embryonen beginnt die *svp*-mRNA-Expression zur gleichen Zeit wie im WT (vgl. Abb. 3.8 A, A' mit B, B'). So findet sich im späten Stadium 11 *svp*-Transkript in den Neuroblasten NB7-3, NB6-4T und NB2-4T (Abb. 3.8 B, B'). Das ist im Fall des NB2-4T ungewöhnlich, denn dieser exprimiert im WT erst nach der ersten Teilung *svp* (vgl. Abb. 3.8 A, A' mit B, B'). Im NB6-4T ist nur wenig Transkript zu detektieren. Die Ursache dafür ist, dass der NB die Expression schon eingestellt hat, wie es auch im WT in diesem Stadium der Fall ist (vgl. Abb. 3.8 A, A' mit B, B'). Betrachtet man hingegen die Svp-Protein Expression im frühen Stadium 12, lässt sich feststellen, dass in den untersuchten NB kaum Protein vorliegt. Lediglich der NB7-3 zeigt eine schwache Svp-Expression (Abb. 3.8 C, C'). Zu diesem Zeitpunkt wird im WT Svp-Protein in höheren Konzentration in den beiden GMZ des NB7-3 und der GMZ2-4Tb exprimiert (vgl. Abb. 3.8 C, C' mit Abb. 3.7 C, C'). Demnach ist die Effizienz der Svp-Translation in *string*-Mutanten stark herabgesetzt.



**Abb. 3.8:** In *string*-Mutanten wird *svp* in NB6-4T, NB7-3 und NB7-1 transkribiert, aber kaum translatiert.

Antikörperfärbung gegen Eg (grün) kombiniert mit einer *in situ*-Hybridisierung gegen *svp* (magenta, A-B'), bzw. einer Antikörperfärbung gegen Svp (magenta, C, C'). Die Eg-positiven NB und deren GMZ sind mit gestrichelten Linien umrandet. Anterior ist oben, die Mittellinie befindet sich links. Balken: 20µm.

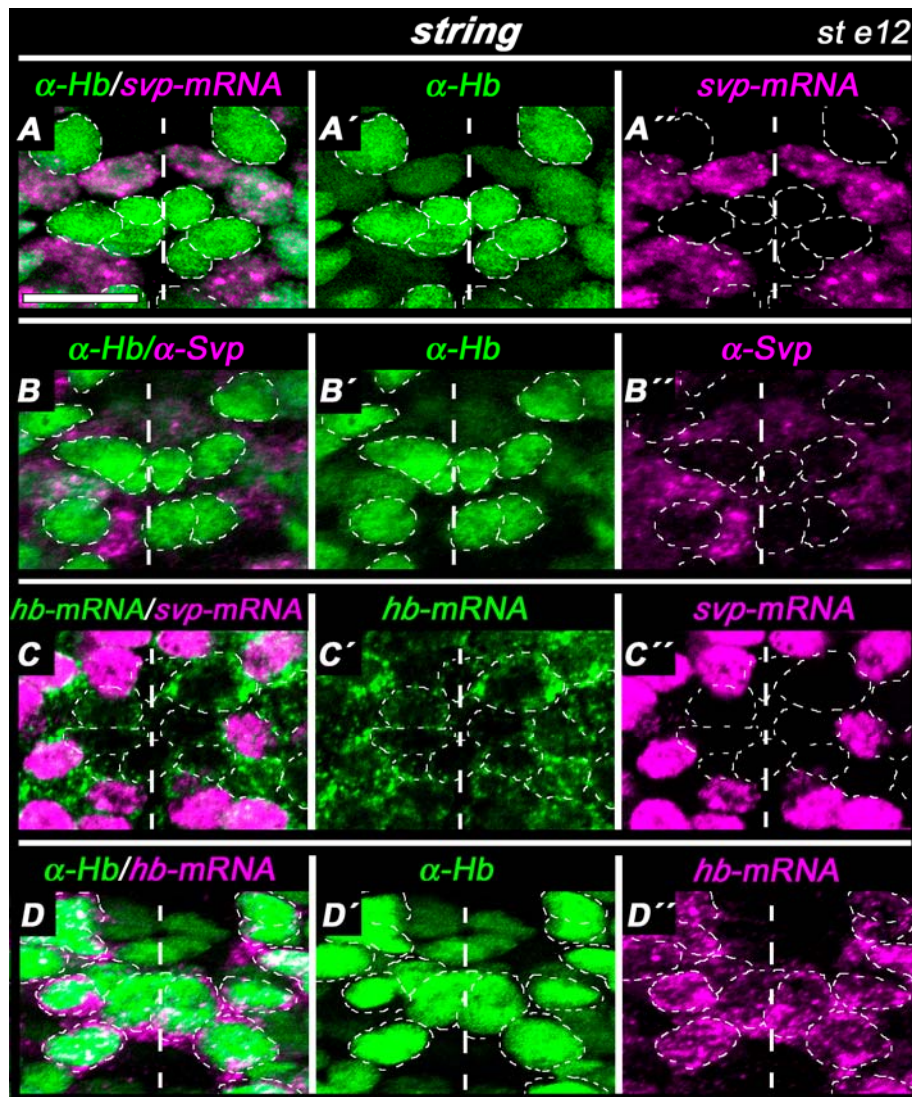
**A, A'**: *svp*-Expression im WT im späten Stadium 11. NB7-3 (Pfeil) und NB2-4T (gebogener Pfeil) exprimieren *svp*. **B, B'**: *svp*-Expression in *string*-Mutanten im späten Stadium 11. *svp*-Transkript kann im NB7-3, im NB2-4T und im NB6-4T detektiert werden **C, C'**: Svp-Expression in *string*-Mutanten im späten Stadium 12. Die Eg-positiven NB exprimieren kaum Svp. Lediglich im NB7-3 findet sich eine schwache Expression von Svp.

Auffällig ist, dass die *svp*-mRNA in *string*-Mutanten vorwiegend im Zellkern lokalisiert ist. Eine Hb-Antikörperfärbung kombiniert mit einer *in situ*-Hybridisierung gegen *svp* weist in den doppelpositiven Zellen eine vollständige Überlagerung der beiden Färbungen auf (Abb. 3.9 A). Hb befindet sich im Zellkern, entsprechend seiner Funktion als Transkriptionsfaktor. Daraus kann geschlossen werden, dass der größte Teil der *svp*-mRNA ebenfalls im Kern verbleibt. mRNA ist gewöhnlich im Cytoplasma detektierbar, wo die Translation vonstatten geht. Daher wäre zu erwarten gewesen,

dass die *svp*-mRNA den Hb-positiven Kern umlagert. Vergleicht man z.B. eine Doppel-*in situ*-Hybridisierung gegen *svp* und *hb*, findet man die *hb*-mRNA vorwiegend im Cytoplasma der Zelle, während das *svp*-Transkript im Kern lokalisiert ist (Abb. 3.9 C, C', C''). Diese nukleäre Anreicherung der *svp*-mRNA könnte eine gehemmte Translation erklären.

Offensichtlich erfolgt jedoch trotzdem eine basale Translation der *svp*-mRNA. In *string*-mutanten Embryonen im frühen Stadium 12 variiert die Stärke der Hb-Expression in den NB. In Zellen, die eine starke Hb-Expression aufweisen, findet sich keine *svp*-mRNA. Zellen mit einer geringen Hb-Expression exprimieren aber *svp*-Transkript (Abb. 3.9 A, A', A''). Eine Antikörperfärbung gegen Svp und Hb zeigt, dass die stark Hb-positiven Zellen kein Svp exprimieren. Jene Zellen, die nur schwach Hb-positiv sind, exprimieren geringe Mengen an Svp-Protein (Abb. 3.9 B, B', B''). Zudem findet man in den schwach Hb-positiven Zellen kaum *hb*-Transkript, wohl aber in den stark Hb-positiven und gleichzeitig Svp-negativen Zellen (Abb. 3.9 D, D', D'').

Aus diesen Ergebnissen lässt sich schließen, dass das Mitose-bedingte Abschalten von Hb vermutlich darauf beruht, dass die effiziente Translation der *svp*-mRNA einer Mitose bedarf, welche möglicherweise die kernständige Lokalisation der *svp*-mRNA aufhebt.



**Abb. 3.9: Seven-up schwächt die Hunchback-Expression in *string*-mutanten Embryonen ab *string*-mutante Embryonen im frühen Stadium 12. Dargestellt ist jeweils ein Ausschnitt eines Segments. Stark Hb-positive Zellen sind umrandet. Anterior ist oben, die gestrichelte Linie repräsentiert die Mittellinie. Balken: 20  $\mu$ m.**

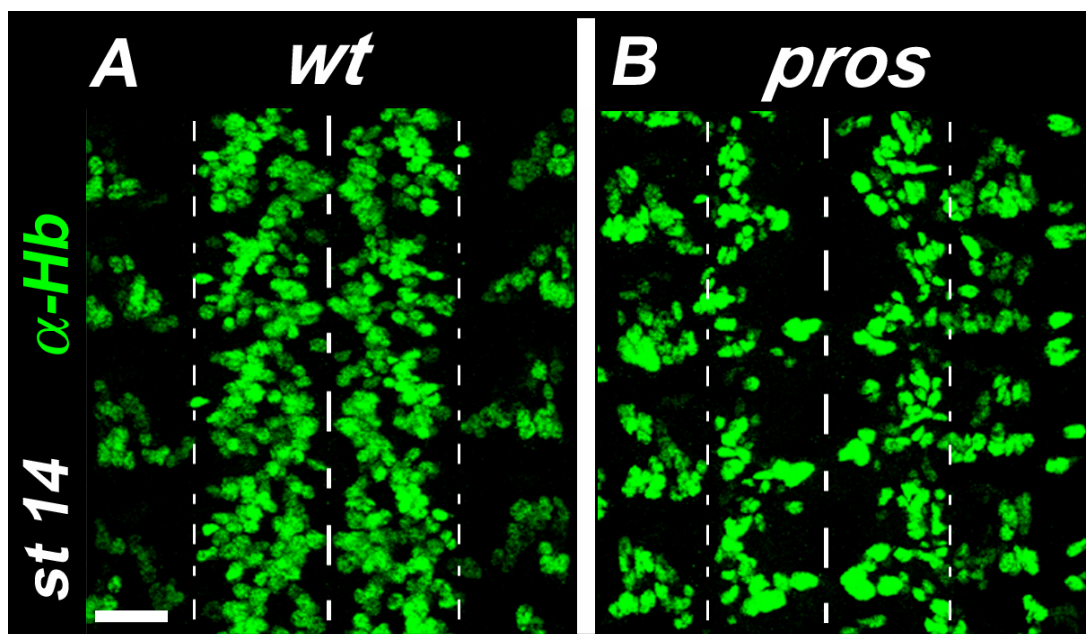
**A, A', A'':** Antikörperfärbung gegen Hb (grün) kombiniert mit einer *in situ*-Hybridisierung gegen *svp* (magenta). Stark Hb-positive Zellen exprimieren kein *svp*, schwach Hb-positive Zellen exprimieren *svp*-Transkript. **B, B', B'':** Antikörperfärbung gegen Hb (grün) kombiniert mit einer Antikörperfärbung gegen Svp (magenta). In schwach Hb-positiven Zellen finden sich geringe Mengen an Svp-Protein, stark Hb-positive Zellen sind jedoch Svp-negativ. **C, C', C'':** *in situ*-Hybridisierung gegen *svp* (magenta) und *hb* (grün). *hb*-mRNA ist vorwiegend im Cytoplasma lokalisiert, während das *svp*-Transkript im Zellkern akkumuliert. **D, D', D'':** Antikörperfärbung gegen Hb (grün) kombiniert mit einer *in situ*-Hybridisierung gegen *hb* (magenta). Stark Hb-positive Zellen zeigen *hb*-Transkription, in schwach Hb-positiven Zellen findet sich kaum *hb*-Transkript.

### 3.3 Prospero erhält die Hunchback-Expression in Gangliennutterzellen aufrecht

Nachdem der NB die letzte Hb-positive GMZ hervorgebracht hat, schaltet Svp die *hb*-Expression im NB ab (s. Kap. 3.1). In der gerade geborenen GMZ, die ebenfalls Svp exprimiert, bleibt die Hb-Expression jedoch bestehen. Wie kann man sich das

erklären? Offenbar wird die Svp-Funktion in der GMZ inhibiert. Dafür könnte ein Faktor verantwortlich sein, der in der GMZ agiert, nicht aber im NB. Gute Kandidaten für solche Faktoren sind die beiden Zellschicksalsdeterminanten Numb und Prospero (Pros). Beide Proteine werden kurz vor der Mitose asymmetrisch in Form eines Halbmonds am Cortex des NB lokalisiert und segregieren während der Mitose in die GMZ (Hirata et al., 1995; Knoblich et al., 1999; Spana und Doe, 1995). Um herauszufinden, ob Numb und/oder Prospero einen Einfluss auf Hb haben, wurde die Hb-Expression in *numb*- und *prospero*-Mutanten untersucht. In *numb*-Mutanten war die Hb-Expression unverändert zum WT (Analysen wurden von Joachim Urban durchgeführt, Daten nicht gezeigt). In *pros*-mutanten Embryonen hingegen ist die Anzahl der Hb-positiven Zellen im Vergleich zum WT stark reduziert (vgl. Abb. 3.10 A und B).

Um diejenigen Zellen zu identifizieren, in denen Hb verloren geht, wurde die Hb-Expression in *pros*-mutanten Embryonen in den Zellstammbäumen NB6-4T, NB7-3 und NB2-4T analysiert. Dazu wurde das Funktionsverlust-Allel *pros*<sup>C7</sup> verwendet. Die Hb-Expression in den U-Neuronen des NB7-1 konnte nicht untersucht werden, da Eve, der U-Neuronen-Marker, Pros-abhängig ist (Doe et al., 1991; McDonald et al., 2003).



**Abb. 3.10: Im Bauchmark von *prospero*-mutanten Embryonen ist die Anzahl Hunchback-positiver Zellen stark reduziert**

Dargestellt sind jeweils vier Segmente. Anterior ist oben. Dünn gestrichelte Linien umranden das Bauchmark, dick gestrichelte Linien repräsentieren die Mittellinie. Balken: 20  $\mu$ m.

**A:** Hb-Expression im Bauchmark eines wildtypischen Embryos im Stadium 14.

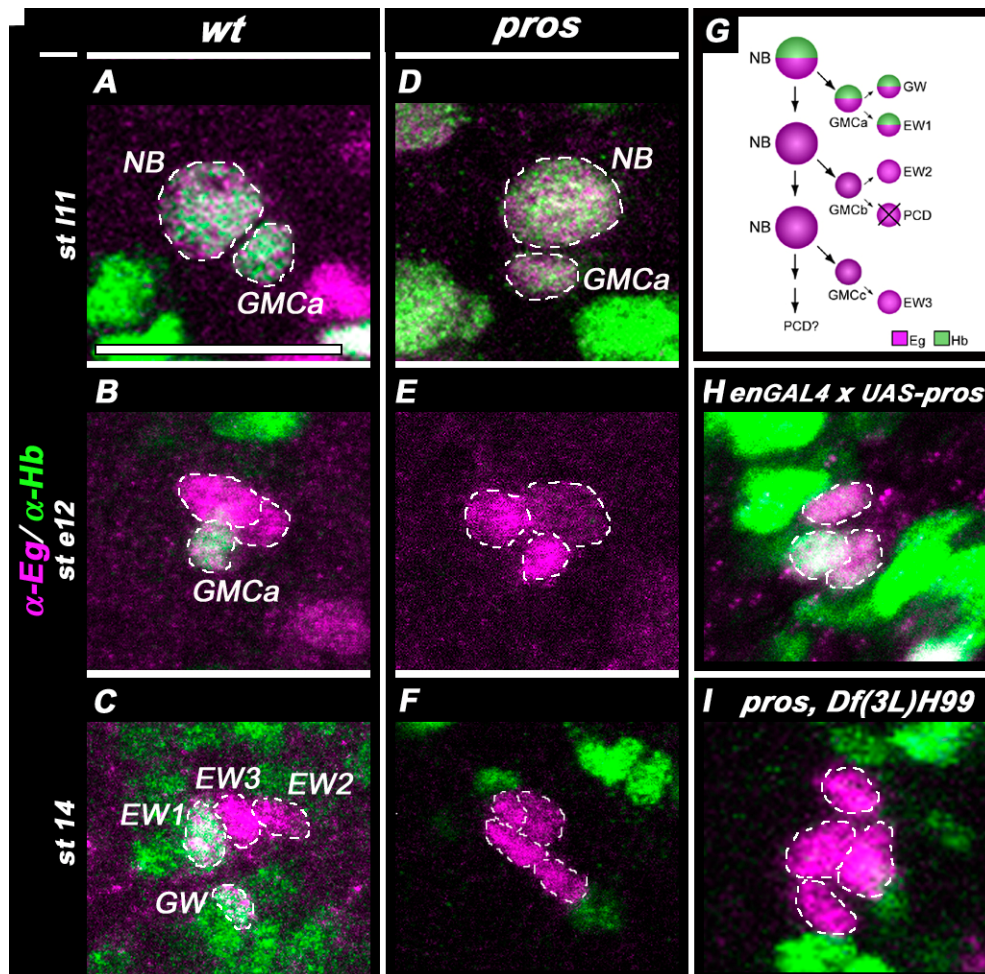
**B:** Hb-Expression im Bauchmark eines *pros*-mutanten Embryos im Stadium 14. Im Vergleich zum WT (A) zeigt sich eine stark reduzierte Anzahl von Hb-positiven Zellen.

### 3.3.1 In *prospero*-Mutanten geht die Hunchback-Expression in der erstgeborenen Tochterzelle der Zellstammbäume NB7-3 und NB6-4T verloren

Hunchback wird im NB7-3 von *pros*-Mutanten wildtypisch exprimiert. Nach der ersten Teilung sind sowohl der NB als auch die GMZ7-3a Hb-positiv (Abb. 3.11 D). Im Dreizell-Stadium exprimiert im WT GMZ7-3a als einzige Hb (Abb. 3.11 B), in *pros*-Mutanten können in diesem Stadium jedoch in vielen Fällen drei Hb-negative Zellen detektiert werden (Abb. 3.11 E). Im Stadium 14 kommt es zu einem vollständigen Verlust von Hb im Zellstammbaum NB7-3 (Abb. 3.11 F, n= 110 Hemisegmente). Um zu überprüfen, ob das Fehlen von Hb in *pros*-Mutanten auf das Absterben der Hb-positiven Zellen zurückzuführen ist, wurde die Hb-Expression in *pros,Df(3L)H99*-Doppelmutanten untersucht. Die Defizienz *H99* umfasst die Apoptose-Gene *reaper*, *hid* und *grim*. In solchen Mutanten ist der programmierte Zelltod inhibiert (White et al., 1994). In der *pros,Df(3L)H99*-Doppelmutante finden sich, wie in der *pros*-Einzelmutante, vier Zellen im Zellstammbaum NB7-3, die alle Hb-negativ sind (Abb. 3.11 I; Herstellung und Analyse der *pros,Df(3L)H99*-Doppelmutante wurden von Joachim Urban durchgeführt). Dies zeigt, dass der Verlust der Hb-positiven Zellen nicht auf Apoptose zurückzuführen ist. Wahrscheinlicher ist, dass Pros für den Erhalt der Hb-Expression in der GMZ7-3a erforderlich ist, weswegen in den Nachkommen der GMZ7-3a Hb nicht nachweisbar ist. Die Zellteilung scheint in *pros*-Mutanten jedoch beeinträchtigt zu sein, denn in *Df(3L)H99*-Einzelmutanten generiert der NB7-3 in der Regel acht Nachkommen (Novotny et al., 2002). In der *pros,Df(3L)H99*-Doppelmutante besteht der Zellstammbaum NB7-3 lediglich aus vier Zellen. Möglicherweise ist die Expression von Pros in GMZ unter anderem dafür verantwortlich, dass sich diese Zellen teilen können.

Wenn Pros für die Aufrechterhaltung von Hb in GMZ notwendig sein sollte, dann müsste eine Überexprimierung von Pros im NB7-3 zu einer verlängerten Hb-Expression führen. In diesem Fall würde Pros das Abschalten von *hb* im NB verhindern. Tatsächlich kann durch die ektopische Pros-Expression das Abschalten von *hb* im NB inhibiert werden. Gleichzeitig führt dies in den meisten Fällen zu einem vorzeitigen Stopp der Zellproliferation, so dass der Zellstammbaum NB7-3 oft nur aus zwei Zellen besteht. Das ist zu erwarten, denn Pros aktiviert das Gen *dacapo*,

welches weitere Zellteilungen inhibiert (Li und Vaessin, 2000; Liu et al., 2002). In einigen Fällen besteht der Zellstammbaum NB7-3 im Stadium 12 aus drei Zellen, die in der Regel alle Hb exprimieren (Abb. 3.11 H). Bei einer dieser Zellen muss es sich um den NB7-3 handeln, der sich mindestens einmal geteilt hat. Zu diesem Zeitpunkt ist der NB im WT bereits Hb-negativ. Bei den beiden anderen Zellen handelt es sich entweder um GMZ7-3a und GMZ7-3b oder die Nachkommen von GMZ7-3a.

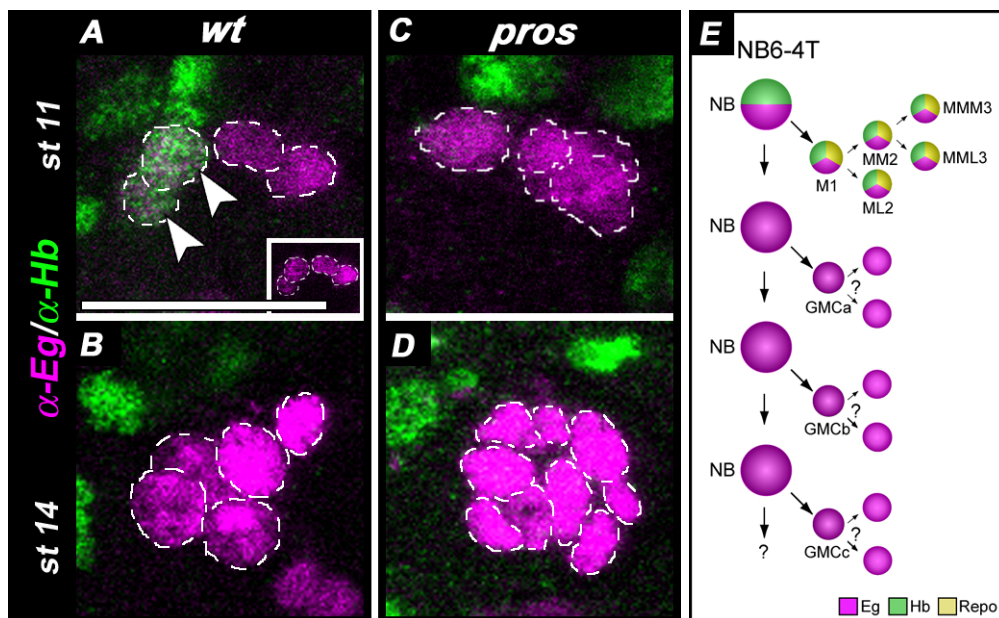


**Abb. 3.11: Prospero ist notwendig, um die Hunchback-Expression in GMZ7-3a zu erhalten**

Antikörperfärbung gegen den NB7-3-Zellstammbaummarker Eg (magenta) und Hb (grün). Dargestellt sind jeweils die Zellen des Zellstammbaums NB7-3 in einem Hemisegment (weiß umrandete Zellen). Anterior ist oben, die Mittellinie befindet sich links. Balken: 20µm.

**A-C:** WT. A: NB7-3 nach der ersten Teilung. Der NB und die erste GMZ exprimieren Hb. B: NB7-3 nach der zweiten Teilung. Die GMZ7-3a exprimiert Hb, während der NB und die GMZ7-3b Hb-negativ sind. C: NB7-3 Zellstammbaum im Stadium 14: GW und EW1, die Nachkommen der ersten GMZ sind Hb-positiv; EW2 und EW3, die Nachkommen der zweiten und dritten GMZ exprimieren kein Hb. **D-F:** *pros*-Mutanten. D: Nach der ersten Teilung exprimieren der NB und die GMZ7-3a Hb. E: Nach der zweiten Teilung des NB sind alle Zellen Hb-negativ, die Hb-Expression bleibt in der GMZ7-3a also nicht erhalten. F: Im Stadium 14 sind alle Zellen des Zellstammbaums NB7-3 Hb-negativ. **G:** Schematische Darstellung des Zellstammbaums NB7-3. **H:** Eine Überexpression von *pros* im NB7-3 hat eine verlängerte Hb-Expression im NB zur Folge. **I:** In *pros, Df(3L)H99*-Mutanten finden sich im Stadium 14, wie in der *pros*-Einzelmutante, vier Hb-negative Zellen im Zellstammbaum NB7-3.

Im WT wird Hb im Zellstammbaum NB6-4T in der Gliavorläuferzelle M1 und deren Nachkommen exprimiert (Abb. 3.12 E). Im Stadium 11 exprimieren MM2 und ML2, die Tochterzellen von M1, Hb. In *pros*-mutanten Embryonen hingegen sind alle Zellen des Zellstammbaums NB6-4T in diesem Stadium Hb-negativ (vgl. Abb. 3.12 A und C), was darauf hinweist, dass die Hb-Expression in M1 nicht beibehalten worden ist. Ferner ist die Anzahl der Zellen im lateralen neuronalen Cluster in *pros*-Mutanten erhöht (vgl. Abb. 3.12 B und D). Im WT besteht dieses Cluster im Stadium 14 aus ca. fünf Neuronen ( $\varnothing$  4,93 Zellen/Hemisegment, n=30 Hemisegmente). In *pros*-Mutanten finden sich jedoch im Schnitt 8,5 Zellen im lateralen Teil des Zellstammbaums NB6-4T (n=35 Hemisegmente).



**Abb. 3.12: In *prospero*-Mutanten geht die Hunchback-Expression im glialen Anteil des Zellstammbaums NB6-4T verloren**

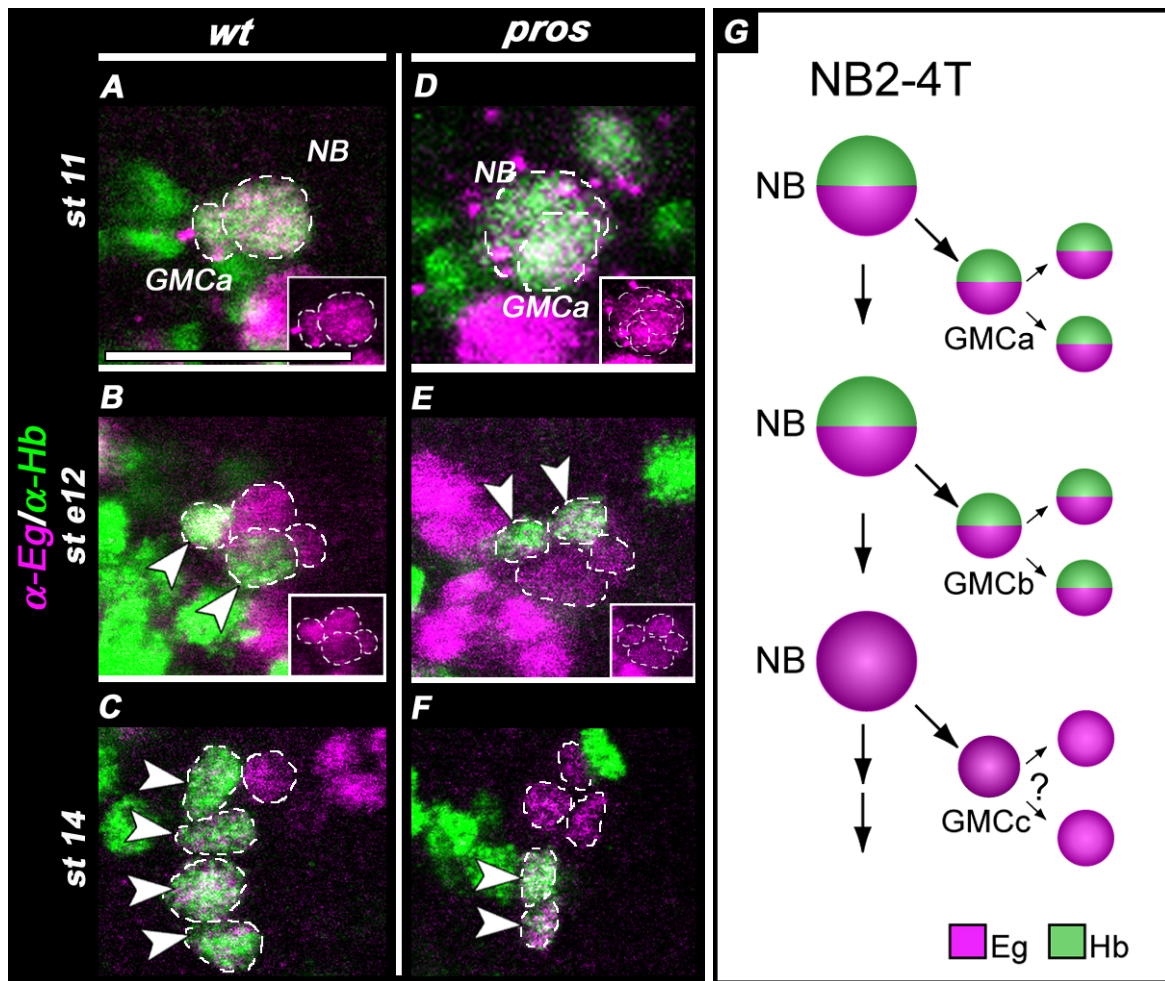
Antikörperfärbung gegen den NB6-4T-Zellstammbaummarker Eg (magenta) und Hb (grün) an wildtypischen Embryonen (A, B) sowie *svp*-mutanten Embryonen (C, D). Dargestellt sind jeweils die Zellen des Zellstammbaums NB6-4T in einem Hemisegment (weiß umrandete Zellen). Anterior ist oben, die Mittellinie befindet sich links. Balken: 20µm.

**A:** Zellstammbaum NB6-4T im Stadium 11. Die gliale Vorläuferzelle M1 hat sich bereits einmal geteilt und die beiden Hb-positiven Zellen ML2 und MM2 hervorgebracht (Pfeile). Der NB hat zu diesem Zeitpunkt eine GMZ generiert. Inset zeigt die  $\alpha$ -Eg-Antikörperfärbung alleine. **B:** Der neuronale Anteil des Zellstammbaums NB6-4T besteht in Stadium 14 aus fünf Zellen. **C:** In *pros*-Mutanten bleibt die Expression von Hb nicht erhalten. Im Stadium 11 sind alle vier Zellen des Zellstammbaums NB6-4T Hb-negativ. **D:** Die Anzahl der Zellen im lateralen Cluster ist im Vergleich zum WT erhöht. **E:** Schematische Darstellung des Zellstammbaums NB6-4T.

### 3.3.2 In Prospero-Mutanten kommt es zu einem Verlust der Hunchback-Expression in GMZ2-4Tb

Der NB2-4T generiert normalerweise zwei Hb-positive GMZ. Svp wird nur in GMZ2-4Tb, der zweiten GMZ, exprimiert. Falls Pros tatsächlich die Funktion hat, der Svp-bedingten Abschaltung von *hb* in GMZ entgegen zu wirken, sollte Hb in *pros*-Mutanten nur in GMZ2-4Tb und deren Nachkommen verloren gehen. GMZ2-4Ta sollte hingegen Hb-positiv bleiben, denn in dieser Zelle wird Svp nicht exprimiert.

In *pros*-Mutanten bringt der NB2-4T wie im WT zunächst zwei Hb-positive GMZ hervor (vgl. Abb. 3.13 B und E). Im Stadium 14 findet sich nur in 10% der Hemisegmente die wildtypische Anzahl von vier Hb-positiven Neuronen im Zellstammbaum NB2-4T (n=40 Hemisegmente). In den meisten Fällen (53%) können nur zwei Hb-positive Neurone detektiert werden (Abb. 3.13 F), die sehr wahrscheinlich die Nachkommen der GMZ2-4Ta sind. Dies unterstützt die oben aufgestellte Hypothese, dass Prospero nur in der Svp-positiven GMZ2-4Tb des Zellstammbaums NB2-4T nötig ist, um die Hb-Expression aufrecht zu erhalten, nicht aber in der Svp-negativen GMZ2-4Ta.



**Abb. 3.13:** In *prospero*-Mutanten wird die Hunchback-Expression in der GMZ2-4Tb nicht aufrechterhalten.

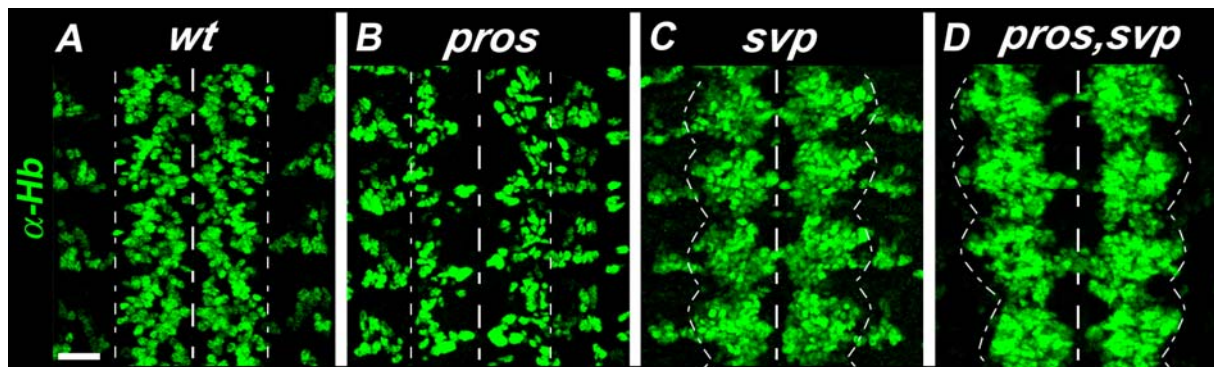
Antikörperfärbung gegen den NB2-4T-Zellstammbaummarker Eg (magenta) und Hb (grün) im WT (A-C) und in *pros*-mutanten Embryonen (D-F). Insets zeigen  $\alpha$ -Eg-Antikörperfärbung alleine. Dargestellt sind jeweils die Zellen des Zellstammbaums NB2-4T in einem Hemisegment (weiß umrandete Zellen). Anterior ist oben, die Mittellinie befindet sich links. Balken: 20 $\mu$ m.

**A:** NB2-4T nach der ersten Teilung, der NB und die erste GMZ sind Hb-positiv. **B:** NB2-4T im frühen Stadium 12. Der NB hat zwei Hb-positive GMZ (Pfeile) und eine Hb-negative GMZ generiert. **C:** Zellstammbaum NB2-4T im Stadium 14: Die Nachkommen der ersten und zweiten GMZ sind Hb-positiv (Pfeile), zudem ist ein Hb-negatives Neuron zu sehen, das vermutlich Nachkomme der dritten GMZ ist. **D:** NB2-4T nach der ersten Teilung in *pros*-Mutanten. Beide Zellen sind Hb-positiv. **E:** Auch in *pros*-Mutanten generiert der NB2-4T zwei Hb-positive GMZ (Pfeile). **F:** Im Stadium 14 können in den meisten Fällen nur zwei statt vier Hb-positive Neurone detektiert werden (Pfeile). **G:** Schematische Darstellung der frühen Entwicklung des Zellstammbaums NB2-4T.

### 3.4 Seven-up ist epistatisch über Prospero

Svp wird sowohl im NB als auch in der letztgeborenen Hb-positiven GMZ eines NB-Zellstammbaums exprimiert. Im NB kann Svp *hb* abschalten, nicht aber in der GMZ. In letzterer scheint Pros der Svp-Funktion entgegen zu wirken, weshalb Hb weiterhin in dieser Zelle exprimiert wird. Um zu testen, ob diese Annahme zutreffend ist, wurden *svp,pros*-Doppelmutanten analysiert. Sollte Pros das Svp-bedingte

Abschalten von *hb* inhibieren, so wäre zu erwarten, dass der Phänotyp der *pros,svp*-Doppelmutante bzgl. der Hb-Expression dem der *svp*-Einzelmutante entspricht. Betrachtet man die gesamte Hb-Expression im VNS eines *pros,svp*-mutanten Embryos, so ergibt sich ein erster Anhaltspunkt für die Richtigkeit dieses Modells. Wie in der *svp*-Einzelmutation, finden sich in der *pros,svp*-Doppelmutante wesentlich mehr Hb-positive Zellen als im WT (vgl. Abb. 3.14 A, C, und D). In *pros*-mutanten Embryonen hingegen ist die Anzahl der Hb-positiven Zellen reduziert (vgl. Abb. 3.14 A und B).



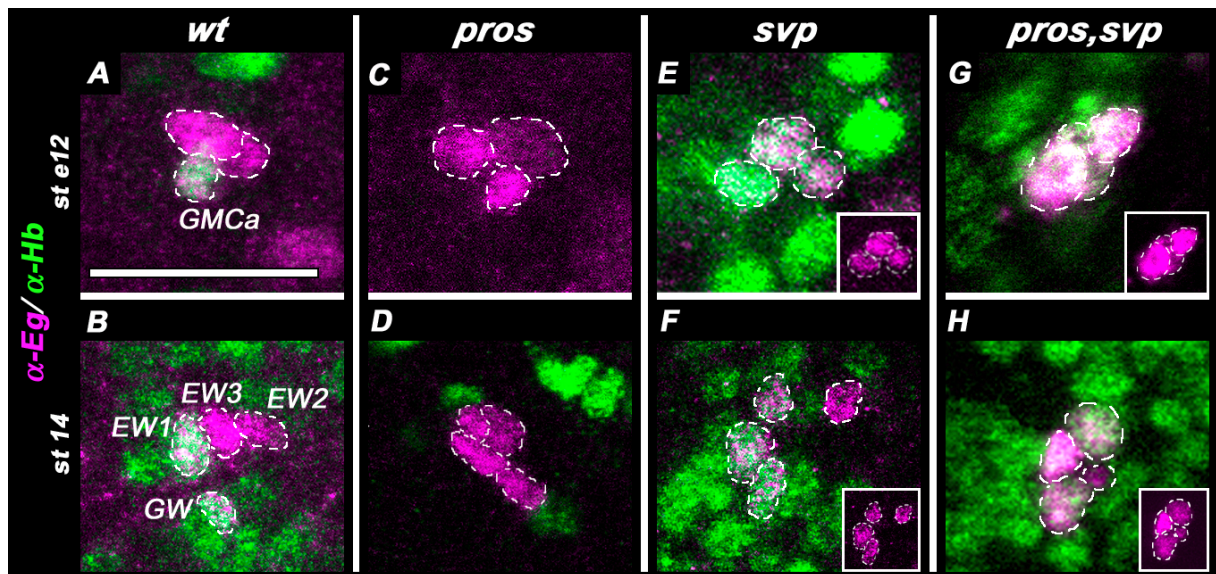
**Abb. 3.14: Im Bauchmark von *prospero,seven-up*-doppelmutanten Embryonen ist die Anzahl Hunchback-positiver Zellen stark erhöht**

Dargestellt sind jeweils vier Segmente. Anterior ist oben. Dünn gestrichelte Linien umranden das Bauchmark, dick gestrichelte Linien repräsentieren die Mittellinie. Balken: 20  $\mu$ m.

**A:** Hb-Expression im Bauchmark eines wildtypischen Embryos im Stadium 14.

**B:** Hb-Expression im Bauchmark eines *pros*-mutanten Embryos im Stadium 14. Die Anzahl von Hb-positiven Zellen ist reduziert. **C:** In *svp*-mutanten Embryonen im Stadium 14 gibt es deutlich mehr Hb-positive Zellen als im WT. **D:** Wie in der *svp*-Mutante finden sich auch in der *pros,svp*-Doppelmutante mehr Hb-positive Zellen im Bauchmark im Stadium 14.

Die Analyse der Hb-Expression im Zellstammbaum NB7-3 zeigt ebenfalls, dass der Phänotyp der *pros,svp*-Doppelmutante dem der *svp*-Einzelmutante entspricht. In beiden Fällen ist die Hb-positive Phase des NB verlängert. Während im WT im frühen Stadium 12 nur GMZ7-3a Hb-positiv ist (Abb. 3.15 A), finden sich sowohl in *svp*- als auch in *pros,svp*-Mutanten oft drei Hb-positive Zellen (Abb. 3.15 E und G). Daraus resultiert im Stadium 14 eine erhöhte Anzahl Hb-positiver Zellen im Zellstammbaum NB7-3 (Abb. 3.15 F und H). In *pros,svp*-Mutanten können in 67% der Fälle drei oder vier Hb-positive Zellen detektiert werden (n= 91 Hemisegmente). In *svp*-Mutanten finden sich in drei Viertel der Hemisegmente drei oder vier Hb-positive Zellen (n=103 Hemisegmente). Dahingegen exprimiert in *pros*-mutanten Embryonen keine der Zellen des Zellstammbaums NB7-3 Hb im Stadium 14 (Abb. 3.15 D). Dieses Experiment belegt, dass *svp* epistatisch über *pros* ist.



**Abb. 3.15: seven-up ist epistatisch über prospero**

Antikörperfärbung gegen den NB7-3-Zellstammbaummarker Eg (magenta) und Hb (grün). Dargestellt sind jeweils die Zellen des Zellstammbaums NB7-3 in einem Hemisegment (weiß umrandete Zellen). Insets zeigen die  $\alpha$ -Eg-Antikörperfärbung alleine. Anterior ist oben, die Mittellinie befindet sich links. Balken: 20 $\mu$ m.

**A, B:** WT. **A:** NB7-3 nach der zweiten Teilung des NB. Die GMZ7-3a exprimiert Hb, während der NB und die GMZ7-3b Hb-negativ sind. **B:** Zellstammbaum NB7-3 im Stadium 14: GW und EW1, die Nachkommen der ersten GMZ sind Hb-positiv; EW2 und EW3, die Nachkommen der zweiten und dritten GMZ exprimieren kein Hb. **C, D:** *pros*-Mutante. **C:** Nach der zweiten Teilung des NB sind alle Zellen Hb-negativ, die Hb-Expression bleibt in der GMZ7-3a also nicht erhalten. **D:** Im Stadium 14 sind alle Zellen des Zellstammbaums NB7-3 Hb-negativ. **E, F:** *svp*-Mutante. **E:** Nach der zweiten Teilung hat der NB Hb noch nicht abgeschaltet. Alle Zellen sind Hb-positiv. **F:** Im Stadium 14 findet sich eine erhöhte Anzahl Hb-positiver Zellen. Drei von vier Neuronen exprimieren Hb. **G, H:** Die *pros,svp*-Doppelmutante zeigt den gleichen Phänotyp wie die *svp*-Einzelmutante.

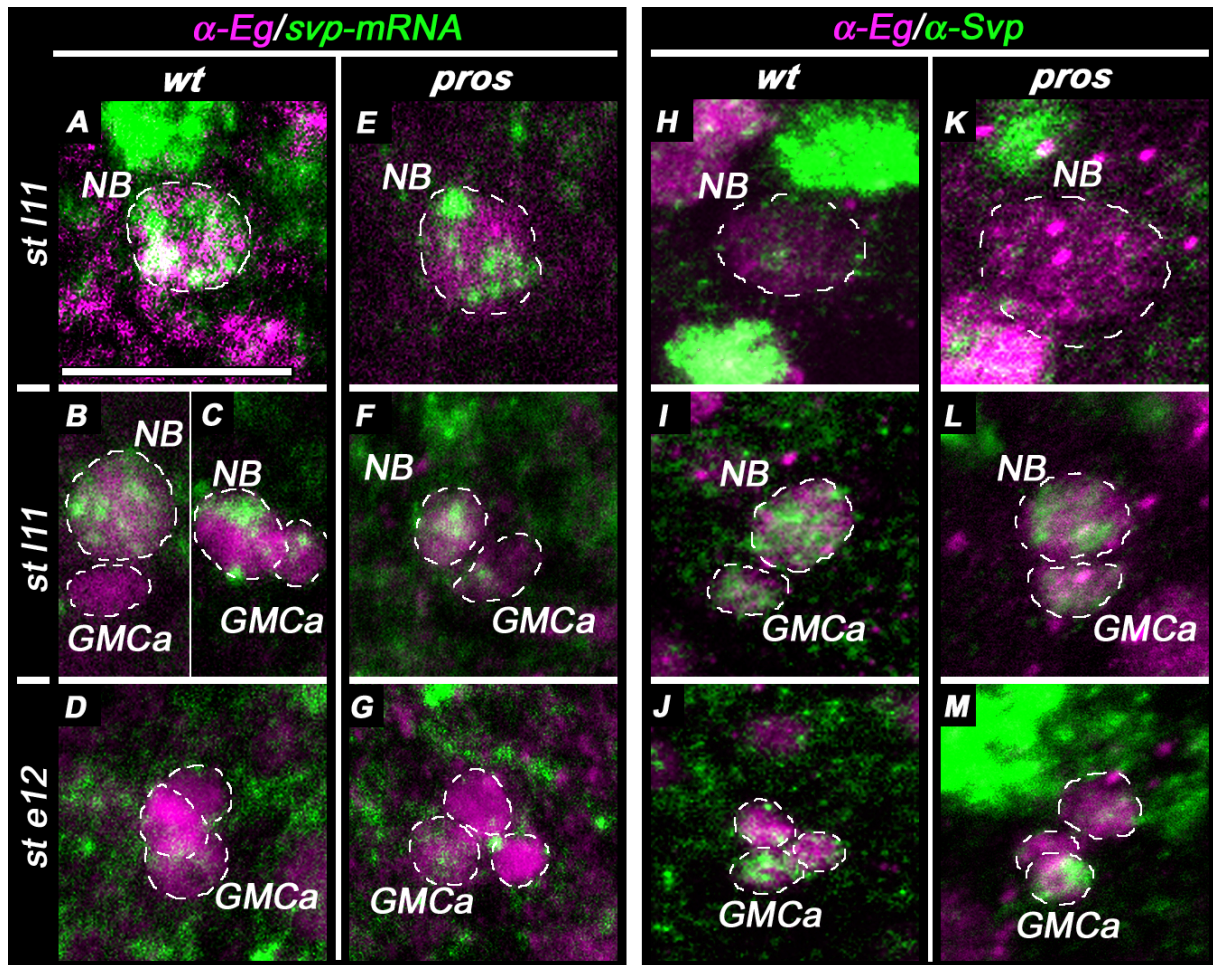
### 3.5 Regulation von Seven-up durch Prospero

Auf welcher Ebene inhibiert Pros die Funktion von Svp? Eine Möglichkeit wäre, dass Pros in der GMZ die Transkription von *svp* verhindert. Andererseits könnte Pros aber auch die Aktivität des Svp-Proteins in der GMZ beeinträchtigen. Um zwischen diesen beiden Möglichkeiten zu unterscheiden, wurde die *svp*-mRNA- bzw. Protein-Expression im Zellstammbaum NB7-3 im WT sowie in *pros*-Mutanten analysiert. (Die Analysen der *svp*-mRNA-Expression im Zellstammbaum NB7-3 wurden von Georg Vogler durchgeführt.)

In beiden Genotypen startet die *svp*-mRNA-Expression vor der ersten Teilung im NB7-3 (Abb. 3.16 A und E) und ist auch noch nach dieser im NB7-3 detektierbar (Abb. 3.16 B, C und F). Bei der Analyse der *svp*-Expression in der GMZ7-3a zeigen sich jedoch Unterschiede zwischen WT und *pros*-Mutanten. Während im WT nach der ersten Teilung des NB7-3 die GMZ7-3a in 70% der Hemisegmente kein *svp*-Transkript aufweist (Abb. 3.16 B, n=26 Hemisegmente), exprimiert in *pros*-Mutanten

die GMZ7-3a immer *svp*, wenn die Expression auch schwächer als im NB ist (Abb. 3.16 F, n=16 Hemisegmente). Nachdem der NB GMZ7-3b generiert hat, ist das *svp*-Transkript im WT in GMZ7-3a in acht von 21 Fällen und in *pros*-Mutanten in 13 von 20 Fällen detektierbar (Abb. 3.16 D und G). Diese Ergebnisse weisen auf eine transkriptionelle Regulation von *svp* durch Pros hin. Interessanterweise lassen sich die beobachteten Unterschiede in der Transkription von *svp* nicht auf Proteinebene nachvollziehen. In beiden Genotypen findet sich vor der ersten Teilung kein oder kaum Svp-Protein im NB7-3 (Abb. 3.16 H und K). Nach der ersten Teilung sind beide Zellen Svp-positiv (Abb. 3.16 I und L). Nach der zweiten Teilung des NB ist die GMZ7-3a in fast allen Fällen Svp-positiv, sowohl im WT (Abb. 3.16 J, n=30 Hemisegmente) als auch in *pros*-mutanten Embryonen (Abb. 3.16 M, n=25 Hemisegmente). In diesem Stadium exprimiert der NB kein Hb, wohl aber die erste GMZ und dies trotz Anwesenheit des Svp-Proteins. Aus diesen beiden Untersuchungen lässt sich schließen, dass Pros auf transkriptioneller und posttranslationaler Ebene wirkt, um die Svp-Aktivität zu inhibieren.

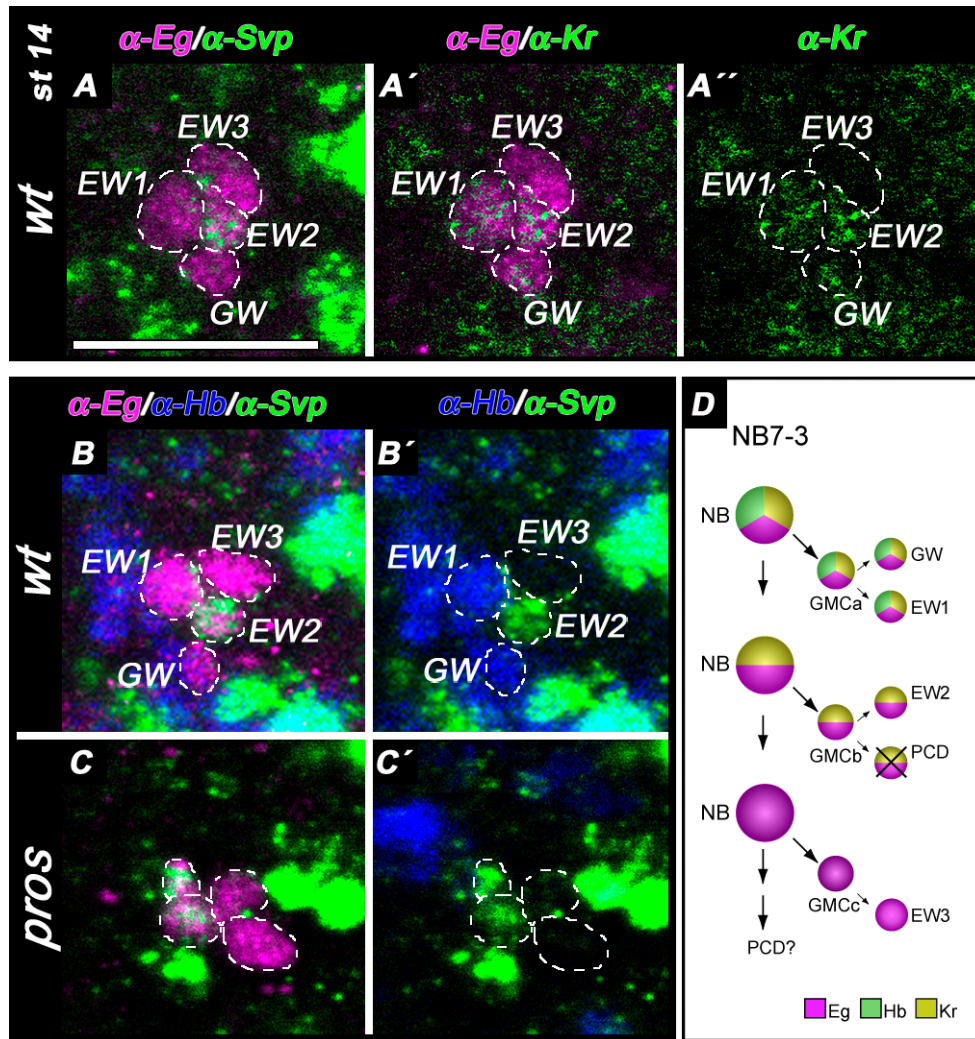
Im Gegensatz zur frühen Entwicklung des Zellstammbaums NB7-3, zeigt sich in späteren Stadien ein Unterschied in der Svp-Protein-Expression zwischen WT und Pros-Mutanten. In wildtypischen Embryonen ist im Stadium 14 eine Zelle des Zellstammbaums NB7-3 Svp-positiv. Diese Zelle exprimiert Krüppel (Kr), aber kein Hb, (Abb. 3.17 A', B'). Die einzige Zelle im Zellstammbaum NB7-3, auf die diese Kombination von Markern zutrifft, ist EW2, die Nachkommenzelle der GMZ7-3b (Isshiki et al., 2001; Novotny et al., 2002). In Pros-Mutanten hingegen findet man in einem Drittel der Hemisegmente zwei Svp-positive Zellen (n=63 Hemisegmente, Abb. 3.17 C, C'). Dies könnte darauf hindeuten, dass Pros neben der Regulation von *hb* auch die Regulation von *svp* in späteren Stadien beeinflusst.



**Abb. 3.16: Seven-up-mRNA- und -Protein-Expression in der frühen Entwicklung des Zellstammbaums NB7-3**

Antikörperfärbung gegen den NB7-3-Zellstammbaummarker Eg (magenta) kombiniert mit einer *in situ*-Hybridisierung gegen *svp* (grün, A-G) bzw. einer Svp-Antikörperfärbung (grün, H-M). Dargestellt sind jeweils die Zellen des Zellstammbaums NB7-3 in einem Hemisegment (weiß umrandete Zellen). Anterior ist oben, die Mittellinie befindet sich links. Balken: 20µm.

**A-D:** *svp*-mRNA-Expression im WT. A: Bereits vor der ersten Teilung exprimiert der NB7-3 *svp*. B, C: NB7-3 nach der ersten Teilung. Der NB ist weiterhin *svp*-positiv. B: In 70% der Fälle findet sich kein *svp*-Transkript in der GMZ7-3a. C: In 30% der Hemisegmente ist die GMZ7-3a *svp*-positiv. D: Nach der zweiten Teilung des NB ist kaum noch *svp*-mRNA zu detektieren. **E-G:** *svp*-mRNA-Expression in *pros*-mutanten Embryonen. E: Wie im WT exprimiert der NB7-3 vor der ersten Teilung *svp*. F: Nach der ersten Teilung findet sich meist in beiden Tochterzellen *svp*-Transkript. G: Nach der zweiten Teilung exprimiert die GMZ7-3a *svp*. **H-J:** Svp-Protein-Expression im WT. H: Vor der ersten Teilung ist kaum oder kein Svp-Protein im NB7-3 zu detektieren. I: Nach der Teilung sind beide Zellen Svp-positiv. J: Nach der zweiten Teilung sind alle drei Zellen Svp-positiv, die stärkste Svp-Expression findet sich in GMZ7-3a. **K-M:** Die Svp-Protein-Expression in *pros*-Mutanten entspricht der im WT.

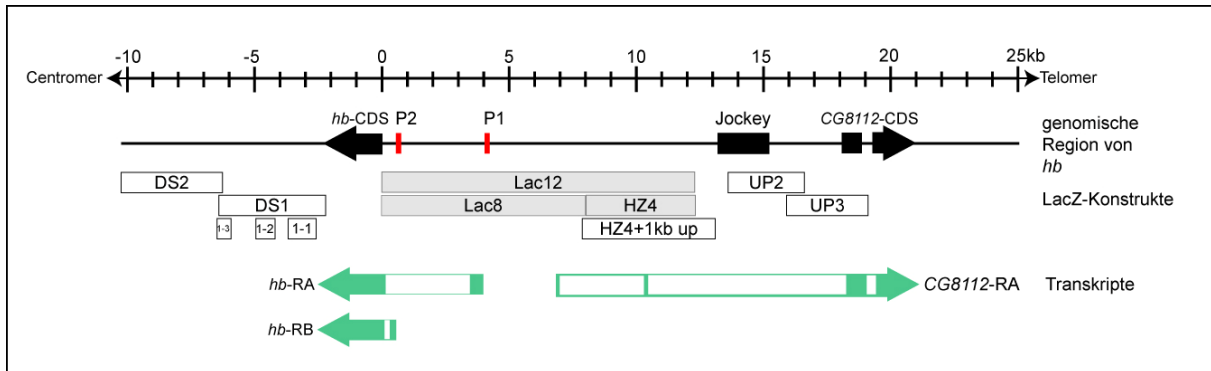


**Abb. 3.17: In *prospero*-Mutanten findet sich eine zusätzliche Seven-up-positive Zelle im Zellstammbaum NB7-3**

Antikörperfärbung gegen den NB7-3-Zellstammbaummarker Eg (magenta), Svp (grün, A, B-C') und Kr (grün, A', A'') bzw. Hb (blau) in Embryonen des Stadiums 14. Dargestellt sind jeweils die Zellen des Zellstammbaums NB7-3 in einem Hemisegment (weiß umrandete Zellen). Anterior ist oben, die Mittellinie befindet sich links. Balken: 20µm.

**A, B:** Im WT exprimiert eine Zelle im Zellstammbaum NB7-3 Svp. Bei dieser Zelle handelt es sich um EW1, da sie als einzige Zelle des Zellstammbaums Kr-positiv (A', A'') und Hb-negativ (B, B') ist. **C, C':** In *pros*-mutanten Embryonen finden sich in einem Drittel der Hemisegmente zwei Svp-positive Zellen im Zellstammbaum NB7-3. **D:** Schematische Darstellung des Zellstammbaums NB7-3 mit den in den Analysen benutzten Markern.

### 3.6 Analyse von LacZ-Enhancerkonstrukten aus dem 5´- und 3´-Bereich von *hunchback*



**Abb. 3.18: Übersicht der genomischen Umgebung von *hunchback***

Schematische Darstellung der genomischen Region von *hb* basierend auf der Annotierung des genomischen Bereichs AE003680 (Flybase). Gezeigt ist der Abschnitt 25kb „upstream“ und 10kb „downstream“ der kodierenden Sequenz von *hb*. Die kodierenden Sequenzen der Gene sind als schwarze Pfeile dargestellt, Transkripte sind mit grünen Pfeilen gekennzeichnet, die grün gefüllten Bereiche repräsentieren jeweils die einzelnen Exons. Die Pfeilrichtung gibt die 5´-3´-Orientierung an. Da Jockey ein Transposon und damit kein Gen ist, fehlt hier der Pfeilkopf. Die grau unterlegten Kästen stellen die bereits zu Beginn dieser Arbeit existierenden LacZ-Konstrukte dar, die weißen Kästen repräsentieren die für diese Arbeit angefertigten Konstrukte.

Die vorangegangenen Untersuchungen haben gezeigt, dass Pros und Svp einen direkten oder indirekten Einfluss auf die *hb*-Transkription haben. Aus diesem Grund wurden potentielle regulatorische Regionen des *hb*-Gens analysiert, um relevante Bereiche zu identifizieren.

Eine gängige Methode, einen Einblick in die Regulation eines Gens zu erhalten, ist die experimentelle Enhancerfragment-Analyse (Dearolf et al., 1989; Small et al., 1992). Dabei wird genomische DNA aus der potentiell regulatorischen Region in einen Vektor eingebracht, der einen Minimalpromoter und ein Reporter-gen besitzt. Dieser Vektor wird ins Genom der Fliege inseriert. Befinden sich nun Enhancer auf der inserierten DNA, können Enhancer-bindende Proteine mit dem Minimalpromoter interagieren und die Expression des Reporter-gens induzieren. Im optimalen Fall spiegelt diese die Expression des betreffenden Gens wider. Durch sukzessive Verkleinerung solcher enhancertragender Fragmente kann man im bestmöglichen Fall die Lage eines Enhancers auf wenige Basenpaare eingrenzen.

Es gibt zwei Transkripte von *hb*. Das *hb*-RA-Transkript umfasst 3,2kb und wird vom distalen Promotor P1 reguliert, während das 2,9kb lange *hb*-RB-Transkript durch die Aktivität des proximalen P2 Promotors transkribiert wird. Die beiden Transkripte unterscheiden sich im ersten Exon, haben aber ein gemeinsames zweites Exon, welches die gesamte kodierende Sequenz enthält (Tautz et al., 1987). Im VNS wird nur das längere *hb*-RA-Transkript exprimiert (Bender et al., 1987; Margolis et al., 1994; Tautz et al., 1987).

Zu Beginn dieser Arbeit existierten bereits die LacZ-Enhancerkonstrukte Lac12, HZ4 und Lac8 (Margolis, 1992). Das Lac8-Konstrukt enthält 8kb genomische DNA, die sich direkt 5' an den Beginn des zweiten Exons anschließt (Abb. 3.18). Dieser Bereich umfasst die beiden Promotor P1 und P2 sowie Enhancerelemente, die für die *hb*-Expression im Blastodermstadium notwendig sind. In Embryonen, die das Lac8-Fragment inseriert haben, kann keine LacZ-Expression im VNS detektiert werden (Margolis, 1992; Margolis et al., 1994). Nimmt man die genomische DNA des Lac8-Fragments und fügt noch die 5' angrenzenden 4kb DNA hinzu (HZ4), so erhält man Lac12 (Abb. 3.18). Das HZ4-Fragment enthält nur die distalen 4kb von Lac12 (Abb. 3.18). Im Gegensatz zu Lac8 exprimieren HZ4- und Lac12-Insertionsstämme LacZ im embryonalen NS (Margolis, 1992).

Lac12 und HZ4 wurden von Tanja Novotny und Sascha Eder im Rahmen einer Doktorarbeit bzw. Diplomarbeit in dieser Arbeitsgruppe genauer charakterisiert. Dabei wurde festgestellt, dass die 12kb 5' des zweiten Exons nicht die komplette regulatorische Region von *hb* im VNS beinhalten. Bei der Analyse von Doppel-Antikörperfärbungen gegen Hb und  $\beta$ -Gal (das Genprodukt von LacZ) in Lac12- und HZ4-Insertionsstämmen wurden doppelpositive Zellen sowie Zellen, die nur Hb-positiv waren, und Zellen, die nur  $\beta$ -Gal exprimierten, gefunden. Das heißt, im HZ4- und Lac12-Bereich fehlen Elemente, die in einigen Zellstammbäumen für die *hb*-Expression bzw. für deren Aufrechterhaltung verantwortlich sind. Des Weiteren fehlen Elemente, die in einer Reihe von Zellstammbäumen zum Abschalten der *hb*-Expression notwendig sind. Beispielsweise wird LacZ sowohl in HZ4- als auch in Lac12-Insertionsstämmen in den Hb-negativen longitudinalen Gliazellen exprimiert (Novotny, 2003).

Daher wurden zusätzliche LacZ-Enhancerkonstrukte im 5'- und 3'-Bereich der *hb*-kodierenden Sequenz angefertigt und auf LacZ-Expression im NS getestet, um

weitere regulatorische Bereiche zu identifizieren. Insgesamt wurden acht Konstrukte hergestellt, drei davon enthielten DNA aus dem 5'-Bereich und fünf aus der 3'-Region der kodierenden Sequenz (Abb. 3.18).

### **3.6.1 In Stämmen, die genomische DNA aus dem Bereich 5' von HZ4 inseriert haben, wird kein LacZ im Nervensystem exprimiert**

Ausgehend von der Annahme, dass sich im 5'-Bereich weitere regulatorische Sequenzen befinden könnten, wurde zunächst ein Konstrukt angefertigt, welches das HZ4-Fragment plus 1kb der 5' angrenzenden genomischen DNA enthielt (HZ4+1kb up, Abb. 3.18). Überraschenderweise konnte in keinem der elf transgenen Fliegenstämme Expression von LacZ im embryonalen Nervensystem nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

Bei der Analyse des UP3-Konstruktes, welches 3,2kb genomische DNA enthält, die 5' des HZ4+1kb up lokalisiert ist, konnte ebenfalls keine LacZ-Expression detektiert werden (Daten nicht gezeigt). UP2, das den DNA-Bereich umfasst, der zwischen HZ4+1kb up und UP3 liegt, wurde nicht analysiert.

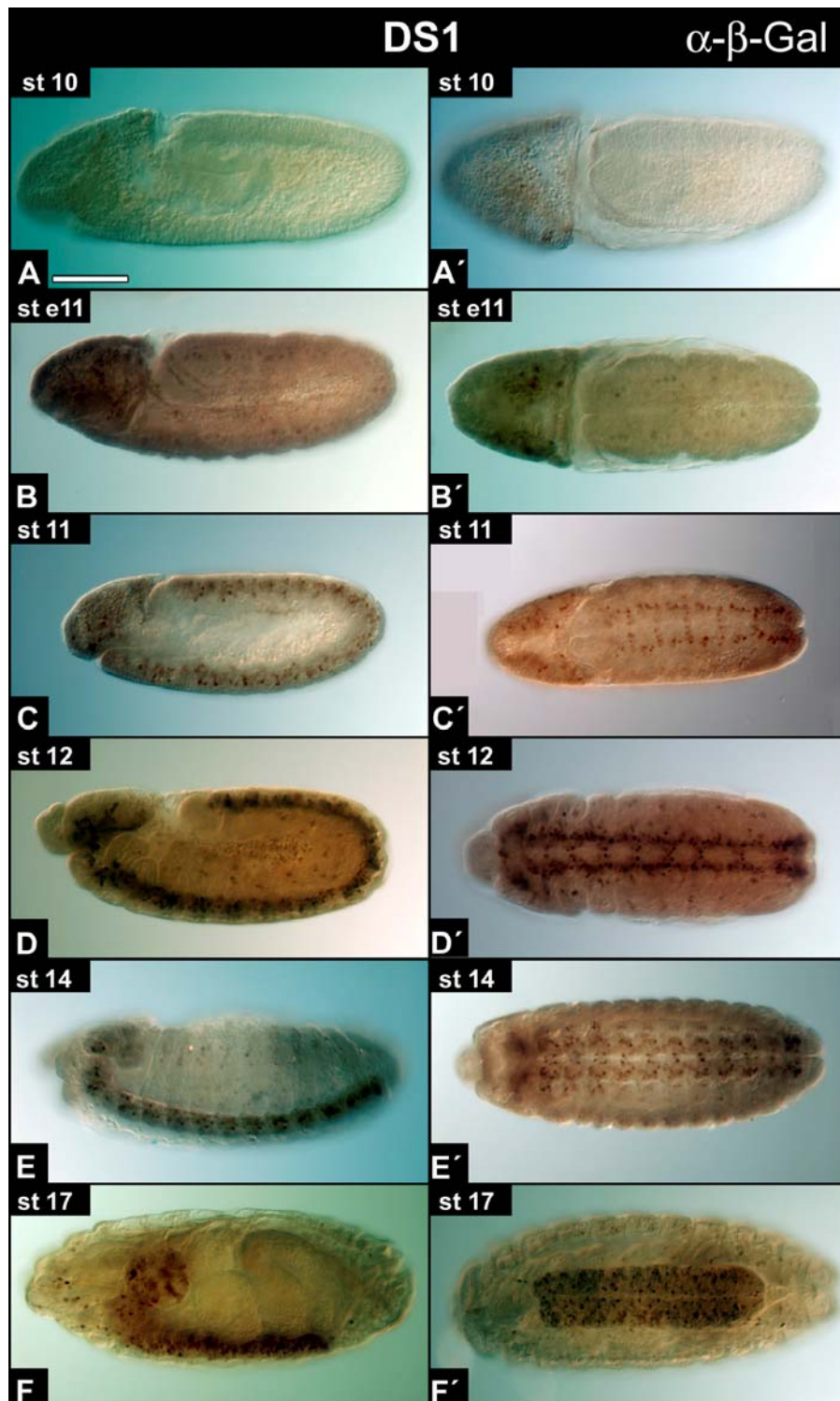
### **3.6.2 DS1-Insertionsstämme zeigen starke Expression im Nervensystem**

Im 3'-Bereich der *hb*-kodierenden Sequenz wurden zunächst zwei Konstrukte, DS1 und DS2, generiert. DS1 beinhaltet 4,2kb genomische DNA, die 516bp nach der kodierenden Sequenz beginnt. Es wurden acht Fliegenstämme generiert, die das DS1-Fragment integriert hatten. Alle zeigten LacZ-Expression. Die Analysen wurden mit den Stämmen DS1 T2 und DS1 T6 durchgeführt, da hier die stärkste LacZ-Expression festgestellt werden konnte.

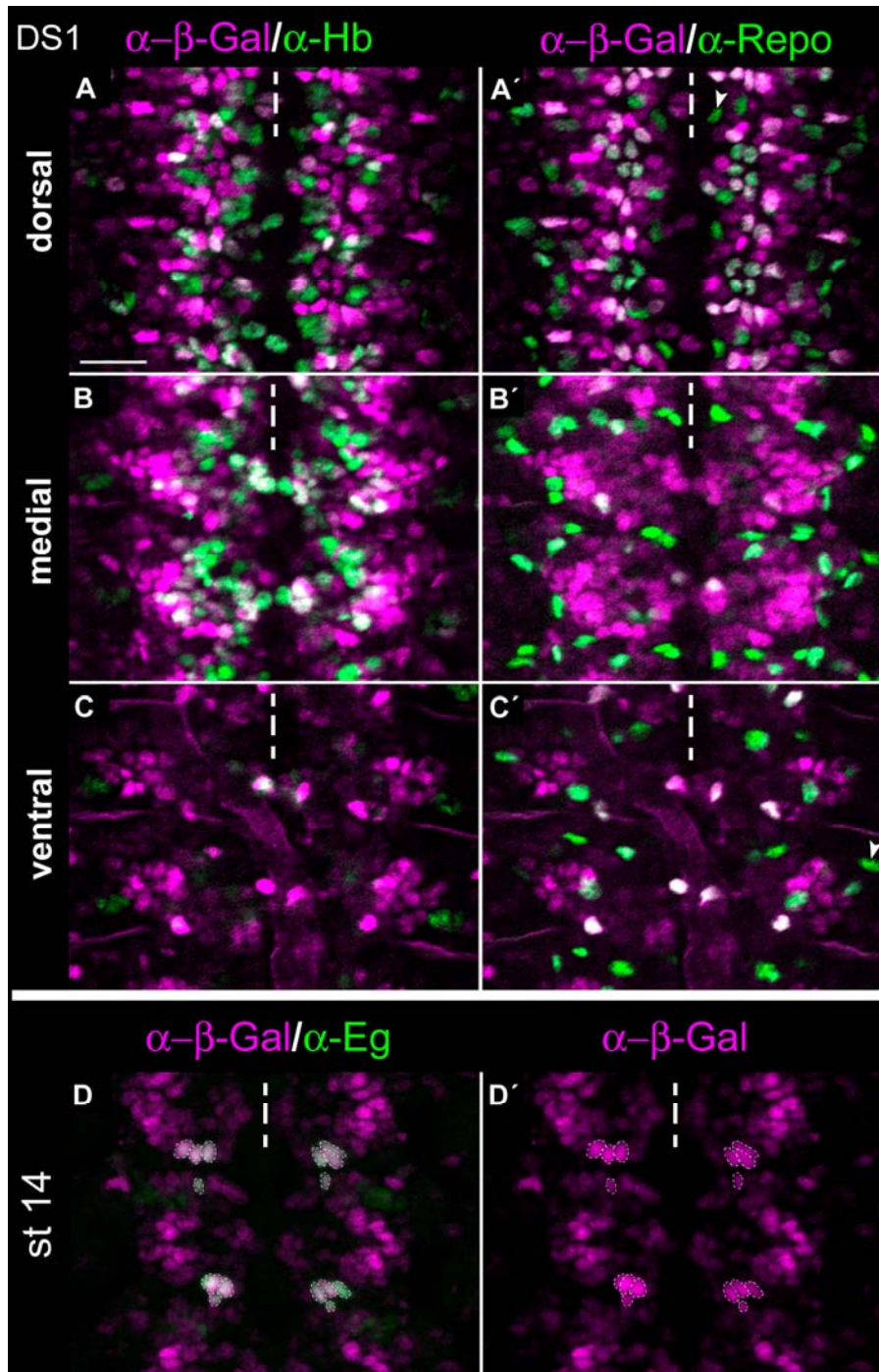
Mit einer nicht fluoreszierenden Antikörperfärbung gegen  $\beta$ -Gal lässt sich eine erste Expression von LacZ im frühen Stadium 11 nachweisen (Abb. 3.19 B, B).  $\beta$ -Gal findet sich in größerer Menge im Gehirn und in einigen Zellen des Bauchmarks. Bei diesen Zellen handelt es sich aufgrund ihrer Größe wahrscheinlich um NB. Bis zum Stadium 17 nimmt die Zahl der LacZ-exprimierenden Zellen stetig zu (Abb. 3.19).

Mittels einer  $\alpha$ -Hb/ $\alpha$ - $\beta$ -Gal-Doppelfluoreszenz-Antikörperfärbung kann ein Vergleich der endogenen Hb-Expression mit der LacZ-Expression durchgeführt werden. Da Fluoreszenz-Antikörperfärbungen sensitiver als nicht fluoreszierende Antikörperfärbungen sind, kann schon im Stadium 10, zur Zeit der S3-Segregationswelle der NB, LacZ-Expression festgestellt werden. Der überwiegende Teil der Hb-positiven NB ist in diesem Stadium LacZ-negativ. Im Stadium 11 ist die LacZ-Expression wesentlich stärker geworden. Zu diesem Zeitpunkt exprimieren die meisten der Hb-positiven Zellen auch LacZ und es existieren bereits einige LacZ-positive Zellen, die Hb-negativ sind (Daten nicht gezeigt).

Im Stadium 14 sind alle Hb-positiven Zellen ebenfalls LacZ-positiv (Abb. 3.20 A, B und C). LacZ findet sich aber auch in vielen Hb-negativen Zellen. So exprimieren nahezu alle Gliazellen LacZ (Abb. 3.20 A', B' und C'), von denen ein Großteil jedoch Hb-negativ ist. Auch im Zellstammbaum NB7-3 exprimieren alle vier Zellen LacZ, wohingegen nur GW und EW1 Hb-positiv sind. Zudem ist die Stärke der LacZ-Expression im Zellstammbaum NB7-3 ungewöhnlich hoch (Abb. 3.20 D, D').



**Abb. 3.19: DS1-Insertionsstämme exprimieren LacZ im embryonalen ventralen Nervensystem**  
 Antikörperfärbung gegen  $\beta$ -Gal an DS1 T6-transgenen Embryonen. Die linke Spalte zeigt die Lateralansicht, die rechte Spalte die Ventralansicht der Embryonen. Anterior ist links. Balken: 100 $\mu$ m.  
**A, A'**: Im Stadium 10 kann noch kein LacZ detektiert werden. **B, B'**: Im frühen Stadium 11 wird LacZ im Gehirn und in wenigen Zellen des Bauchmarks exprimiert. **C, C'**: Im Verlauf des Stadiums 11 kann man ein segmentales Muster der LacZ-Expression im VNS erkennen. **D, E, F**: In der weiteren Embryonalentwicklung nimmt die Zahl der LacZ-positiven Zellen im NS zu.



**Abb. 3.20: DS1-Insertionsstämme exprimieren LacZ in vielen Hunchback-negativen Zellen**

$\alpha$ - $\beta$ -Gal Antikörperfärbung (magenta) kombiniert mit einer Antikörperfärbung gegen Hb (grün, A, B, C) und den glialen Marker Repo (grün, A', B', C') bzw. einer Antikörperfärbung gegen den NB7-3-Zellstammbaummarker Eg (grün, D). Dargestellt sind Embryonen des Insertionsstamms DS1 T2 im Stadium 14. Anterior ist oben, gestrichelte Linien deuten den Verlauf der Mittellinie an. Balken: 20 $\mu$ m.

**A-C:** Ausschnitte aus dem dorsalen (A, A'), dem medialen (B, B') und dem ventralen Bereich des VNS (C, C'). Alle Hb-positiven Zellen exprimieren LacZ, wobei viele Hb-negative Zellen ebenfalls LacZ-Expression zeigen (A, B, C). Ein Großteil der Hb/LacZ-negativen Zellen stellt die laterale Glia dar, die bis auf wenige Ausnahmen (Pfeile) LacZ exprimiert (A', B', C'). **D:** Alle Zellen des Zellstammbaums NB7-3 (weiß umrandete Zellen) exprimieren stark LacZ.

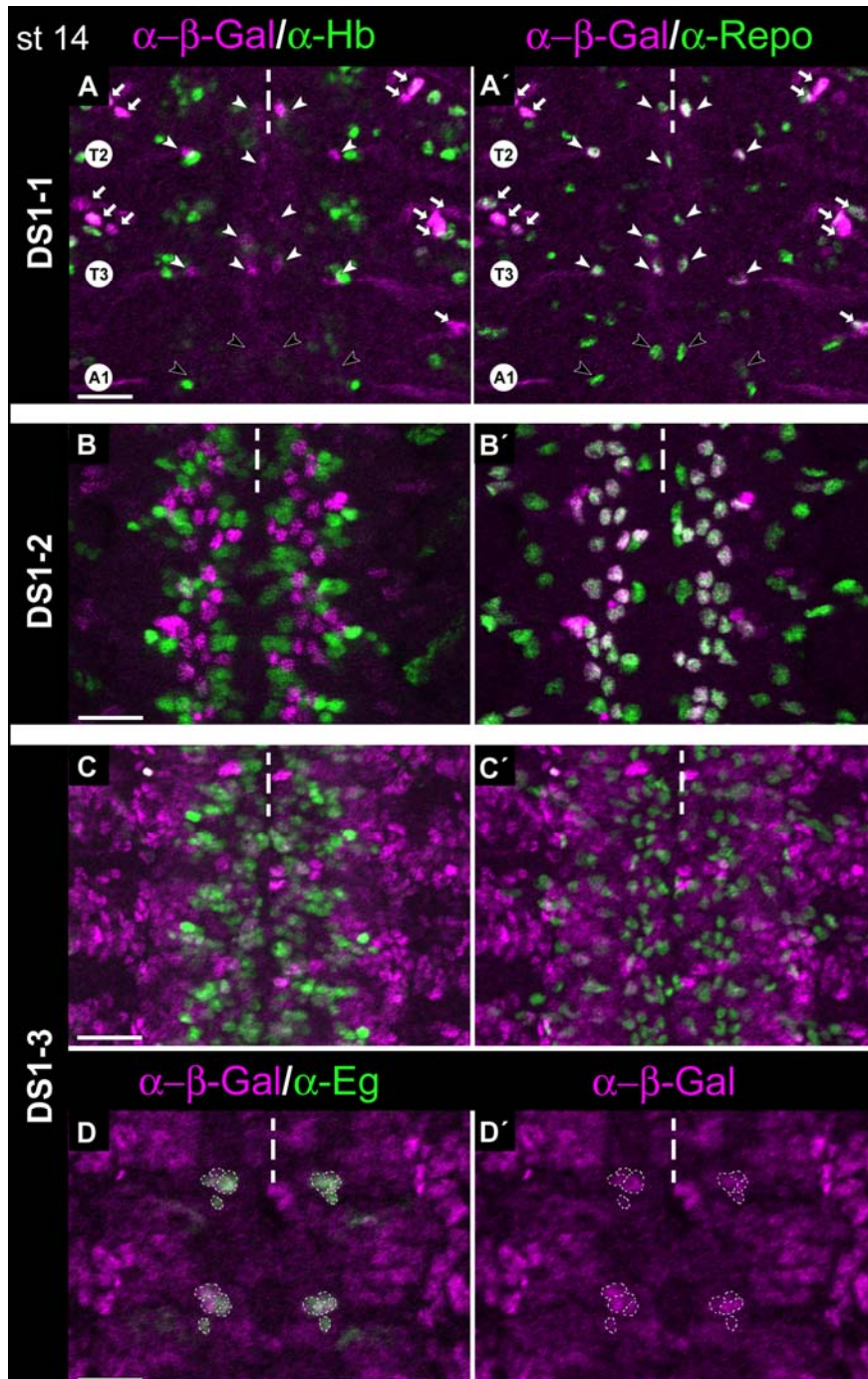
### 3.6.3 Analyse von Enhancerfragmenten, die evolutiv konservierte Bereiche des DS1-Fragments enthalten

Des Weiteren sollte die Lage der Enhancer im DS1-Bereich eingegrenzt werden. Es hat sich gezeigt, dass Enhancer eines Gens oft evolutiv konserviert und in Clustern angeordnet sind (Berman et al., 2002; Berman et al., 2004; Brugger et al., 2004). In einem Vergleich der Sequenz des DS1-Fragments von *Drosophila melanogaster* und der entsprechend homologen Region in *Drosophila pseudoobscura* wurden drei konservierte Blöcke identifiziert (s. Kap. 7.1). Daher fertigte Michael Avermann im Rahmen eines FII-Praktikums unter meiner Leitung drei LacZ-Konstrukte an, die DNA der konservierten Blöcke enthielten. Bei diesen Fragmenten handelte es sich um die LacZ-Konstrukte DS1-1 (1,1kb), DS1-2 (750bp) und DS1-3 (550bp) (Abb. 3.18).

In DS1-1-Insertionsstämmen exprimieren nur wenige Zellen des Bauchmarks im Stadium 14 LacZ. Bei diesen Zellen handelt es sich ausschließlich um Gliazellen (Abb. 3.21 A'). Zudem gibt es tagmaspezifische Unterschiede. Im Thorax sind einige der Subperineurial-Gliazellen (Ito et al., 1995), die Cell body-Gliazellen des NB6-4T sowie Exit-Gliazellen (Ito et al., 1995) LacZ-positiv. Im Abdomen exprimieren deutlich weniger Zellen LacZ. Es fehlt bspw. die LacZ-Expression in den Cell body-Gliazellen des Zellstammbaums NB6-4A. Die meisten der LacZ-positiven Zellen exprimieren Hb, wenn auch häufig nur sehr schwach (Abb. 3.21 A, A').

Auch in den DS1-2-Insertionsstämmen findet sich LacZ-Expression im Stadium 14 vorwiegend in den Gliazellen (Abb. 3.21 B'). Nur vier bis fünf der LacZ-positiven Zellen pro Hemineuromer sind keine lateralen Gliazellen. Die dorsal gelegene Longitudinal- und Subperineurial-Glia zeigen das stärkste LacZ-Signal. In einigen der Exit-Gliazellen und den ventralen Subperineurial-Gliazellen kann ebenfalls LacZ detektiert werden.

In DS1-3-Insertionsstämmen ist im Stadium 14 in wahrscheinlich allen Zellen des Bauchmarks LacZ zu detektieren (Abb. 3.21 C, C'). Allerdings ist die Expression relativ schwach im Vergleich zum DS1-Ausgangsfragment. Die Expressionsstärke innerhalb der Zellen des Bauchmarks schwankt sehr stark. Bemerkenswerter Weise gehören die Zellen des Zellstammbaums NB7-3 zu den stärker LacZ-positiven Zellen (Abb. 3.21 D, D').



**Abb. 3.21: LacZ-Expressionsmuster in Insertionsstämmen von DS1-1, DS1-2 und DS1-3**

$\alpha$ - $\beta$ -Gal Antikörperfärbung (magenta) kombiniert mit einer Antikörperfärbung gegen Hb (grün, A, B, C) und den glialen Marker Repo (grün, A', B', C') bzw. einer Antikörperfärbung gegen den NB7-3 Zellstammbaummarker Eg (grün, D). Dargestellt sind Embryonen der Insertionsstämme DS1-1 T4, DS1-2 T4 und DS1-3 T18 im Stadium 14. Anterior ist oben, gestrichelte Linien deuten den Verlauf der Mittellinie an. Balken: 20 $\mu$ m.

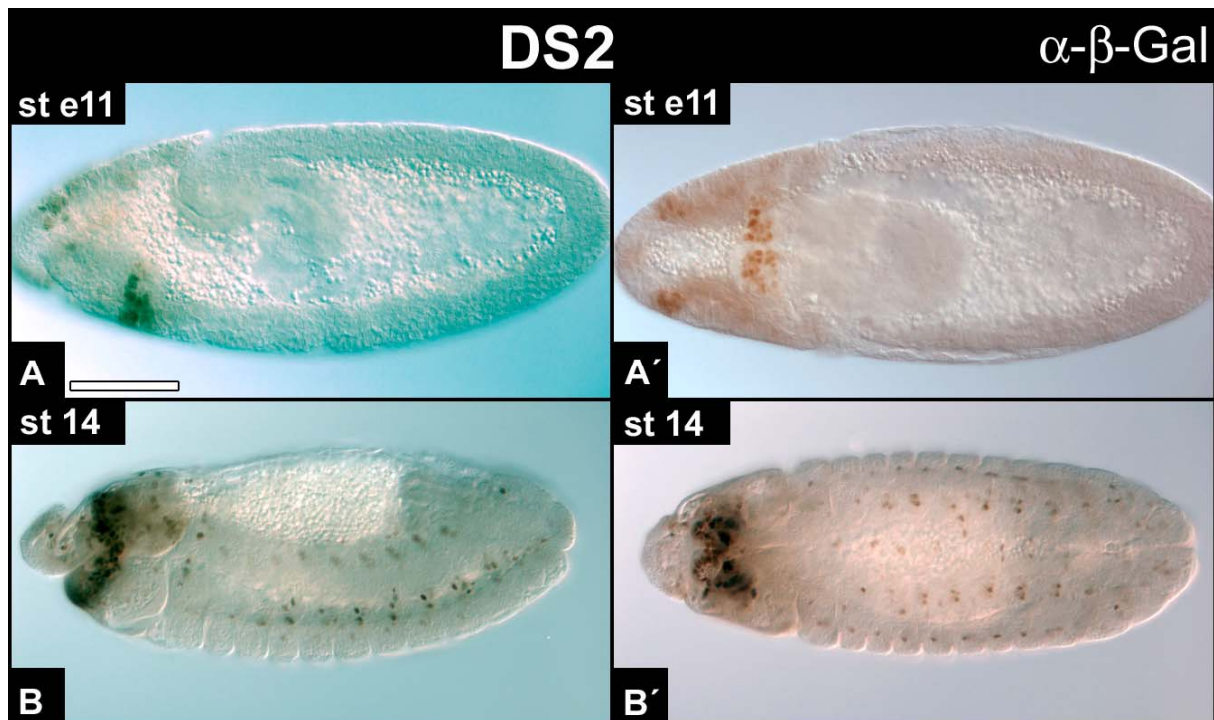
**A, A'**: DS1-1-Insertionsstämme zeigen tagmaspezifische Unterschiede in der LacZ-Expression. LacZ wird in den Cell body-Gliazellen des NB6-4T exprimiert (weiße Pfeilspitzen), nicht aber in den abdominalen Cell body-Gliazellen des NB6-4A (schwarze Pfeilspitzen). Zudem findet sich in drei thorakalen Exit-Gliazellen pro Hemineuomer LacZ-Expression (Pfeile). Im Abdomen exprimiert nur eine dieser Zellen LacZ. **B, B'**: In DS1-2-Insertionsstämmen findet sich vor allem in der longitudinalen Glia LacZ-Expression. **C, C'**: DS1-3-Insertionsstämme exprimieren in vermutlich allen Zellen des Bauchmarks LacZ. **D, D'**: Die Zellen des Zellstammbaums NB7-3 (weiß umrandete Zellen) weisen eine relative starke LacZ-Expression auf.

### 3.6.4 DS2-Insertionsstämme exprimieren LacZ vorwiegend im Gehirn und im PNS

Das DS2-Fragment umfasst 3,9kb und überlappt mit DS1 um 139bp. Es wurden insgesamt sieben Fliegenstämme generiert, die dieses Fragment integriert hatten (Abb. 3.18). Die Analysen wurden an den Stämmen DS2 T2 und DS2 T7 durchgeführt, da sie eine starke Expression von LacZ aufwiesen.

LacZ-Expression im Gehirn kann mittels einer Fluoreszenz-Antikörperfärbung gegen  $\beta$ -Gal im Stadium 9 nachgewiesen werden. Alle LacZ-positiven Zellen exprimieren Hb, wenn auch mitunter recht schwach (Daten nicht gezeigt). Mittels einer nicht fluoreszierenden  $\alpha$ - $\beta$ -Gal Antikörperfärbung zeigt sich erstmals LacZ-Expression am Ende des Stadiums 10 bzw. zu Beginn des Stadiums 11 im Gehirn (Abb. 3.22 A, A'). Im Stadium 11 konzentrieren sich die LacZ-positiven Zellen vor allem im Bereich des Mandibularsegments. Weiterhin kann LacZ im labralen und im ocularen Anteil des Protocerebrums, im Deuterocephalum, sowie im posterioren Bereich des Labrums detektiert werden (Abb. 3.23 A, B). Viele der LacZ-positiven Zellen exprimieren ebenfalls Hb (Abb. 3.23 B). Im Verlauf der Embryonalentwicklung nimmt die Anzahl der LacZ-positiven Zellen im Gehirn zu (Abb. 3.22 B, B'), jedoch sind diese Zellen dann oftmals Hb-negativ (Daten nicht gezeigt).

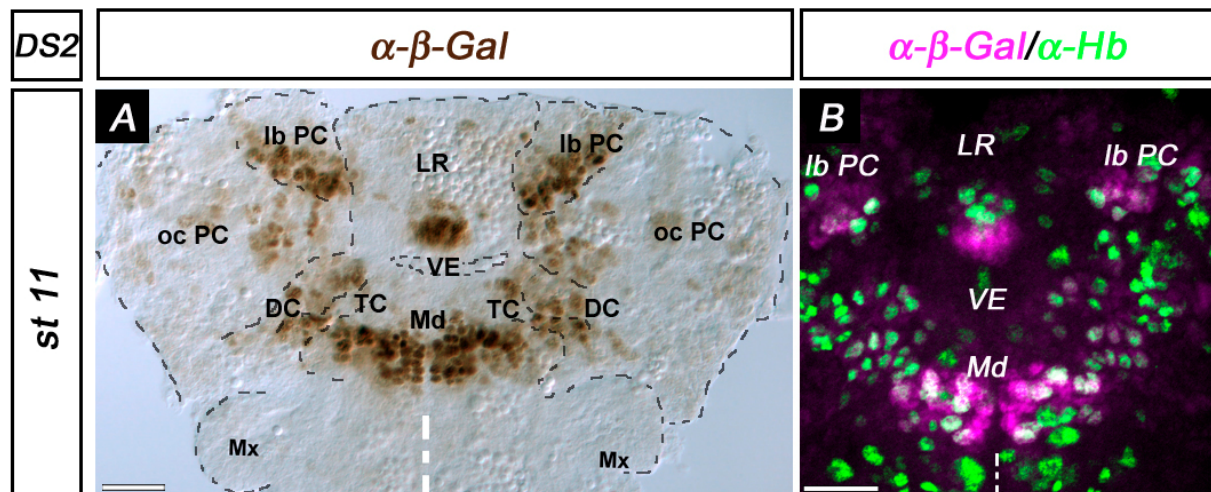
Im Bauchmark gibt es nur wenige Zellen, die eine starke LacZ-Expression aufweisen. So können im Stadium 14 nur zwei mediodorsal gelegene Zellen pro Segment detektiert werden, die eindeutig LacZ exprimieren. Diese Zellen sind Hb-positiv (Abb. 3.24 B, B'). In den dorsalen Gliazellen kann mitunter auch eine sehr schwache LacZ-Expression beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Eine größere Anzahl LacZ-positiver Zellen findet sich im PNS, diese Zellen exprimieren häufig auch Hb (Abb. 3.24 B, B').



**Abb. 3.22: DS2-Insertionsstämme exprimieren LacZ vorwiegend im Gehirn**

Antikörperfärbung gegen β-Gal an Embryonen des Stammes DS1 T7. Die linke Spalte zeigt die Lateralansicht und die rechte Spalte die Ventralansicht der Embryonen. Anterior ist links. Balken: 100µm.

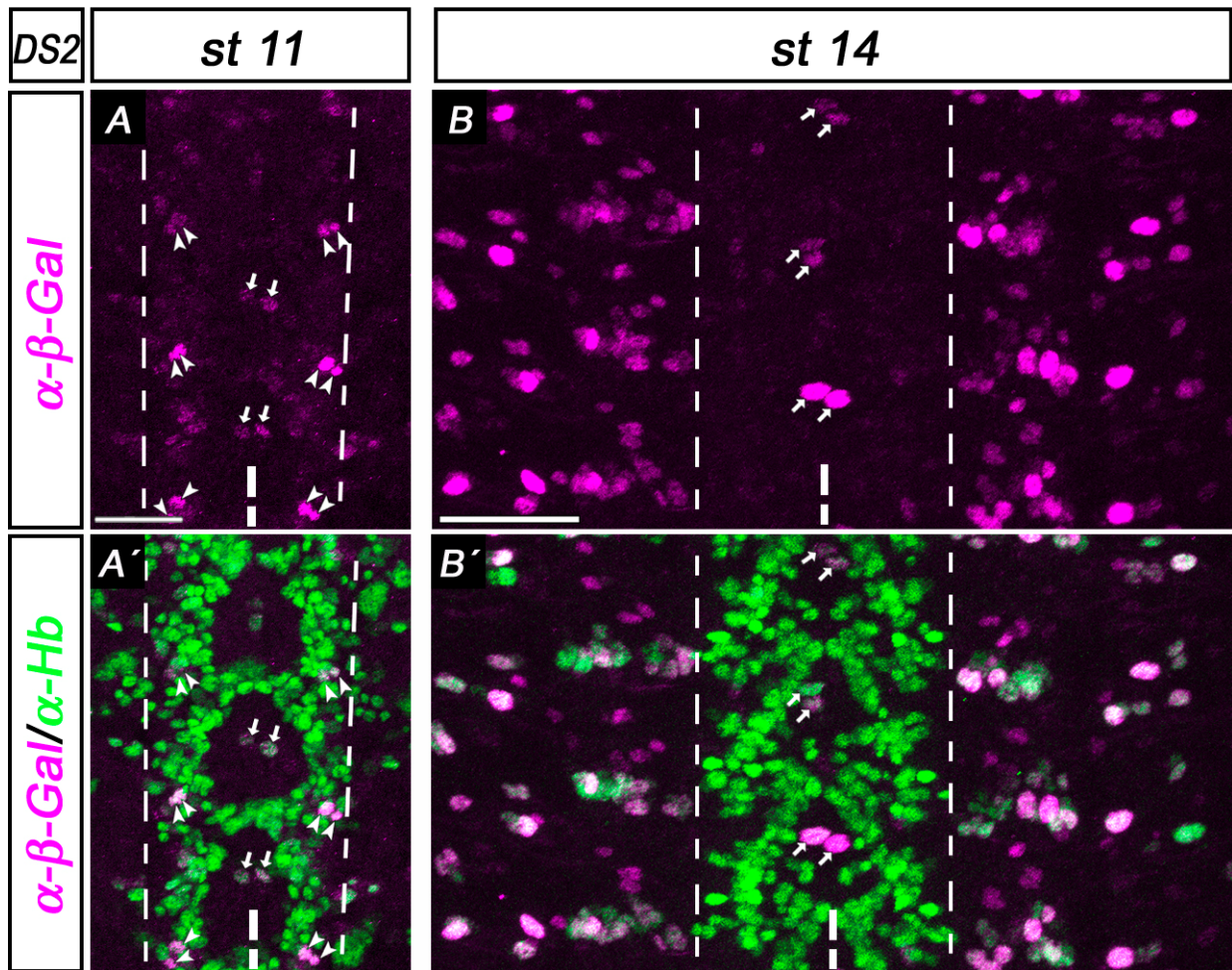
**A, A'**: Im frühen Stadium 11 kann mit einer nicht fluoreszierenden Färbung erstmals LacZ-Expression im Gehirn nachgewiesen werden. Im Bauchmark finden sich keine LacZ-positiven Zellen. **B, B'**: Im Stadium 14 zeigt sich eine starke Expression von LacZ im Gehirn, wohingegen nur wenige Zellen im Bauchmark LacZ exprimieren. Einige Zellen im PNS sind ebenfalls β-Gal-positiv.



**Abb. 3.23: Übersicht der LacZ-positiven Gehirnbereiche in DS2-Insertionsstämmen**

Antikörperfärbung gegen β-Gal (A, braun und B, magenta) und Hb (B, grün) an Embryonen des DS2-Insertionsstammes T2 im Stadium 11. Anterior ist oben, die gestrichelte weiße Linie repräsentiert die Mittellinie. Die graue gestrichelte Linie umrandet die jeweiligen Anteile des Kopfbereichs. Balken 40 µm. Mx: Maxillarsegment, Md: Mandibularsegment. Tc: Tritocerebrum, DC: Deutocerebrum, VE: Vorderdarmepithel, oc PC: ocularer Anteil des Protocerebrums, Ib PC: labraler Anteil des Protocerebrums, LR: Labrum.

**A**: Im Mandibularsegment finden sich die meisten LacZ-positiven Zellen. Des Weiteren wird LacZ im okularen, im labralen Protocerebrum, im Deutocerebrum, sowie im posterioren Bereich des Labrums exprimiert. **B**: Fast alle Hb-positiven Zellen in diesen Regionen sind ebenfalls LacZ-positiv.

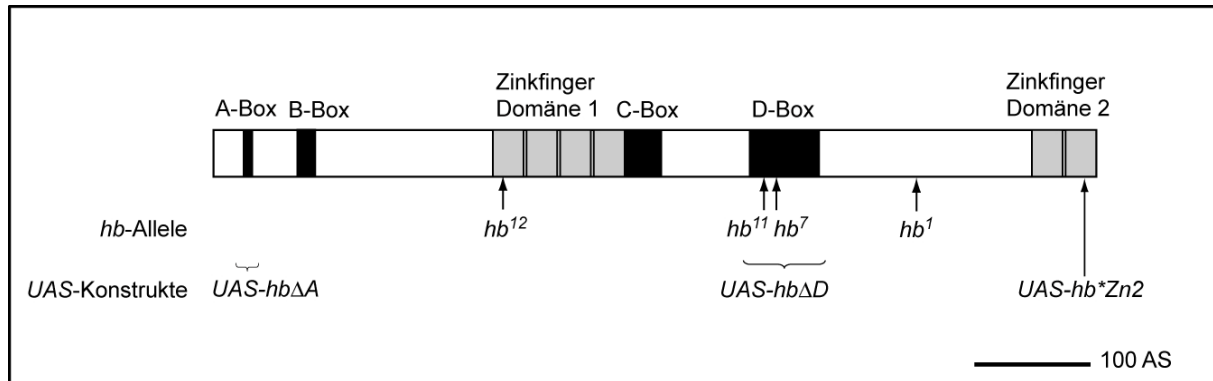


**Abb. 3.24: DS2-Insertionsstämme exprimieren LacZ nur in wenigen Zellen des Bauchmarks**

Antikörperfärbung gegen  $\beta$ -Gal (magenta) und Hb (grün) an Embryonen des DS2-Insertionsstammes T2. Dargestellt sind jeweils drei Segmente. Anterior ist oben. Dünn gestrichelte Linie markieren die Grenzen des Bauchmarks, dick gestrichelte Linien zeigen den Verlauf der Mittellinie an. Balken: 40  $\mu$ m.

**A, A'**: Im Stadium 11 findet sich in einigen Zellen des Bauchmarks eine meist schwache LacZ-Expression. Alle LacZ-positiven Zellen sind auch Hb-positiv. Zwei lateral im Hemisegment gelegene Zellen exprimieren am stärksten LacZ (Pfeilköpfe). **B, B'**: Im Stadium 14 exprimieren nur zwei mediodorsal im Hemisegment lokalisierte Zellen eindeutig LacZ (Pfeile). Diese Zellen sind schon im Stadium 11 detektierbar (Pfeile in A) und exprimieren Hb (Pfeile in B'). Im PNS gibt es viele LacZ-positive Zellen, die oft auch Hb exprimieren.

### 3.7 Funktionsanalyse einzelner Domänen von Hunchback im embryonalen ventralen Nervensystem



**Abb. 3.25: Lage der evolutiv konservierten Regionen des Hunchback-Proteins sowie der analysierten *hb*-Allele und *hb*-Varianten**

Graue Kästen stellen die entwicklungsgeschichtlich konservierten Zinkfinger dar, schwarze Kästen repräsentieren die konservierten Boxen. Pfeile an den *hb*-Allelen zeigen die Position der Stop-Codons dieser Allele an. Der Pfeil am UAS-Konstrukt *UAS-hb\*Zn2* deutet auf die Position, an der ein Cystein gegen ein Alanin ausgetauscht worden ist. Klammern umfassen jeweils den Bereich, der in *UAS-hbΔA* und *UAS-hbΔD* deletiert wurde. Abbildung verändert nach Hülkamp et al. (1994).

Neben der Regulation war auch die Funktionsweise von Hb Gegenstand dieser Arbeit. *hb* kodiert für einen Zinkfinger-Transkriptionsfaktor mit Zinkfingern des Typs C2H2 (Tautz et al., 1987). Das 758 Aminosäuren große Protein besitzt zwei Zinkfinger-Domänen. Die eine Domäne setzt sich aus vier Zinkfingern zusammen und umfasst die Aminosäuren 240-349. Die zweite Domäne erstreckt sich am C-Terminus über die Aminosäuren 705-757 und verfügt über zwei Zinkfinger (Abb. 3.25). Zusammensetzung und Lage der beiden Domänen sind typisch für Proteine der Ikaros-Familie, weshalb Hb als strukturelles Homolog der Ikaros-Proteine angesehen wird (Georgopoulos et al., 1992; McCarty et al., 2003). Ein Sequenzvergleich von *hb* in verschiedenen Spezies hat gezeigt, dass die beiden Zinkfinger-Domänen evolutiv konserviert sind (Sommer und Tautz, 1991; Sommer et al., 1992; Treier et al., 1989). Darüber hinaus konnten vier weitere konservierte Domänen im Hb-Protein gefunden werden: Die nahe des N-Terminus gelegenen Boxen A und B (Aminosäuren 25-30 bzw. 66-81; Tautz et al., 1987), sowie die C- und D-Box, die zwischen den beiden Zinkfinger-Domänen liegen und von den Aminosäuren 350-380 bzw. 466-522 gebildet werden (Sommer et al., 1992; Abb.

3.25). Die Funktion einzelner Domänen im Kontext der Wirkungsweise von Hb als Gap-Gen wurde bereits eingehend charakterisiert (Hülkamp et al., 1994; Kehle et al., 1998). Bislang liegen jedoch noch keine Publikationen über die Funktion bestimmter Domänen von Hb im NS vor.

Hb hat im NS mindestens zwei, voneinander zu trennende Funktionen. Zum einem spezifiziert *hb* die früh geborenen Nachkommen von NB (Isshiki et al., 2001; Novotny et al., 2002), zum anderen ist *hb* notwendig, um den NB die Kompetenz zu verleihen, früh geborene Nachkommen zu generieren (Carr et al., 2004; Isshiki und Doe, 2004; Pearson und Doe, 2003). Isshiki et al. (2001) stellten fest, dass eine Überexpression von *hb* im NB7-1 zu einer Überproduktion von U1-Neuronen (Nachkommen der ersten GMZ) auf Kosten von U-Neuronen mit „spätem“ Schicksal führt. 2003 konnten Pearson und Doe zeigen, dass die Kompetenz des NB, Nachkommen mit „frühen“ Schicksal zu produzieren, über die Zeit abnimmt. Wurde bspw. *hb* im NB7-1 überexprimiert, nachdem er die fünfte GMZ generiert hatte, so war der NB nicht mehr in der Lage, ektopische U1-Neurone zu generieren. Mit der Zeit verliert der NB also die Fähigkeit auf Hb zu reagieren.

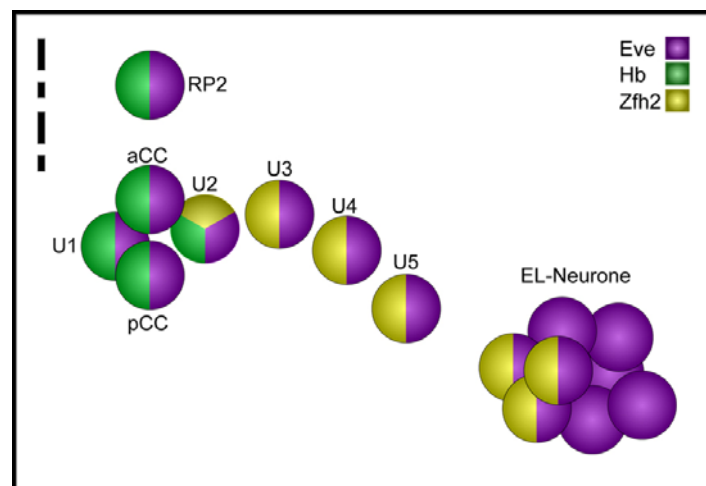
Es bieten sich zwei Ansätze an, um eine funktionelle Analyse von Domänen durchzuführen. Zum einem können molekular charakterisierte mutante *hb*-Allele analysiert werden. Ein zweiter Ansatz ist die Überexpression von *hb*-Varianten, bei denen einzelne Domänen mutiert bzw. deletiert worden sind.

### 3.7.1 Analyse der Even skipped-positiven Zellen in mutanten *hb*-Allelen

Zur Untersuchung von *hb*-Mutanten wurden Allele verwendet, die Stop-Codons in der D-Box bzw. vor der C-terminalen Zinkfingerdomäne aufweisen. In diesen Allelen sind große Teile des Proteins noch enthalten, damit erhöht sich die Wahrscheinlichkeit, dass eventuell auftretende Phänotypen auf das Fehlen dieser Domänen zurückzuführen sind. Es wurden die *hb*-Allele *hb*<sup>1</sup>, *hb*<sup>7</sup> und *hb*<sup>11</sup> untersucht. *hb*<sup>1</sup> (entspricht *hb*<sup>III</sup>) weist ein Stop-Codon an Aminosäureposition 608 auf. In diesem Protein fehlen die terminalen Zinkfinger und etwa 100 Aminosäuren der nicht konservierten C-terminalen Region. Das *hb*<sup>7</sup>-Allel (entspricht *hb*<sup>9k57</sup>) hat ein Stop-Codon an der Aminosäure-Position 487. In diesem Allel fehlen ein großer Teil der D-Box sowie die terminale Zinkfingerdomäne. *hb*<sup>11</sup> (entspricht *hb*<sup>14C</sup>) besitzt ein Stop-Codon an Aminosäure-Position 477, ist also 10 Aminosäuren kürzer als *hb*<sup>7</sup>.

Gut untersucht sind die Auswirkungen des Fehlens von Hb auf die früh geborenen, Eve-positiven Neurone (Isshiki et al., 2001; Novotny et al., 2002). Diese Untersuchungen wurden als Grundlage der in dieser Arbeit analysierten *hb*-mutanten Allele gewählt. Eve wird in Nachkommen der Neuroblasten NB4-2, NB1-1, NB7-1 und NB3-3 exprimiert. Die Eve-positiven Zellen können anhand ihrer Lage identifiziert werden. Bei diesen Zellen handelt es sich um RP2, aCC, pCC, die U-Neurone und die Eve-lateralen Zellen (Broadus et al., 1995). RP2 ist die Tochterzelle der GMZ4-2a (Doe, 1992; Patel et al., 1992). Das Motorneuron aCC und das Interneuron pCC entstehen aus der GMZ1-1a (Broadus et al., 1995). Die U-Neurone sind die Nachkommen der ersten fünf GMZ des NB7-1 und werden in der Reihenfolge ihrer Geburt U1-U5 genannt (Pearson und Doe, 2003). RP2, aCC, pCC sowie U1 und U2 sind im WT Hb-positiv (Isshiki et al., 2001; Novotny et al., 2002; Abb. 3.26).

Vom NB3-3 stammen die Eve-lateralen Zellen ab (Higashijima et al., 1996; Schmidt et al., 1997). Sie wurden bei der Analyse nicht berücksichtigt, da sie als Nachkommen spät geborener GMZ Hb-negativ sind.



**Abb. 3.26: Schematische Darstellung der Even skipped-positiven Zellen**

Dargestellt ist die Lage der Eve-positiven Neurone im Stadium 14 in einem Hemineuromer eines wildtypischen Embryos. Der Farb-Code zeigt die Expression der in der Analyse verwendeten Marker. Anterior ist oben, der Verlauf der Mittellinie wird durch die gestrichelte Linie angedeutet.

In den Arbeiten von Isshiki et al. (2001) und Novotny et al. (2002) wurde das Allel *hb*<sup>12</sup> (entspricht *hb*<sup>14F</sup>) verwendet. *hb*<sup>12</sup> ist ein amorphes Allel und hat ein Stop-Codon an der Aminosäure-Position 256. Dies hat ein Fehlen des Bereiches ab dem ersten Zinkfinger zur Folge (Hülkamp et al., 1994). In *hb*<sup>12</sup>-Mutanten fehlen U1 und U2,

wohingegen die spät geborenen Neurone U3, U4 und U5 nicht beeinträchtigt sind (Isshiki et al., 2001; Novotny et al., 2002). Zudem konnte gezeigt werden, dass *hb* für die Spezifizierung von RP2, aCC und pCC notwendig ist. Oft fehlten diese Neurone in *hb<sup>12</sup>*-Mutanten (Novotny et al., 2002). In den Fällen, in denen sie vorhanden waren, exprimierten sie *Zfh-2*, einen Marker spät geborener Zellen (Isshiki et al., 2001).

Bei der Analyse der *hb*-mutanten Allele wurde die Anzahl und Lage von RP2, aCC, pCC und der U-Neurone untersucht. Um zu bestimmen, inwiefern die verkürzten Hb-Proteine in der Lage sind ein „spätes“ Schicksal zu unterdrücken, wurde die Expression von *Zfh-2* analysiert. Dieser Marker ist typisch für spät geborene Neurone (Isshiki et al., 2001). Weiterhin wurden Antikörperfärbungen gegen Hb durchgeführt, um die Expression und Stabilität des mutanten Hb-Proteins zu bestimmen. Der Antikörper gegen Hb ist polyklonal und kann somit auch verkürzte Proteine detektieren.

In *hb<sup>1</sup>*-mutanten Embryonen zeigen sich kaum Unterschiede zum WT. Die U-Neurone, RP2, aCC und pCC weisen ein wildtypisches Expressionsmuster von Hb und *Zfh-2* auf. Ein Verlust von RP2, aCC und pCC sowie den U-Neuronen kann nicht festgestellt werden (Abb. 3.27 D-F'). Bisweilen kann lediglich eine Veränderung der Position von RP2 und U3 detektiert werden. In 8,3% der Hemisegmente befindet sich U3 medial von aCC und pCC. RP2 ist in 14,6% der untersuchten Hemisegmente verschoben (n=48 Hemisegmente).

Ein Stop-Codon in der D-Box hat gravierende Auswirkungen auf die früh geborenen Eve-positiven Zellen. Ähnlich wie in *hb<sup>12</sup>*-Mutanten können bei *hb<sup>7</sup>*-Mutanten in 81% der analysierten Hemisegmente (n=43 Hemisegmente) nur drei U-Neurone detektiert werden. Alle verbliebenen U-Neurone weisen eine starke *Zfh-2*-Expression auf, die typisch für U3, U4 und U5 ist (Abb. 3.27 H). Dies lässt zunächst vermuten, dass U1 und U2 fehlen. Allerdings exprimiert in 29% der Fälle eins der U-Neurone Hb. Im WT findet sich Hb nur in U1 und U2. Dies weist darauf hin, dass mindestens eins der U-Neurone mit normalerweise „früherem“ Schicksal in *hb<sup>7</sup>*-Mutanten geboren wird.

Ein Verlust von aCC und pCC kann nicht festgestellt werden, lediglich RP2 fehlt in zwei von 43 Hemisegmenten. aCC, pCC und RP2 exprimieren immer Hb (Abb. 3.27 G, G''). Offensichtlich ist *Hb<sup>7</sup>* aber nicht in der Lage, *Zfh-2* zu unterdrücken, denn in nahezu allen Fällen sind aCC, pCC und RP2 *Zfh-2*-positiv, was im WT nie der Fall ist

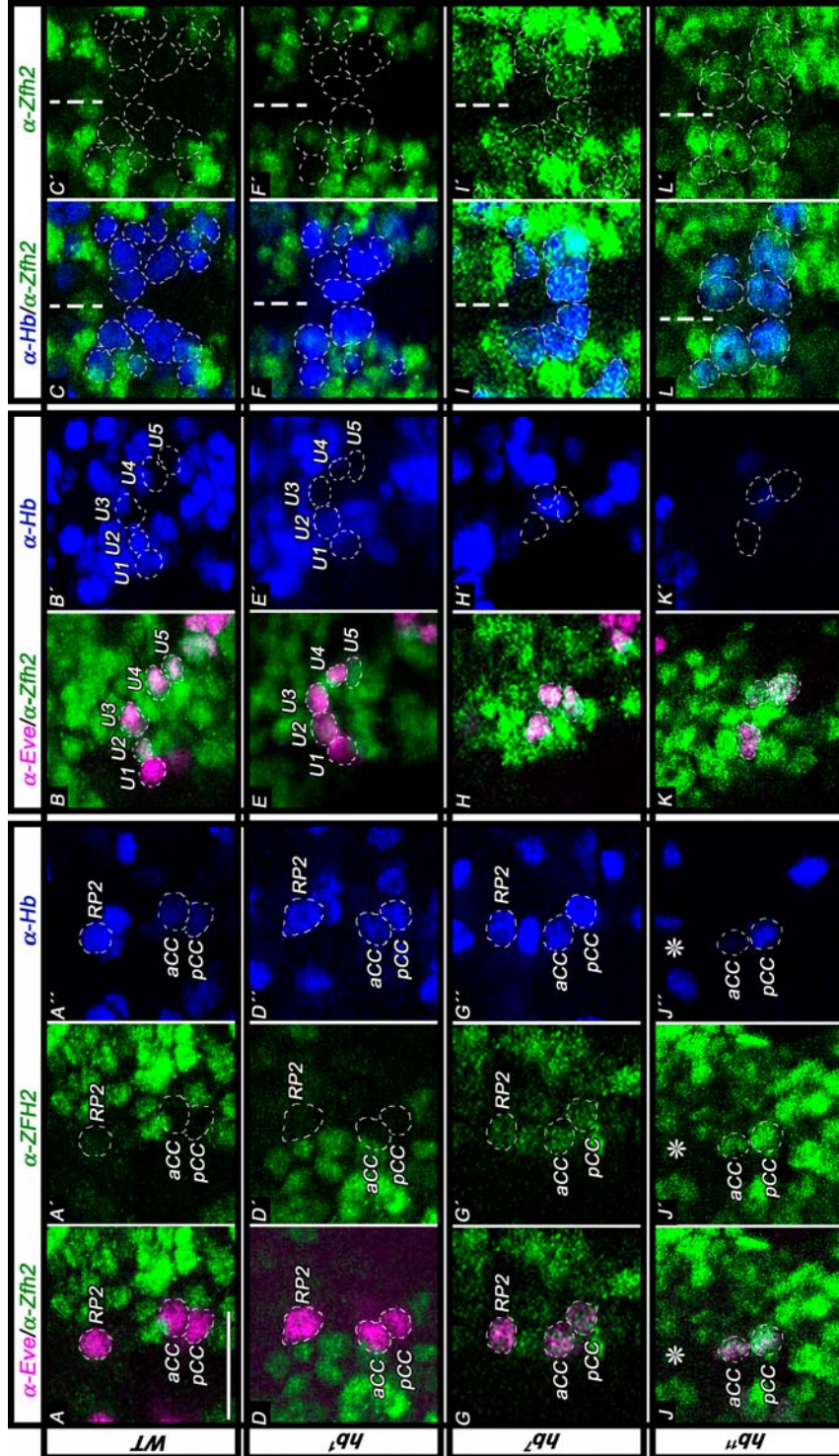
(vgl. Abb. 3.27 A' und Abb. 3.27 G'). Eine Derepression von Zfh-2 kann zudem in den meisten Hb-positiven Zellen festgestellt werden (Abb. 3. 27 I, I').

In *hb<sup>11</sup>*-Mutanten sind die Eve-positiven Zellen noch stärker affiziert als in *hb<sup>7</sup>*-Mutanten. So können die Zellen nur in wenigen Fällen anhand ihrer Lage identifiziert werden, d.h. eine Unterscheidung von RP2, aCC, pCC und den U-Neuronen ist kaum möglich. In den meisten Hemisegmenten werden vier oder fünf Zellen gezählt (n=58 Hemisegmente), von denen ein bis zwei Zellen Hb exprimieren (Abb. 3.27 J, J', K, K'). Geht man davon aus, dass U3, U4 und U5, als Nachkommen später geborener GMZ nicht affiziert sind, so kann dies nur bedeuten, dass der Verlust an RP2, aCC und pCC stark zugenommen hat. Nahezu alle verbliebenen Eve-positiven Neurone exprimieren Zfh-2 (Abb. 3.27 J', K). Wiederum kann eine generelle Derepression von Zfh-2 festgestellt werden (Abb. 3.27 L, L').

	U-Neurone	Hb <sup>+</sup> U-Neurone	Zfh-2 <sup>+</sup> U-Neurone	Eve <sup>+</sup>	Eve <sup>+</sup> /Hb <sup>+</sup> /Zfh-2 <sup>+</sup>	Zfh-2 <sup>+</sup> /Eve <sup>+</sup>	n
<b>WT</b>	5	2	4	8	1	4	
<b>hb<sup>1</sup></b>	5	2	4	8	1	4	48
<b>hb<sup>7</sup></b>	3,07	0,33	3,07	6,07	3,33	6,02	43
<b>hb<sup>11</sup></b>	nicht feststellbar	nicht feststellbar	nicht feststellbar	4,12	1,43	4,12	58

**Tabelle 3-1: Übersicht über Anzahl und Expressionsmuster der Even skipped-positiven Nachkommen von NB4-2, NB1-1 und NB7-1**

n= Anzahl der Hemisegmente, + = positiv



**Abb. 3.27: In *hb*-Mutanten mit Stop-Codons in der D-Box werden die früh geborenen Even skipped-positiven Zellen nicht korrekt spezifiziert**

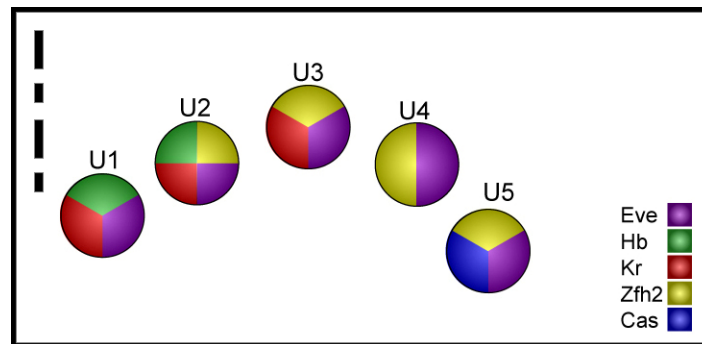
Antikörperfärbung gegen Eve (magenta), Zfh-2 (grün) und Hb (blau) an Embryonen im Stadium 14. Anterior ist oben, die Mittellinie befindet sich links bzw. ist mit gestrichelter Linie angedeutet. Balken: 20µm. **A-C**: WT. **A**: RP2, aCC und pCC sind Zfh-2-negativ (A') und Hb-positiv (A''). **B**: U1 ist als einziges der fünf U-Neurone Zfh-2-negativ. Hb wird in U1 und U2 exprimiert (B'). **C**: Die medio-dorsal gelegenen Hb-positiven Zellen sind Zfh-2-negativ. **D-F**: *hb<sup>1</sup>*-Mutanten. In den meisten Fällen haben RP2, aCC, pCC sowie die U-Neurone eine wildtypische Lage und weisen für die untersuchten Marker eine wildtypische Expression auf. **G-I**: *hb<sup>7</sup>*-Mutanten. **G**: RP2, aCC und pCC exprimieren stark Zfh-2 und sind meist Hb-negativ (H'). **H**: In den meisten Hemisegmenten ist die Zahl der U-Neurone auf drei reduziert, diese exprimieren stark Zfh-2 und sind meist Hb-negativ (H'). **I**: Die Zahl der Hb-positiven Zellen in medio-dorsaler Lage hat abgenommen. Diese Zellen sind Zfh-2-positiv (I'). **J-L**: *hb<sup>11</sup>*-Mutanten. RP2 und/oder aCC und/oder pCC fehlen häufig (J), die verbleibenden RP2-, aCC- und pCC-Neurone exprimieren immer Zfh-2 (J'). **K**: Die verbliebenen U-Neurone sind Zfh-2 positiv und meist Hb-negativ (K'). **L**: Im medio-dorsalen Bereich finden sich deutlich weniger Hb-positive Zellen. Alle medio-dorsal gelegenen Hb-positiven Zellen sind Zfh-2-positiv (L').

### 3.7.2 Auswirkung der Überexpression verschiedener *hb*-Varianten auf die U-Neurone des Zellstammbaums NB7-1

Isshiki et al. (2001) sowie Pearson und Doe (2003) konnten bereits zeigen, dass eine Überexpression von *hb* im NB7-1 zu einer Vermehrung von U-Neuronen mit „frühem“ Schicksal auf Kosten von U-Neuronen mit „spätem“ Schicksal führt. Ektopisches Hb ist ausreichend, um „frühes“ Zellschicksal zu induzieren. Um Hinweise auf die Funktion einzelner evolutiv konservierter Domänen des Hb-Protein zu erhalten, wurden *hb*-Varianten, in denen Domänen deletiert bzw. mutiert waren, im NB7-1 überexprimiert und auf die Induktion von U-Neuronen mit „frühem“ Schicksal getestet.

Dabei wurden die Auswirkungen der Überexpression von *UAS-hb $\Delta$ A*, *UAS-hb $\Delta$ D* und *UAS-hb\*Zn2* analysiert (Abb. 3.25). In *UAS-hb $\Delta$ A* fehlt die sechs Aminosäure große A-Box und acht angrenzende Aminosäuren. In *UAS-hb $\Delta$ D* wurde die 57 Aminosäure lange D-Box aus dem Hb-Protein eliminiert und im *UAS-hb\*Zn2* im zweiten Zinkfinger der C-terminalen Zinkfingerdomäne eine Punktmutation eingeführt (Abb. 7.6). Dies hat den Austausch eines Cysteins zu einem Alanin zur Folge. Um den Effekt der Überexpression dieser *hb*-Varianten im NB7-1 zu analysieren, wurden sie mit Hilfe von *en-GAL4* überexprimiert. *en-GAL4* exprimiert GAL4 schon im Neuroektoderm in den NB der Reihen 6 und 7 sowie im NB1-2 (Novotny et al., 2002). Die Analysen wurden im Stadium 14 durchgeführt.

Die Identität der U-Neurone wurde durch die Expression der Marker Eve, Hb, Kr, Zfh-2 und Castor (Cas) überprüft. Eve wird in allen U-Neuronen exprimiert und eignet daher als Marker zur Identifizierung dieser Zellen. U1 und U2 sind als früh geborene Neurone Hb-positiv. Kr wird in U1, U2 und U3 exprimiert. Zfh-2-Expression findet sich in U2-U5. Das einzig Cas-positive Neuron ist das letztgeborene U5-Neuron (Abb. 3.28, Abb. 3.30 B, B').

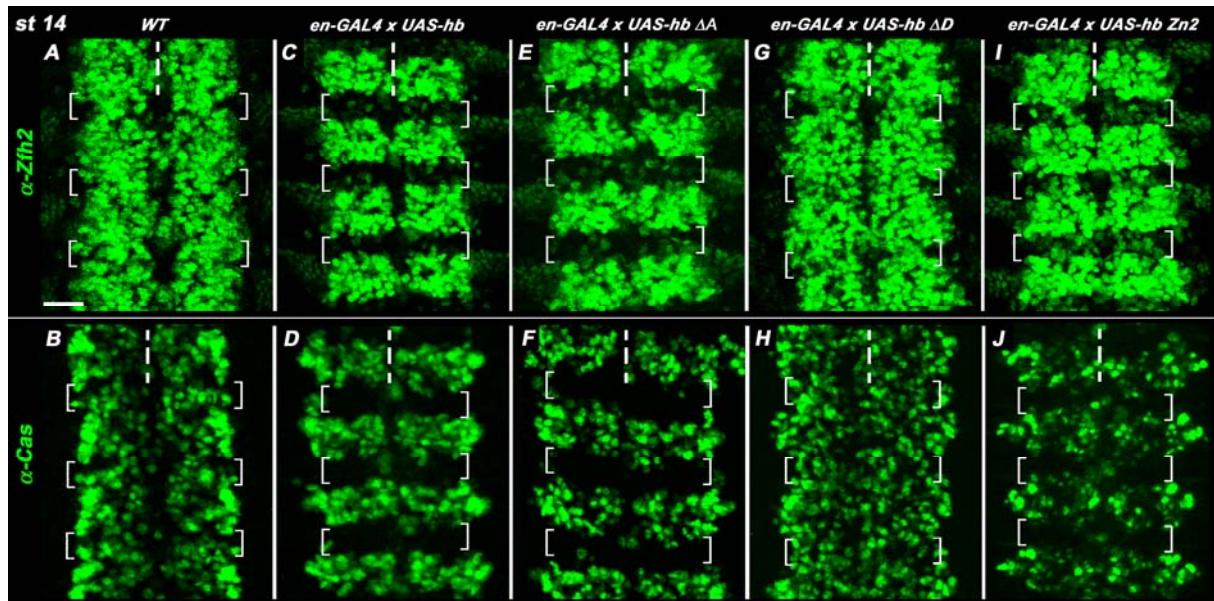


**Abb. 3.28: Schematische Darstellung der U-Neurone**

Dargestellt ist die Lage der U-Neurone im Stadium 14 in einem Hemineuromer eines wildtypischen Embryos. Der Farb-Code zeigt die Expression der in der Analyse verwendeten Marker an. Anterior ist oben, der Verlauf der Mittellinie wird durch die gestrichelte Linie angedeutet.

Eine Überexpression von wildtypischem *hb* via *en-GAL4* hat zur Folge, dass im gesamten En-positiven Bereich (diejenigen Zellen, in denen *hb* überexprimiert wird) die Expression von Zfh-2 und Cas unterdrückt ist (Abb. 3.29 C, D). Zfh-2 und Cas gelten als Marker spät geborener Zellen.

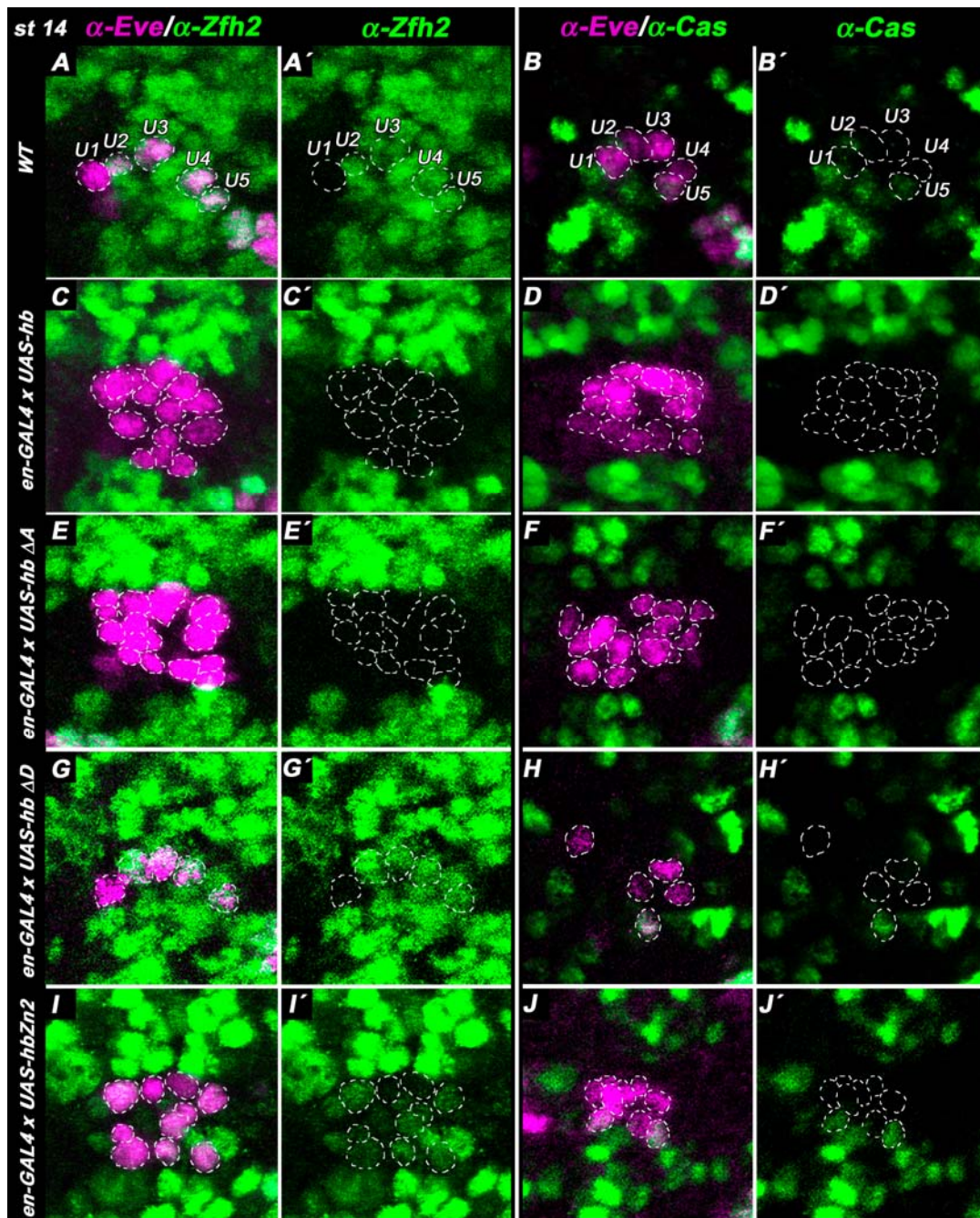
Die Anzahl der U-Neurone ist stark erhöht. Im Schnitt finden sich knapp 15 U-Neurone pro Hemisegment. In der Regel exprimieren diese U-Neurone weder Zfh-2 noch Cas (Abb. 3.30 C, D). Lediglich in jeweils einem Segment wird eine Zfh-2-positive Zelle sowie eine Cas-positive Zelle gezählt (n=58 bzw. 60 Hemisegmente). Dies deutet darauf hin, dass keine spät geborenen U-Neurone existieren und alle Zellen U1-Identität besitzen. Die Analyse der Kr-Expression ergibt hingegen im Durchschnitt 0,6 Kr-negative Zellen pro Hemisegment. Normalerweise sind U4 und U5 Kr-negativ. Dies lässt zunächst darauf schließen, dass mitunter durchaus U-Neurone mit „spätem“ Schicksal entstehen. Eine Analyse der Kr/Zfh-2 Expression zeigt, dass durchschnittlich in jedem Segment ein U-Neuron zu finden ist, das weder Kr- noch Zfh-2-positiv ist. Im WT existiert ein solches U-Neuron aber nicht.



**Abb. 3.29: Expression von Zfh-2 und Castor nach Überexpression verschiedener *hunchback*-Varianten**

Antikörperfärbung gegen Zfh-2 (grün, obere Reihe) und Cas (grün, untere Reihe) im WT und nach Überexpression verschiedener *hb*-Varianten im Stadium 14. Dargestellt sind jeweils vier Segmente. Die Klammern zeigen den En-positiven Bereich an, dort werden die *hb*-Varianten überexprimiert. Anterior ist oben, der Verlauf der Mittellinie ist durch die gestrichelte Linie angedeutet, Balken: 20µm.

**A, B:** Zfh-2- (A) und Cas-Expression (B) im WT. Zfh-2 und Cas werden in der Regel in spät geborenen Neuronen exprimiert. **C, D:** Eine Überexpression von wildtypischen *hb* via *En-GAL4* eliminiert die Zfh-2- (C) und Cas- (D) Expression im En-positiven Bereich. **E, F:** Nach Überexpression von *UAS-hbΔA* können kaum Zfh-2- und Cas-positive Zellen im En-positiven Bereich ausgemacht werden. **G, H:** Ektopische Expression von *UAS-hbΔD* kann nicht die Expression von Zfh-2 und Cas unterdrücken. **I, J:** Bei Überexpression von *UAS-hb\*Zn2* wird die Zfh-2- und Cas-Expression nicht vollständig unterdrückt.



**Abb. 3.30: Expression von Zfh-2 und Castor in den U-Neuronen nach Überexpression verschiedener *hunchback*-Varianten.**

Antikörperfärbung gegen den U-Neuronenmarker Eve (magenta) kombiniert mit einer Antikörperfärbung gegen Zfh-2 (grün, linke Spalte) bzw. gegen Cas (grün, rechte Spalte) an Embryonen des Stadium 14. Dargestellt sind jeweils die U-Neurone eines Hemisegments (weiß umrandete Zellen). Anterior ist oben, die Mittellinie befindet sich links. Balken: 20µm.

**A, B:** WT. Zfh-2 wird in allen U-Neuronen mit Ausnahme von U1 exprimiert (A'). U5 ist als einziges U-Neuron Cas-positiv (B'). **C, D:** *en-GAL4 X UAS-hb*. Die U-Neurone exprimieren keine Marker spät geborener Zellen. Alle U-Neurone sind Zfh-2- (C') und Cas-negativ (D'). Die Zahl der U-Neurone ist stark erhöht. **E, F:** *en-GAL4 X UAS-hbΔA*. Wie bei der Überexpression von wildtypischen *hb* finden sich auch hier viele ektopische U-Neurone. In der Regel sind alle U-Neurone Zfh-2- (E') und Cas-negativ (F'). **G, H:** *en-GAL4 X UAS-hbΔD*: Es werden kaum ektopische U-Neurone generiert. Zudem werden Marker spät geborener U-Neurone exprimiert: Es gibt in der Regel nur ein Zfh-2-negatives U-Neuron (G'). Cas-Expression findet sich ebenfalls in einem U-Neuron pro Hemisegment (H'). **I, J:** *en-GAL4 X UAS-hb\*Zn2*: Die Zahl der U-Neurone ist erhöht. Allerdings findet sich in den meisten U-Neuronen eine schwache Zfh-2-Expression (I'). Ebenso kann Cas-Expression festgestellt werden, mitunter sogar in zwei U-Neuronen eines Hemineuromers.

Eine Überexpression von *UAS-hb $\Delta$ A* zeigt keine großen Unterschiede zur Überexpression von wildtypischen *hb*. Die Expression von *Zfh-2* und *Cas* ist in den En-positiven Zellen weitestgehend unterdrückt (Abb. 3.29 E, F). Man findet im Schnitt 12,45 U-Neurone pro Hemisegment. Davon sind durchschnittlich 0,3 Zellen *Zfh-2*-positiv. Die Zahl der *Kr/Zfh-2*-doppelnegativen Zellen ist im Vergleich zur ektopischen Expression von wildtypischen *hb* nur leicht erhöht. Allerdings beträgt die Zahl der *Kr*-negativen Zellen 1,38 Zellen pro Hemisegment. U5-Neurone werden in der Regel nicht generiert. Lediglich in einem von 54 Hemisegmenten findet sich ein *Cas*-positives U-Neuron.

Deutliche Unterschiede zeigt hingegen die Überexpression von *UAS-hb $\Delta$ D*. Bereits bei einer oberflächlichen Betrachtung der Embryonen fällt auf, dass Marker spät geborener Zellen wie *Zfh-2* und *Cas* im En-positiven Streifen exprimiert werden (Abb. 3.29 G, H). Die Anzahl der U-Neurone ist im Vergleich zum WT nur leicht erhöht. Im Durchschnitt finden sich 5,3 U-Neurone pro Hemineuomer, wobei eins davon *Cas* exprimiert (Abb. 3.30 H, H') und zwei dieser Neurone sind *Kr*-negativ. Es werden also durchaus spät geborene U-Neurone generiert. Lediglich ein *Zfh-2*-negatives U-Neuron ist pro Hemineuomer auszumachen (Abb. 3.30 G, G'), das bedeutet, dass keine ektopischen U1-Neurone generiert werden. Die Anzahl der U-Neurone und die Expression der untersuchten Marker lassen demnach kaum einen Unterschied zum WT erkennen.

Die Überexpression von *UAS-hb\*Zn2* zeigt ebenfalls Abweichungen zur Überexpression von wildtypischen *hb*, wenn auch in einem weniger gravierenden Maße als die Überexpression von *UAS-hb $\Delta$ D*. Im En-positiven Streifen ist die Expression von *Zfh-2* und *Cas* nicht vollständig unterdrückt (Abb. 3.29 I, J). Pro Hemineuomer finden sich dennoch knapp neun U-Neurone. Allerdings sind nur zwei dieser U-Neurone *Zfh-2*-negativ (Abb. 3.30 I, I'), d.h., das nur ein zusätzliches U1-Neuron generiert wird. Häufig exprimieren die U-Neurone nur schwach *Zfh-2*, wie es im WT in U2-Neuronen beobachtet werden kann. Zwei der U-Neurone exprimieren kein *Kr* und 1,2 U-Neurone sind im Schnitt *Cas*-positiv.

	U-Neurone	Zfh-2 <sup>-</sup>	Kr <sup>-</sup>	Cas <sup>+</sup>	Kr <sup>-</sup> /Zfh-2 <sup>-</sup>
<b>WT</b>	5	1 (U1)	2 (U4+U5)	1 (U5)	0
<b>UAS-hb</b>	14,89 n=126	14,82 n=58	0,59 n=68	0,017 n=60	0,56 n=56
<b>UAS-hbΔA</b>	12,45 n=108	12,14 n=58	1,38 n=50	0,019 n=54	0,66 n=56
<b>UAS-hbΔD</b>	5,3 n=107	1,01 n=51	1,89 n=56	0,83 n=65	nicht analysiert
<b>UAS-hb*Zn2</b>	8,96 n=132	1,82 n=54	2,05 n=72	1,21 n=42	nicht analysiert

**Tabelle 3-2: Übersicht der Anzahl der U-Neurone und die Expression von Zfh-2, Krüppel und Castor nach Überexpression von *hunchback*-Varianten im NB7-1**

n= Anzahl der Hemisegmente, - = negativ, + = positiv

## 4 Diskussion

### 4.1 Regulation der *hunchback*-Expression in embryonalen Neuroblasten-Zellstammbäumen durch Seven-up und Prospero

#### 4.1.1 Seven-up schaltet *hunchback* in Neuroblasten ab und ermöglicht dessen Übergang zur nächsten temporalen Identität

Die Reihenfolge, in der GMZ geboren werden, wird durch die sequenzielle und transiente Expression von Transkriptionsfaktoren im NB festgelegt. Die jeweilige Kombination an exprimierten Transkriptionsfaktoren vererbt der NB bei der Teilung an die dabei entstehende GMZ, welche durch deren Aktivität zeitlich spezifiziert wird (Brody und Odenwald, 2000; Isshiki et al., 2001; Novotny et al., 2002).

Hb ist das erste Gen dieser Spezifizierungskaskade (Isshiki et al., 2001; Novotny et al., 2002). Damit der NB zur nächsten temporalen Identität übergehen kann, muss Hb abgeschaltet werden. Das Abschalten von Hb wird vor allem auf transkriptioneller Ebene erreicht (Grosskortenhaus et al., 2005). Folglich müssen auch ein oder mehrere Transkriptionsfaktoren existieren, die eine Transkription von *hb* beenden. Ein Funktionsverlust eines solchen Repressors sollte demnach zu einer verlängerten Hb-Expression in NB führen.

In *svp*-mutanten Embryonen konnten in den Zellstammbäumen NB7-3, NB6-4T, NB7-1 und NB2-4T mehr Hb-positive Zellen detektiert werden als in den entsprechenden Zellstammbäumen des WT. Die Anzahl der Hb-negativen Zellen in den analysierten Zellstammbäumen war nicht erhöht. Es ist daher unwahrscheinlich, dass die *svp*-Mutation eine verminderte Apoptose verursacht. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass ein Verlust von Svp zu einer aberranten Teilung von Hb-positiven GMZ und/oder deren Nachkommen führt. Verfolgt man aber die Expression von Hb während der frühen Entwicklung der Zellstammbäume NB7-3, NB6-4T und NB2-4T, so zeigt sich deutlich, dass die Hb-positive Phase des NB verlängert ist. Als Folge werden GMZ mit „früherem“ Schicksal generiert, wie es z.B. im NB7-1

beobachtet werden konnte. Diese Ergebnisse wurden von Kanai et al. (2005) bestätigt. Auch diese Arbeitsgruppe stellte in *svp*-Mutanten eine Vermehrung von Neuronen mit „frühem“ Schicksal fest einhergehend mit der Reduktion von Neuronen mit „spätem“ Schicksal in den Zellstammbäumen NB7-3 und NB7-1. Weiterhin zeigten Kanai et al., dass in *hb,svp*-Doppelmutanten, im Gegensatz zu *svp*-Mutanten, Neurone mit „spätem“ Schicksal generiert werden. Daraus kann geschlossen werden, dass Svp *hb* reprimiert, wodurch die Hb-bedingte Unterdrückung von „spätem“ Schicksal aufgehoben wird. Das heisst, Svp vermittelt das Umschalten zur nächsten temporalen Identität des NB.

In allen untersuchten NB-Zellstammbäumen wurde eine verlängerte Hb-Expression festgestellt, die eine Vermehrung von Zellen mit „frühem“ Schicksal auf Kosten normalerweise später geborener Zellen zur Folge hatte. Es ist daher davon auszugehen, dass es sich um ein generelles Prinzip der Regulation von *hb* im NS handelt.

#### **4.1.2 Die Aktivität von Seven-up ist Mitose-abhängig**

Eine Inhibition der Transition von der G2- zur M-Phase verhindert das Beenden der Hb-Expression in NB (Grosskortenhaus et al., 2005; Isshiki et al., 2001). Die repressorische Aktivität von Svp muss daher ebenfalls an die Mitose gekoppelt sein. Dies geschieht jedoch nicht auf Ebene der Transkription, denn die Transkription von *svp* beginnt bevor der NB in die entscheidende M-Phase eintritt. In *string*-mutanten Embryonen, in denen der G2-M-Übergang blockiert ist, wird *svp*-mRNA in hoher Konzentration transkribiert. Es lassen sich jedoch nur geringe Mengen an Protein nachweisen. Offenbar ist die Translation von *svp* gehemmt, da sich die mRNA im Kern befindet und nicht ins Zytoplasma transportiert wird, wo sie translatiert werden kann. Wird in *string*-mutanten Embryonen *string* via Hitzeschock exprimiert, erfolgt der Übergang der NB zur M-Phase. Nach dieser Teilung ist die *svp*-mRNA im Cytoplasma der beiden Tochterzellen lokalisiert (persönliche Mitteilung Joachim Urban). Dieses Experiment zeigt, dass die Translokation der *svp*-mRNA Mitose-abhängig ist.

Auch im WT kommt es vor der entscheidenden Mitose zu einer Anhäufung von *svp*-Transkript im Zellkern. Eine Mitose-gekoppelte Translationskontrolle hat den Vorteil,

dass das angehäuften Transkript sofort nach erfolgter Zellteilung translatiert werden kann und so eine rasche Abschaltung von *hb* im NB ermöglicht wird.

Dieser Kontrollmechanismus scheint nur von jener Mitose abhängig zu sein, die direkt auf den Start der *svp*-Transkription folgt, denn im NB7-3 konnte eine nukleäre Lokalisation des *svp*-Transkripts vor der nächsten Mitose nicht mehr beobachtet werden.

Wie könnte dieser posttranskriptionelle Kontrollmechanismus beschaffen sein? Posttranskriptionelle Regulation wird durch RNA-bindende Proteine und RNAs vermittelt. Zu den RNA-bindenden RNAs zählen die microRNAs (miRNAs). Durch imperfekte Bindung an den 3'-UTR des Transkripts können sie effizient die Translation von mRNAs inhibieren (Tomari und Zamore, 2005). Vor kurzem ist *svp* als ein potentielles Zielgen von miRNAs identifiziert worden (Enright et al., 2003). Es ist jedoch unwahrscheinlich, dass miRNAs in die Mitose-abhängige Translationskontrolle von *svp* involviert sind, da sie erst an die mRNA binden nachdem diese ins Cytoplasma transportiert worden ist (Ketting und Plasterk, 2004; Olsen und Ambros, 1999).

RNA-bindende Proteine (RBPs) erkennen spezifische Sequenzen im 5'- und 3'-UTR des Transkripts. RBPs kontrollieren das Prozessieren, Transportieren, Lokalisieren sowie die Stabilität und die Translation des Transkripts (Hieronymus und Silver, 2004; Keene und Lager, 2005; Orphanides und Reinberg, 2002). Durch die Bindung von RBPs an diese Sequenzen entstehen messenger-ribonucleoprotein particles (mRNPs). Der Transport von mRNPs ins Cytoplasma erfolgt durch die Kernporen, wozu exportregulierende RBPs benötigt werden (für eine Übersicht: Mata et al., 2005; Moore, 2005). Ein Fehlen von RBPs, die für das Prozessieren und den Export verantwortlich sind, führt zu einer Akkumulation des Transkript im Zellkern (Brodsky und Silver, 2000; Hodge et al., 1999; Huang und Carmichael, 1996; Long et al., 1995). Dies lässt vermuten, dass die Expression bzw. die nukleäre Lokalisation eines RBPs, das für das Prozessieren oder den Export der *svp*-mRNA zuständig ist, von einem M- oder G1-Phase-aktiven Faktor reguliert wird. Möglicherweise spielt aber auch der Phosphorylierungszustand von RBPs eine Rolle. So konnte gezeigt werden, dass das RBP Npl3p, welches in *S. cerevisiae* den Export von mRNA ins Cytoplasma reguliert, phosphoryliert vorliegen muss, damit ein effizienter Transport vonstatten gehen kann (Gilbert und Guthrie, 2004; Huang und Steitz, 2005).

Das Prozessieren der *svp*-prä-mRNA scheint allerdings Mitose-unabhängig zu sein. Dies wurde durch eine *in situ*-Hybridisierung mit einer intronspezifischen Sonde gegen *svp* festgestellt. Solche Sonden binden ausschließlich an die prä-mRNA. Für gewöhnlich wird die prä-mRNA schnell prozessiert, weswegen sie in der Regel nur am Transkriptionsort des entsprechenden Gens zu detektieren ist. Eine intronspezifische Sonde gibt daher ein Signal an zwei Punkten im Zellkern, welches die Transkriptionsorte an den beiden Chromosomen anzeigt. Sofern das *svp*-Transkript vor der Mitose nicht gespleisst worden ist, sollte diese Intronsonde den kompletten Zellkern markieren. Dies war aber nicht der Fall, denn es wurde ein punktuell Signal an den beiden Transkriptionsorten detektiert (persönliche Mitteilung Joachim Urban). Daher kann die Suche auf exportregulierende Proteine eingegrenzt werden.

#### **4.1.3 Die Transkription von *seven-up* ist Zellzyklus-unabhängig**

Durch die Expression von Svp wird festgelegt, nach welcher Zellteilung Hb im NB abgeschaltet wird. Wie könnte die Svp-Expression reguliert sein? In einer Gruppe von NB kann das *svp*-Transkript schon vor der ersten Teilung detektiert werden, wie bspw. im NB6-4T und im NB7-3. Hier wäre es möglich, dass proneurale Gene den Start der *svp*-Transkription steuern, wie das schon für die *svp*-Expression in den Malphigischen Gefäßen gezeigt wurde (Sudarsan et al., 2002). Dementsprechend konnte beobachtet werden, dass in einigen NB die *svp*-Transkription schon im proneuralen Cluster im Neuroektoderm startet (Broadus und Doe, 1995).

In einer zweiten Gruppe von NB wird *svp* erst kurz vor der zweiten Teilung transkribiert. Zu diesen NB zählen der NB7-1 und der NB2-4T. Die Annahme liegt nahe, dass die Mitose der Auslöser für die Transkription ist. Dies ist aber nicht der Fall, denn sowohl im NB7-1 als auch im NB2-4T startet die *svp*-Transkription in *string*-Mutanten zur selben Zeit wie im WT, ohne dass eine Zellteilung erfolgt ist. In *string*-Mutanten sind alle NB in der G2-Phase des 14. Zellzyklus arretiert (persönliche Mitteilung Christian Lehner, Bayreuth), daher kann eine Abhängigkeit der *svp*-Transkription von anderen Zellzyklus-Phasen ebenfalls ausgeschlossen werden. Eine koordinierte *svp*-Transkription obliegt wohl eher einem Zellzyklus-unabhängigen temporalen Kontrollmechanismus. Möglicherweise wird die Zeit gemessen, in der ein extrinsisches oder intrinsisches Signal akkumuliert bzw.

abgebaut wird. Die Überschreitung eines bestimmten Schwellenwerts würde dann die *svp*-Transkription einleiten. Ein Beispiel für einen solchen Mechanismus ist der CDK-Inhibitor p27/kip1 aus Mammalia. Die Akkumulation von p27/kip1 in Oligodendrocyten definiert das Ende der Proliferation und die beginnende Differenzierung der Oligodendrocyten (Durand et al., 1997). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Anreicherung von extrinsischen Faktoren wie FGF2 den Übergang von der Produktion von Neuronen zur Generierung von Gliazellen bestimmt (Morrow et al., 2001).

Eine Zellzyklus-unabhängige zeitlich koordinierte Regulation gilt mit Ausnahme von *hb* für alle Gene der temporalen Spezifizierungskaskade (Grosskortenhaus et al., 2005). Damit bildet *hb* durch seine Zellzyklusabhängigkeit eher die Ausnahme als die Regel.

#### **4.1.4 Seven-up ist notwendig für die Spezifizierung der GMZ7-1b**

Der NB7-1 generiert im WT zwei Hb-positive GMZ. Aus GMZ7-1a geht das U1-Neuron hervor, aus GMZ7-1b entsteht das U2-Neuron. In *svp*-mutanten Embryonen kommt es zu einer massiven Überproduktion von U1-Neuronen. Eine derartige Vermehrung von U2 kann nicht beobachtet werden. Daraus kann geschlossen werden, dass die *Svp*-Expression für die Spezifizierung der GMZ7-1b erforderlich ist. Im Fall, dass *Svp* keinen Einfluss auf das Schicksal der zweiten GMZ hat, wären ein U1-Neuron und eine Vielzahl von U2-Neuronen zu erwarten gewesen. Denn erst nachdem der NB GMZ7-1b generiert hat, sollte sich das Fehlen von *Svp* bemerkbar machen. Diese Hypothese wird gestützt durch die Ergebnisse des Überexpressions-experiments von *Svp*. Wird *Svp* im NB7-1 vor der Geburt der ersten GMZ exprimiert, so wird zwar U2 generiert, U1 hingegen fehlt in den meisten Fällen.

Vermutlich handelt es sich hierbei um einen indirekten Einfluss von *Svp*, denn in *svp*-mutanten Embryonen finden sich durchaus U2-Neurone. In einer früheren Arbeit vermuteten Pearson und Doe (2003), dass U2 durch eine geringere Hb-Aktivität im NB und/oder der GMZ7-1b spezifiziert wird. Eine attraktive Hypothese ist, dass *Svp* über eine Abschwächung der Hb-Aktivität bzw. der Hb-Expression wirkt. *svp* wird im NB7-1 kurz vor der zweiten Teilung exprimiert. Obwohl eine starke Translation Mitose-abhängig ist, kann in *string*-Mutanten eine schwache *Svp*-Expression in den G2-arretierten NB beobachtet werden. Dies hat eine Abschwächung der Hb-

Expression zur Folge. Es ist möglich, dass eine ähnlich basale Translation von *svp* auch im WT vonstatten geht. Tatsächlich kann mitunter auch im NB7-3 vor der entscheidenden Mitose eine schwache Svp-Protein-Expression festgestellt werden. Sollte es auch im NB7-1 vor der zweiten Zellteilung zu einer geringen Svp-Translation kommen, würde dies zu einer Abschwächung der Hb-Expression vor der Mitose führen. Daraus resultiert, dass der NB vor der ersten bzw. der zweiten Teilung unterschiedliche Quantitäten an Hb exprimiert. Da der NB den aktuellen Status der Gen-Expression an die gerade entstehende GMZ weitervererbt, exprimiert die zweitgeborene GMZ weniger Hb als die erstgeborene GMZ. Dies könnte sich wiederum auf die Expression von Zfh-2 auswirken, welches in U2 exprimiert wird, nicht aber in U1. Es gibt Hinweise, dass Zfh-2 ein direktes Zielgen von Hb sein könnte. In der regulatorischen Region von Zfh-2 befinden sich potentielle Hb-Bindestellen. Zudem wird Zfh-2 in *hb*-Mutanten dereprimiert. Sollte Zfh-2 tatsächlich durch Hb reprimiert werden, so reicht möglicherweise die geringere Menge an Hb in U2 nicht mehr aus, um die Zfh-2-Expression vollständig zu unterdrücken. Dies hätte eine schwache Zfh-2-Expression zur Folge.

#### **4.1.5 Prospero reprimiert die Funktion von Seven-up in Gangliennutterzellen**

Nachdem Svp durch die Mitose aktiviert worden ist, schaltet es *hb* im NB ab. Die gerade geborene GMZ behält aber, obwohl sie ebenfalls Svp-positiv ist, die *hb*-Expression bei. Wie ist das zu erklären? Der Homöodomänen-Transkriptionsfaktor Pros unterdrückt die Aktivität von Svp. Pros wird im NB kurz vor der Mitose asymmetrisch am Cortex fixiert und segregiert während der Teilung in die GMZ (Hirata et al., 1995; Knoblich et al., 1999; Spana und Doe, 1995). Hier wird die Kernexportsequenz von Pros eliminiert und so eine nukleäre Lokalisation ermöglicht (Bi et al., 2003; Demidenko et al., 2001). Auf diese Weise kann Pros in der GMZ als Transkriptionsfaktor wirken, nicht aber im NB.

Es gibt mehrere Gründe, weshalb Pros derjenige Faktor sein muss, der die Svp-Funktion in GMZ unterdrückt. So kann in *pros*-Mutanten ein massiver Verlust der Hb-Expression festgestellt werden. Analysen auf Zellstammbaum-Ebene zeigen, dass Hb in denjenigen GMZ verloren geht, die Svp exprimieren. Im Fall, dass der Verlust der Hb-Expression in *pros*-Mutanten nicht auf die Dereprimierung der Svp-Aktivität

zurückzuführen ist, müssten *svp,pros*-Doppelmutanten einen Phänotypen zeigen, welcher der *pros*-Einzelmutante entspricht. Beobachtet wird aber ein *svp*-ähnlicher Phänotyp. Des Weiteren führt eine Überexpression von Pros im NB7-3 zu einer verlängerten Hb-positiven Phase im NB.

Auf welche Weise inhibiert Pros die Svp-Funktion? Zum einem scheint Pros die Svp-Transkription zu hemmen, denn in *pros*-Mutanten kann in der GMZ7-3a eine längere *svp*-Expression als im WT beobachtet werden. Die transkriptionelle Regulation spielt aber wahrscheinlich nur eine nebensächliche Rolle. Vermutlich findet die entscheidende Inhibierung von Svp durch Pros auf posttranslationaler Ebene statt. Im WT wird Svp-Protein in der GMZ7-3a über einen längeren Zeitraum mit Hb-koexprimiert. Dies führt aber nicht zum Beenden der Hb-Expression. Eine Erklärung dafür wäre, dass Svp einer posttranslationalen Modifikation bedarf, die durch Pros inhibiert wird. Eine weitere attraktive Hypothese ist, dass Pros die reprimierende Wirkung von Svp neutralisiert, indem es an die selbe regulatorische Region von *hb* bindet. Tatsächlich kann in der regulatorischen Region von *hb* eine potentielle Pros-Bindestelle detektiert werden (Cook et al., 2003; Hassan et al., 1997). Im Bereich dieser Prospero-Bindestelle findet sich eine Anreicherung evolutiv konservierter potentieller Svp-Bindestellen (Zelhof et al., 1995). Das HZ4- und das Lac12-Enhancerfragment (s. Kap. 3.6) beinhalten diese Bindestellen und exprimieren zudem LacZ im NS. Kreuzt man diese Konstrukte in einen *svp*- bzw. *pros*-mutanten Hintergrund ein, so findet man im *svp*-mutanten Hintergrund mehr LacZ-positive Zellen und im *pros*-mutanten eine Reduktion der LacZ-positiven Zellen (Diplomarbeit Sascha Eder, 2005). Dies ist ein Hinweis für die Funktionalität der Bindestellen.

Um diese Hypothese zu testen, müssten weitere Beweise für die Funktionalität der Bindestellen erbracht werden. Es sollte zunächst festgestellt werden, ob Svp und Pros *in vitro* an diese Stellen binden können. Falls dieser Test positiv ausfällt, könnten für eine *in vivo* Überprüfung HZ4/Lac12-Enhancer-Fragmente mit mutierten Svp- und Pros-Bindestellen analysiert werden.

#### **4.1.6 In *prospero*-Mutanten findet möglicherweise eine Transformation von EW1 zu EW2 statt**

Bezüglich der Svp-Expression gibt es in *pros*-Mutanten einen auffallenden Unterschied im Vergleich zum WT. In einem Drittel der Hemisegmente in *pros*-

Mutanten finden sich im Stadium 14 im Zellstammbaum NB7-3 zwei Svp-positive Neurone. Wildtypische Embryonen des Stadiums 14 exprimieren Svp in diesem Zellstammbaum nur im EW2-Neuron.

Welche Erklärung gibt es für die Zunahme der Svp-Expression im Zellstammbaum NB7-3? Möglicherweise ist Pros für die Reprimierung der *svp*-Expression in der GMZ7-3a und deren Nachkommen verantwortlich. In diesem Fall sollten aber drei anstatt zwei Svp-positive Neurone in Zellstammbaum NB7-3 zu erwarten sein. Eine andere Möglichkeit ist, dass es in *pros*-Mutanten zu einer Transformation des Zellschicksals von EW1 zu EW2 kommt. Beide Neurone exprimieren Serotonin und Krüppel (Isshiki et al., 2001; Novotny et al., 2002). Eine weitere Gemeinsamkeit ist, dass die Vorläuferzellen von EW1 und EW2 Svp exprimieren. Im Unterschied zu EW2 ist EW1 als früh geborenes Neuron Hb-positiv. EW2 weist im Gegensatz zu EW1 eine Expression von Zfh-2 auf (Isshiki et al., 2001; Novotny et al., 2002), einen Marker spät geborener Zellen. Es gibt Hinweise, dass in jenen Zellen, die aufgrund der *pros*-Mutation ihre Hb-Expression verlieren, Faktoren dereprimiert werden, die typisch für später geborene Neurone sind. So kommt es in EW1 in vielen Fällen zu einer Derepression von Zfh-2 (Daten nicht gezeigt). Einer oder mehrere der dereprimierten Faktoren könnten für das Aufrechterhalten der Svp-Expression in EW1 verantwortlich sein. Das Expressionsmuster von EW1 und EW2 in *pros*-Mutanten ist für alle getesteten Marker identisch und entspricht dem eines wildtypischen EW2-Neurons. Daher könnte eine Transformation von EW1 zu EW2 in *pros*-Mutanten stattgefunden haben.

Zudem weisen diese Experimente darauf hin, dass die Hb-Expression auch in den Nachkommen von NB notwendig ist, um „frühe“ Zellschicksale aufrecht zu erhalten. Dies bedeutet, dass die Spezifizierung früh geborener Zellen nicht allein durch eine epigenetische Funktion von Hb im NB zustande kommen kann.

#### **4.1.7 Modell der Regulation von *hunchback* durch Seven-up und Prospero**

Die Regulation von *hb* durch Svp und Pros in einem NB-Zellstammbaum, mit zwei Hb-positiven GMZ, kann durch folgendes Modell beschrieben werden:



## 4.2 Enhancerfragment-Analyse

Im Rahmen der Enhancer-Fragment Analyse sollte die genomische Region bestimmt werden, in der sich Enhancer für die Expression von *hb* im Nervensystem, speziell im Bauchmark befinden. Dazu wurden zu den bereits existierenden Fragmenten zusätzliche Enhancerfragmente aus dem 5'- und 3'-Bereich des *hb*-Gens angefertigt und auf eine Expression von LacZ im NS überprüft.

### 4.2.1 Enhancer für die Regulation von *hunchback* im Nervensystem befinden sich sowohl 3' als auch 5' der kodierenden Region

Enhancer für die Expression von *hb* im PNS und im ZNS sind sowohl im 5' als auch 3' der kodierenden Sequenz von *hb* lokalisiert. Die Größe dieses regulatorischen Bereichs kann nicht genau bestimmt werden. Er umfasst aber mindestens 12kb 5' (Lac12) und über 4kb 3' der kodierenden Sequenz (DS1 und DS2). Möglicherweise befinden sich repressorische Elemente 3' der Lac12-Region. Dies kann aus einem Vergleich von Stämmen geschlossen werden, die unterschiedlich große Fragmente aus dem 5'-Bereich von *hb* inseriert haben. In Stämmen, die ein P-Element inseriert haben, das die distalen 4kb des Lac12 Fragments (HZ4) enthält, wird LacZ im NS exprimiert. In Insertionsstämmen, welche die HZ4-Region und 1kb der 5' angrenzenden DNA enthalten, wird jedoch kein LacZ exprimiert.

### 4.2.2 Die im 3'-Bereich lokalisierten Enhancer sind nicht an der zeitlichen Regulation der *hb*-Expression beteiligt

Temporale Elemente, die für das zeitlich koordinierte An- und Abschalten der *hb*-Expression in NB und deren Nachkommen zuständig sind, befinden sich vor allem im 5'-Bereich. Das LacZ-Expressionsmuster in Lac12-Insertionsstämmen entspricht eher der endogenen Hb-Expression als das in DS1-Insertionsstämmen. Demgemäß korreliert der Start der LacZ-Expression in Lac12-Insertionsstämmen in den meisten NB mit der endogenen Hb-Expression (Diplomarbeit Sascha Eder, 2005). In DS1-Insertionsstämmen hingegen wird LacZ erst in der S3-Segregationswelle der NB

exprimiert, wobei Hb aber schon in S1-NB zum Zeitpunkt der Delamination zu finden ist.

Weiterhin weisen DS1-Insertionsstämme eine LacZ-Expression in vielen Hb-negativen Zellen auf. Dies deutet darauf hin, dass Svp-abhängige Elemente, die *hb* im NB ausschalten bzw. reprimieren, in der DS1-Region fehlen. In der Tat findet sich in der HZ4-Region eine Anhäufung evolutiv konservierter potentieller Svp-Bindestellen, die sich um eine ebenfalls konservierte Pros-Bindestelle gruppieren. Diese Bindestellen scheinen zudem funktional zu sein, denn im *svp*-mutanten Hintergrund weisen HZ4-Insertionsstämme deutlich mehr LacZ-positive Zellen auf (Diplomarbeit Sascha Eder, 2005). Eine Anhäufung konservierter Svp-Bindestellen im DS1- oder DS2-Fragment konnte nicht festgestellt werden.

Elemente für das zeitlich korrekte Abschalten von *hb* in Neuronen und Gliazellen sind vermutlich ebenfalls auf dem Lac12-Fragment lokalisiert, nicht aber auf dem DS1-Fragment. Im WT kann ab Ende des Stadiums 13 kaum noch *hb*-mRNA im NS detektiert werden (persönliche Mitteilung Joachim Urban). Ab dem Stadium 14 wird die LacZ-Expression in Lac12-Insertionsstämmen schwächer (Tanja Novotny, 2003). In DS1-Insertionsstämmen ist dagegen bis zum Ende der Embryonalentwicklung (Stadium 17) eine starke Expression von LacZ zu beobachten.

#### **4.2.3 Die evolutiv konservierten Regionen des DS1-Fragments enthalten panneurale und gliaspezifische Enhancer**

Die Fragmente DS1-1, DS1-2 und DS1-3 enthalten nur evolutiv konservierte Bereiche der DS1-Region. DS1-3-Insertionsstämme exprimieren in vermutlich allen Zellen des Bauchmarks LacZ. Im Vergleich zu DS1-Insertionsstämmen ist die Anzahl der LacZ-positiven Zellen womöglich sogar erhöht. Eine Erklärung dafür könnte sein, dass DS1-3 54bp enthält, die über das DS1-Fragment hinausgehen. Dieser Bereich könnte weitere regulatorische Elemente enthalten. Auf dem DS1-3-Fragment befinden sich vermutlich Enhancer für einen oder mehrere panneural exprimierte Transkriptionsfaktoren, die vorwiegend erst nach dem Start der *hb*-Expression aktiv werden.

Erstaunlicherweise exprimieren DS1-1- und DS1-2-Insertionsstämme LacZ fast ausschließlich in Gliazellen. Dabei zeigen DS1-1-Insertionsstämme das

interessantere Expressionsmuster. Bei den LacZ-positiven Zellen in DS1-1-Insertionsstämmen handelt es sich vermutlich um solche Gliazellen, die aus Zellstammbäumen mit tagmaspezifischen Unterschieden stammen. Beispielsweise sind die thorakalen Gliazellen des Zellstammbaums NB6-4 LacZ-positiv. Im Thorax gibt es drei Gliazellen die vom NB6-4 abstammen, im Abdomen jedoch nur zwei. Hier ist die Beteiligung der Homöotischen Gene *Ultrabithorax (Ubx)* und *Antennapedia (Antp)* denkbar, die in diesen Bereichen exprimiert werden (Carroll et al., 1986; White und Wilcox, 1985a). Da die tagmaspezifischen Unterschiede in der LacZ-Expression ausschließlich Gliazellen betreffen, befinden sich auf dem DS1-1-Fragment vermutlich Enhancer für einen glialen Faktor. Dieser gliaspezifische Transkriptionsfaktor ist entweder ein direktes Zielgen der Homöotischen Gene, oder aber er agiert als Cofaktor von Ubx und Antp, um die spezifische Expression in Gliazellen zu gewährleisten. Es wird weithin angenommen, dass HOX-Genprodukte mit Cofaktoren interagieren (Mann und Chan, 1996), nicht zuletzt weil Antp und Ubx an die Consensus-Sequenz 5'[C/T] [C/A] ATTA binden (Ekker et al., 1994; Ekker et al., 1991), die statistisch einmal pro 1.000bp vorkommt.

Die Untersuchungen haben es ermöglicht, die ungefähre Größe des regulatorischen Bereichs abzuschätzen. Um eine detailliertere Enhancer-Analyse durchzuführen, sollte nun die gesamte regulatorische Region von *hb* in einen Enhancer-Vektor kloniert und mit *hb*-Enhancerfragmenten verglichen werden, die sukzessive verkürzt worden sind. Auf diese Weise könnten Unterschiede, die im LacZ-Expressionsmuster auftreten, bestimmten Sequenzen zugeordnet werden.

### **4.3 Analyse der Funktion einzelner konservierter Domänen des Hunchback-Proteins**

Ein weiterer Aspekt dieser Arbeit war, die Funktion einzelner Bereiche des Hb-Proteins zu analysieren. Bei einem solchen Vorhaben fokussiert man in der Regel auf Aminosäure-Sequenzen, die strukturelle Motive bestimmter Proteindomänen aufweisen und/oder die evolutiv konserviert sind. Solche Bereiche sind in der Regel notwendig für die Funktion des Proteins.

Die Sequenz als auch die Expression von Hb sind entwicklungsgeschichtlich hoch konserviert (McGregor et al., 2001). Hb hat zwei evolutiv konservierte

Zinkfingerdomänen (Sommer und Tautz, 1991; Sommer et al., 1992; Treier et al., 1989). Es wird vermutet, dass die N-terminale Zinkfingerdomäne die DNA-bindende Struktur ist (Hülkamp et al., 1994). Hb verfügt über vier weitere konservierte Domänen: die A-, B-, C- und D-Box, die in der Reihenfolge ihrer Anordnung vom N- zum C-Terminus benannt sind (Sommer et al., 1992; Tautz et al., 1987).

Um die funktionelle Relevanz für einige dieser Domänen zu testen, wurden die Auswirkungen einer Überexpression an den *hb*-Varianten *UAS-hb $\Delta$ A*, *UAS-hb $\Delta$ D* und *UAS-hb\*Zn2* analysiert. Diese UAS-Konstrukte wurden ausgewählt, da sie Mutationen bzw. Deletionen in Bereichen aufweisen, für die es bereits Hinweise auf eine mögliche Funktion bzw. Interaktion mit anderen Proteinen gibt (s.u.). Mit Hilfe der Überexpressionsexperimente sollte bestimmt werden, inwieweit die veränderten Hb-Proteine in der Lage sind, früh geborene Nachkommen zu spezifizieren. Zudem sollte geprüft werden, ob die veränderten Proteine dem NB die Kompetenz verleihen können, auf Hb mit der Produktion „früher“ Zellschicksal zu reagieren. Entsprechend dazu wurden jene *hb*-Allele untersucht, die Stop-Codons in der D-Box bzw. vor den terminalen Zinkfingern aufwiesen. Für die A-Box gibt es bislang kein Allel mit einer „Missense“-Mutation in der betreffenden Sequenz. Eine Analyse eines (bislang nicht bekannten) Allels, das ein Stop-Codon in der A-Box trägt, erschien überflüssig, da der größte Teil des Proteins fehlen würde und eine Zuordnung des Phänotyps zur A-Box nicht möglich wäre.

#### **4.3.1 Die D-Box ist notwendig für die die Spezifizierung früh geborener Zellen**

Nach Überexpression von D-Box-deletiertem Hb werden keine ektopischen U1-Neurone generiert. Die Analysen der *hb*-Allele mit Stop-Codons in der D-Box (*hb<sup>7</sup>* und *hb<sup>11</sup>*) zeigen, dass die Eve-positiven früh geborenen Zellen nicht korrekt spezifiziert worden sind. In *hb<sup>11</sup>*- und *hb<sup>7</sup>*-Mutanten ist die Anzahl der Eve-positiven Zellen stark reduziert, zudem exprimieren die verbliebenen Neurone *Zfh-2*, einen Marker spät geborener Zellen. Es werden keine U-Neurone produziert, die ein Expressionsmuster früh geborener Neurone aufweisen.

In *hb<sup>7</sup>*-Mutanten werden RP2, aCC und pCC nur teilweise spezifiziert. Einerseits bleibt zwar die Eve-Expression erhalten, die in den Zellstammbäumen des NB1-1

und des NB4-2 ausschließlich in den früh geborenen Zellen zu finden ist, andererseits exprimieren RP2, aCC und pCC Zfh-2. Im NB7-1 ist das mutierte Hb nicht mehr in der Lage, Faktoren zu unterdrücken, die für ein „spätes“ Schicksal verantwortlich sind. Als Folge der Expression dieser Faktoren generiert der NB eine Hb-positive GMZ, die Eigenschaften der GMZ7-1c besitzt. Interessanterweise kann in *hb<sup>7</sup>*-Mutanten nie mehr als ein Hb-positives U-Neuron pro Hemineuromer gefunden werden. Daher wäre möglich, dass im Gegensatz zum WT, Hb nach der ersten Teilung im NB abgeschaltet wird. Eine andere Erklärung wäre ein Absterben des zweiten Hb-positiven U-Neurons bzw. die geringe Stabilität des mutierten Hb-Proteins. Hülkamp et al. (1994) konnten bereits zeigen, dass Hb<sup>7</sup> und Hb<sup>11</sup> im Vergleich zu wildtypischem Hb eine geringere Stabilität aufweisen.

In *hb<sup>11</sup>*-Mutanten findet sich ebenfalls Hb-Expression in den Eve-positiven Zellen. Im Vergleich zu den *hb<sup>7</sup>*-Mutanten ist allerdings bei *hb<sup>11</sup>*-Mutanten die Anzahl der Hb-positiven Zellen reduziert. Möglicherweise ist das Hb<sup>11</sup>-Protein deutlich instabiler als Hb<sup>7</sup>, oder aber es werden Faktoren exprimiert, die zu einer verfrühten Abschaltung von Hb führen. Hb<sup>11</sup> ist nur zehn Aminosäuren kürzer als Hb<sup>7</sup>, zeigt aber einen deutlich gravierenderen Phänotyp. Demnach sind die zehn fehlenden Aminosäuren entweder wichtig für die Struktur des Proteins oder die Interaktion mit anderen Faktoren. Die Phänotypen von *hb<sup>11</sup>*- und *hb<sup>12</sup>*-Mutanten sind einander sehr ähnlich. Daraus ergibt sich die Möglichkeit, dass die N-terminal der D-Box liegenden Bereiche für die temporale Spezifizierung und Kompetenz des NB keine oder keine eigenständige Rolle spielen.

Auf welche Weise könnte die D-Box in die Repression von „spätem“ Schicksal involviert sein? Die D-Box besitzt keine bekannten DNA-Bindungsdomänen, d.h. eine direkte Transkriptionskontrolle über eine Bindung an die DNA ist unwahrscheinlich. Kehle et al. (1998) identifizierten die D-Box als eine Domäne, die mit dem dMi2-Protein interagiert. dMi2 ist eine ATPase und Teil des ATP-abhängigen Nukleosom-Restrukturierungs- und Histon-Deacetylierungs-Komplexes (NuRD, Brehm et al., 2000; Kehle et al., 1998; Xue et al., 1998). Dieser Komplex reguliert die Zugänglichkeit von DNA für Transkriptionsfaktoren und RNA-Polymerasen. Eine Deacetylierung von Histonen korreliert mit dem Auftreten von Heterochromatin und Repression der Genaktivität (Ahringer, 2000; Kadosh und Struhl, 1998; Paranjape et al., 1994). Bislang ist der NuRD-Komplex daher immer mit einer transkriptionellen Repression in Verbindung gebracht worden. Es wird vermutet, dass Zelltyp-

spezifische transkriptionelle Repressoren die sequenzspezifische Bindung des NuRD-Komplexes vermitteln (Fairen et al., 1986; Fujita et al., 2004; Fujita et al., 2003; Xue et al., 1998). Beispielsweise konnte für Ikaros, das aus der Maus stammende strukturelle Homolog von Hb, gezeigt werden, dass es in Regionen mit Heterochromatin konzentriert vorkommt (Brown et al., 1999; Brown et al., 1997). Dort kolokalisiert es mit Mi2 (Kim et al., 1999; Koipally et al., 1999). Die Bindung von Ikaros an das Heterochromatin ist unabhängig vom NuRD-Komplex (Cobb et al., 2000). Zudem wird in Ikaros-defizienten Mäusen NuRD nicht an Regionen von Heterochromatin lokalisiert (Kim et al., 1999). Es kann daher angenommen werden, dass Ikaros die sequenzspezifische Lokalisation des NuRD-Komplexes vermittelt.

Ähnlich könnten auch Hb und dMi2 interagieren. Bislang konnte ein Zusammenwirken von Hb mit dMi2 nur für die frühe Funktion im Rahmen der Musterbildung gezeigt werden. Hb bindet an regulatorische Sequenzen der HOX-Gene und reprimiert ihre Transkription (Müller und Bienz, 1992; Qian et al., 1991; Zhang und Bienz, 1992). In der frühen Entwicklung wird *hb* nur transient exprimiert, die HOX-Gene müssen aber dauerhaft reprimiert werden. Diese Aufgabe wird von den Genen der Polycomb-Gruppe (PcG) übernommen, die eine Repression der HOX-Gene in der weiteren Entwicklung gewährleisten (Lewis, 1978; Soto et al., 1995; Struhl und White, 1985). Die Sequenz-Spezifität wird vermutlich durch Hb festgelegt und dMi2 dient dabei als die molekulare Verbindung zwischen Hb und den PcG-Genen (Kehle et al., 1998).

Sollten die Phänotypen in *hb<sup>7</sup>* und *hb<sup>11</sup>*-Mutanten tatsächlich auf eine Interaktion mit dem NuRD-Komplex zurückzuführen sein, dann bedeutet dies, dass die repressorische Aktivität von Hb erst durch diese Interaktion zustande kommt. Eine Interaktion von Hb mit dMi2 im NS ist prinzipiell möglich, denn dMi2 wird im embryonalen NS exprimiert (Khattak et al., 2002).

Weiterhin impliziert eine Interaktion mit dem NuRD-Komplex, dass eine transkriptionelle Repression aufrechterhalten bleibt, nachdem Hb nicht mehr exprimiert wird, wie es auch für die Regulation der HOX-Gene zutrifft. Die Analysen in *pros*-mutanten Embryonen sprechen aber gegen einen solchen Mechanismus. In *pros*-Mutanten geht die Hb-Expression in GMZ und deren Nachkommen verloren. Gleichzeitig kann eine Derepression von Markern für „spätes“ Schicksal beobachtet werden. Falls diese Derepression durch das Fehlen von Hb verursacht wird, besteht

in spätembryonalen Stadien noch keine NuRD-vermittelte epigenetische Funktion von Hb. Es kann aber nicht ausgeschlossen werden, dass eine solche Funktion in den darauffolgenden Entwicklungsstadien etabliert wird.

Um dies zu überprüfen könnte man zunächst testen, ob in späteren Stadien die Hb-Expression erforderlich ist, um die Spezifizierung der Zellen aufrecht zu erhalten. Da *hb*-Mutationen aber embryonal letal sind, muss eine Technik verwendet werden, mit der einzelne mutante Zellen in einem ansonsten heterozygoten Hintergrund generiert werden können. Dies kann durch Anwendung des MARCM-System (mosaic analysis with a repressible cell marker) erreicht werden, das auf einer FLP/FRT-bedingten mitotischen Rekombination beruht (Lee und Luo, 2001). Sollte sich herausstellen, dass Hb in späteren Stadien nicht mehr notwendig ist, könnte man die Spezifizierung von (ehemals) Hb-positiven Zellen im larvalen und pupalen Stadium von *dMi2*-Mutanten überprüft werden. Dazu sollte wiederum das MARCM-System angewendet werden, da *dMi2*-Mutanten im L1- bzw. im L2-Larvenstadium sterben (Kehle et al., 1998).

Eine NuRD-vermittelte epigenetische Funktion von Hb im NB würde bedeuten, dass die Hb-Expression relevant für die korrekte Spezifizierung der Hb-negativen Zellen ist. Die spät geborenen Zellen in *hb*-Mutanten weisen für die meisten Marker eine normale Expression auf (Isshiki et al., 2001; Novotny et al., 2002, Novotny, 2003). Dies lässt vermuten, dass die Spezifizierung der Zellen mit „spätem“ Schicksal nicht beeinträchtigt ist. Allerdings zeigen *hb<sup>9</sup>*-mutante L1-Larven in 40% der analysierten Hemisegmente einen Verlust der Corazonin-Expression im EW3-Neuron (Novotny, 2003). Dies weist zunächst auf eine epigenetische Funktion von Hb im NB hin. Das *hb<sup>9</sup>*-Allel ist bislang noch nicht charakterisiert. Daher kann nicht ausgeschlossen werden, dass der beobachtete Phänotyp auf eine verlängerte Hb-Expression im NB zurückzuführen ist. Diese könnte bspw. die Folge einer ungewöhnlich hohen Stabilität des Hb<sup>9</sup>-Proteins sein.

#### **4.3.2 Die terminale Zinkfinger-Domäne ist vermutlich an der Aufrechterhaltung der Kompetenz des Neuroblasten beteiligt**

Nach Überexpression von *UAS-hb\*Zn2* können zwar ektopische U-Neurone detektiert werden, jedoch entsteht nur ein zusätzliches U1-Neuron. Die meisten der

ektopischen U-Neurone weisen ein Gen-Expressionsmuster auf, welches für U2 Neurone typisch ist. Damit ist entweder die Kompetenz des NB eingeschränkt oder das mutierte Hb-Protein kann in den Neuronen die Zfh-2-Expression nicht vollständig unterdrücken. In *hb<sup>1</sup>*-Mutanten, bei denen die terminale Zinkfinger-Domäne fehlt, scheinen die früh geborenen Neurone aber korrekt spezifiziert zu sein. Daher liegt wohl eher eine Beeinträchtigung der Kompetenz des NB vor.

Welche Funktion könnte die terminale Zinkfinger-Domäne übernehmen? McCarty et al. (2003) konnten zeigen, dass die terminalen Zinkfinger von Hb *in vitro* miteinander dimerisieren können. In dieser Studie sollten vor allem die Bindeeigenschaften der terminalen Zinkfinger von Ikaros, dem strukturellen Homolog von Hb, näher untersucht werden. Von den terminalen Zinkfingern von Ikaros war bereits bekannt, dass sie mit sich oder anderen Mitglieder der Ikaros-Familie dimerisieren können (Hahm et al., 1998; Honma et al., 1999; Perdomo et al., 2000; Sun et al., 1996).

Ikaros wird vor allem im hämatopoetischen System exprimiert, wo es schon in den frühesten Vorläuferzellen zu finden ist. Es ist notwendig für die Entwicklung der B-, NK- und T-Zellen (Georgopoulos et al., 1994; Winandy et al., 1995). In aktivierten T-Zellen ist Ikaros an repetitiven  $\gamma$ -Satelliten-Sequenzen in der Nähe der Centromere zu finden (Brown et al., 1997). Direkte Zielgene von Ikaros, die inaktiviert werden sollen, wandern ebenso in die pericentromere Region und werden deacetyliert (Su et al., 2004). Eine Antikörperfärbung gegen Ikaros in aktivierten T-Zellen ergibt eine charakteristische punktierte Färbung im Zellkern. Die Dimerisierung von Ikaros ist eine Voraussetzung für diese typische Akkumulation von Ikaros an den pericentromeren Foci (Cobb et al., 2000). Ein Modell, welches das Auftreten dieser Foci mit dem Rekrutieren von zu inaktivierenden Zielgenen in der Region vereinbart, erfordert die Bildung von Ikaros-Dimeren oder –Multimeren. Diese könnten eine Brücke zwischen den Promotoren der zu inaktivierenden Gene und dem pericentromeren Heterochromatin schlagen (Cobb et al., 2000; Su et al., 2005). An dieser Inaktivierung ist möglicherweise der NuRD-Komplex beteiligt, der mit Ikaros in aktivierten T-Zellen am pericentromeren Heterochromatin kolokalisiert (Kim et al., 1999). Trifft dieses Modell zu, wäre die terminale Zinkfinger-Domäne an der NuRD-vermittelten Stilllegung von Ikaros-Zielgenen beteiligt.

Auch bei Hb gibt es Hinweise auf ein Zusammenwirken der D-Box und der terminalen Zinkfinger. Im Zuge der Segmentierung reguliert Hb die

Expressionsdomänen von Kr und Knirps (Kni) (Hülkamp et al., 1990). In *hb*<sup>1</sup>-Mutanten sowie in *hb*-mutanten Embryonen, die ein D-Box-deletiertes Rettungskonstrukt exprimieren, wird Kr nicht vollständig reprimiert. Die Kni-Expression bleibt dabei allerdings unbeeinflusst. In Mutanten, denen sowohl die D-Box als auch die terminalen Zinkfinger fehlen, wird Kni ebenfalls nicht mehr völlig reprimiert. Ein weiterer Hinweis für das Zusammenwirken der terminalen Zinkfinger und der D-Box ist der Befund, dass transheterozygote *hb*<sup>1</sup>/*dMi2*<sup>4</sup>- und auch *hb*<sup>1</sup>/*dMi2*<sup>6</sup>-Mutanten nicht überlebensfähig sind (Daten nicht gezeigt). Dieses Ergebnis kann folgendermaßen interpretiert werden: Im transheterozygoten Zustand liegen von beiden Proteinen nur 50% der wildtypischen Menge vor. Da Hb<sup>1</sup> eine intakte D-Box besitzt, kann es mit wildtypischen dMi2 interagieren. Damit wäre die Menge an dMi2, welches mit wildtypischen Hb assoziieren kann, deutlich reduziert. Hb<sup>1</sup>/dMi2-Konjugate können möglicherweise ihre Funktion nicht oder nur unvollständig wahrnehmen, weil dafür die terminalen Zinkfinger vonnöten sind.

Sollten die terminalen Zinkfinger und die D-Box im NS zusammenwirken, so spielt dieser Mechanismus nur bei der Regulation jener Gene eine Rolle, die für die Kompetenz des NB wichtig sind. Um festzustellen, ob eine Dimerisierung von Hb notwendig ist, könnte man im NB7-1 ein UAS-Konstrukt überexprimieren, das nur für die terminalen Zinkfinger kodiert. Falls diese Domäne mit den terminalen Zinkfinger des endogenen Hb interagiert, könnte dessen Funktion beeinträchtigt werden. Dies würde sich evtl. auf die Spezifizierung von U1 und U2 auswirken, deren Identität mit spezifischen Markern überprüft werden kann.

#### **4.3.3 Eine Deletion der A-Box erhöht möglicherweise die Aktivität von Hunchback**

Die A-Box ist nur sechs Aminosäuren groß und beinhaltet die Aminosäure-Sequenz IKQE. Dies ist eine Erkennungssequenz für die Anheftung von SUMO (small ubiquitin-related modifier, Sampson et al., 2001). Sumoylierung ist eine Proteinmodifikation, die mechanistisch der Ubiquitinierung sehr ähnlich, funktional aber völlig verschieden ist (Melchior, 2000). Während die Ubiquitinierung vor allem für das Degradieren von Proteinen zuständig ist, kann die Sumoylierung zahlreiche verschiedene Auswirkungen haben (für eine Übersicht: Johnson, 2004). In einigen Fällen führt die Sumoylierung zur Stabilisierung des Proteins (Desterro et al., 1998;

Seeler und Dejean, 2003), und wirkt dabei mitunter direkt antagonistisch zur Ubiquitinierung (Desterro et al., 1998). Des Weiteren hat die Sumoylierung einen Einfluss auf die intrazelluläre Lokalisation von Proteinen (für eine Übersicht: Wilson und Rangasamy, 2001). Eine Sumoylierung kann auch auf die Aktivität von Transkriptionsfaktoren einwirken. In wenigen Fällen kommt es dabei zu einer Aktivierung (Gostissa et al., 1999; Rodriguez et al., 1999; Yamamoto et al., 2003); meistens führt die Sumoylierung aber zu einer herabgesetzten Aktivität von Transkriptionsfaktoren (Girdwood et al., 2004; Müller et al., 2004; Verger et al., 2003).

Es gibt Hinweise, dass es sich bei der Sequenz in der A-Box um eine echte Sumoylierungsstelle handelt. Wenn Hb zusammen mit SUMO in Zellkultur exprimiert wird, bildet es hochmolekulare Formen, bei denen es sich vermutlich um Hb-SUMO-Konjugate handelt (persönliche Mitteilung Albert Courey, Los Angeles). Gestützt wird diese Hypothese durch die Untersuchungen an Ikaros, dem strukturellen Homolog von Hb (Georgopoulos et al., 1992; McCarty et al., 2003). Ikaros wird ebenfalls sumoyliert (Gomez-del Arco et al., 2005), dabei wird SUMO an die Lysin-Reste 58 und 240 gebunden. Diese Stellen schließen die N-terminale Zinkfinger-Domäne ein, die eine DNA-Bindung von Ikaros vermitteln (Hahm et al., 1994; Molnar und Georgopoulos, 1994). Werden diese beiden Lysin-Reste mutiert, zeigt das veränderte Protein eine stärkere Repression der Transkription als wildtypisches Ikaros. Eine Sumoylierung von Ikaros setzt dessen Fähigkeit herab, mit den transkriptionellen Co-Repressoren Sin3A, Sin3B und Mi2 $\beta$  zu interagieren (Gomez-del Arco et al., 2005).

Die Überexpression von *UAS-hb $\Delta$ A* zeigte kaum Unterschiede zur Überexpression von wildtypischen Hb. Dies kann bedeuten, dass der A-Box keinerlei Funktion bei den Aufgaben von Hb im NS zukommt. Allerdings zeigte der verwendete *UAS-hb $\Delta$ A*, im Vergleich zu den anderen *UAS-hb*-Stämmen, mit Abstand die schwächste Hb-Expression. Dies könnte möglicherweise darauf hinweisen, dass ein A-Box-deletiertes Hb eine höhere repressorische Aktivität aufweist, wodurch die geringere Expressionsstärke kompensiert wird. In einem solchen Fall könnte eine Sumoylierung von Hb, ähnlich wie bei Ikaros, eine Interaktion mit Co-Faktoren beeinträchtigen.

---

Um diese Hypothese zu überprüfen, müsste zunächst einmal festgestellt werden, ob tatsächlich eine Sumoylierung von Hb stattfindet. Dies wird derzeit in dieser Arbeitsgruppe von Sebastian Jansen in Rahmen seines Diplomprojektes untersucht.

In einem zweiten Schritt sollte die Aktivität des wildtypischen Hb mit der von A-Box-deletiertem Hb verglichen werden. Dazu muss ein Ansatz gewählt werden, bei dem sichergestellt ist, dass beide *hb*-Varianten die gleiche Expressionsstärke aufweisen. Mit dem bisherigen Ansatz, der auf einer zufälligen Integration von P-Elementen im Genom beruht, ist das nicht möglich, denn offensichtlich existieren trotz Insulatorsequenzen ortsabhängige Effekte. Um solche positionalen Einflüsse zu nivellieren, wäre eine Insertion von P-Elementen immer am gleichen Ort im Genom vorteilhaft. Seit kurzem existiert eine Methode, mit der dies gewährleistet wird und die hier angewendet werden könnte (Oberstein et al., 2005). Diese Technik basiert auf dem Cre-LoxP-Rekombinationssystem. Cre ist ein Enzym, das LoxP-Stellen schneidet und religiert und somit eine Rekombination zwischen identischen LoxP-Stellen vermitteln kann (Hoess et al., 1986). Minimale LoxP-Stellen beinhalten eine asymmetrische Kernsequenz, die eine gerichtete Insertion garantieren, sowie zwei flankierende inverse Wiederholungssequenzen, an die Cre bindet. LoxP-Stellen, so genannte „landing sites“, werden durch P-Element-vermittelte Insertion ins Genom der Fliegen eingebracht. An den „landing sites“ kann anschließend LoxP-flankierte DNA integriert werden.

## 5 Zusammenfassung

In *Drosophila melanogaster* wird das Nervensystem von neuronalen Vorläuferzellen, den Neuroblasten (NB) gebildet. Diese teilen sich im Stammzellmodus und bringen bei jeder Teilung eine Ganglienmutterzelle (GMZ) hervor. GMZ teilen sich einmal und generieren zwei Zellen, die ein neuronales und/oder gliales Schicksal annehmen. Die Reihenfolge in der ein NB GMZ generiert, ist vermutlich ein zellautonomer Prozess, der an die transiente und sequenzielle Expression der Transkriptionsfaktoren Hunchback (Hb), Krüppel (Kr), Pdm, Castor (Cas) und Grainy head (Grh) gekoppelt ist. Hb ist der erste Faktor dieser Genkaskade. Damit der NB zur nächsten zeitlichen Identität übergehen kann, die in der Regel von Kr bestimmt wird, muss die Hb-Expression im NB beendet werden. Das Abschalten wird transkriptionell reguliert und ist von einer vorhergehenden Mitose abhängig. Im Gegensatz zum NB wird in der GMZ, die bei dieser Teilung entsteht, die Hb-Expression beibehalten.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Mitose-abhängige Mechanismus aufgeklärt, durch den eine selektive Abschaltung von *hb* im NB erfolgt, nicht aber in der GMZ. Der Transkriptionsfaktor Seven-up (Svp) beendet die *hb*-Expression im NB. *svp* wird vor der entscheidenden Zellteilung im NB transkribiert, aber kaum translatiert. Nach erfolgter Zellteilung wird Svp verstärkt translatiert und sowohl im NB als auch in der neu entstandenen GMZ exprimiert. Im NB führt die Svp-Funktion zur Abschaltung von Hb. In der ebenfalls Svp-positiven GMZ verhindert jedoch Prospero (Pros), das während der Teilung in diese Zelle segregiert ist, die Aktivität von Svp.

Um zu überprüfen, ob Svp und Pros die Transkription von Hb entweder direkt oder indirekt regulieren, wurde eine Enhancerfragment-Analyse durchgeführt. Durch diese Untersuchungen sollten relevante regulatorische Bereiche des *hb*-Gens identifiziert werden. Zusätzlich zu den bereits bekannten Regionen im 5'-Bereich von *hb*, konnten 3' des transkribierten Bereiches weitere nervensystemspezifische Enhancerelemente gefunden werden.

Neben der Spezifizierung von früh geborenen Nachkommen von NB hat Hb im Nervensystem die Funktion, den multipotenten Zustand junger NB aufrecht zu erhalten. Um den Beitrag einzelner Domänen des Hb-Proteins an diesen Aufgaben zu bestimmen, wurden verschiedene *hb*-Varianten, in denen spezifische Domänen deletiert bzw. mutiert waren, im NB7-1 überexprimiert und auf die Induktion von „frühem“ Schicksal getestet. In einem zweiten Ansatz wurden mutante *hb*-Allele analysiert. Es stellte sich heraus, dass der D-Box eine entscheidende Rolle bei der Spezifizierung von „frühem“ Schicksal zukommt. Die terminalen Zinkfinger sind vermutlich in die Aufrechterhaltung der Kompetenz von NB involviert. Eine Deletion der A-Box erhöht möglicherweise die Aktivität des Hb-Proteins.

## 6 Literaturverzeichnis

- Ahringer, J.** (2000). NuRD and SIN3 histone deacetylase complexes in development. *Trends Genet* **16**, 351-6.
- Akiyama-Oda, Y., Hosoya, T. and Hotta, Y.** (1999). Asymmetric cell division of thoracic neuroblast 6-4 to bifurcate glial and neuronal lineage in *Drosophila*. *Development* **126**, 1967-74.
- Ashburner, M.** (1989). *Drosophila A Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Bellen, H. J., O'Kane, C. J., Wilson, C., Grossniklaus, U., Pearson, R. K. and Gehring, W. J.** (1989). P-element-mediated enhancer detection: a versatile method to study development in *Drosophila*. *Genes Dev* **3**, 1288-300.
- Bender, M., Turner, F. R. and Kaufman, T. C.** (1987). A development genetic analysis of the gene regulator of postbithorax in *Drosophila melanogaster*. *Dev Biol* **119**, 418-32.
- Berman, B. P., Nibu, Y., Pfeiffer, B. D., Tomancak, P., Celniker, S. E., Levine, M., Rubin, G. M. and Eisen, M. B.** (2002). Exploiting transcription factor binding site clustering to identify cis-regulatory modules involved in pattern formation in the *Drosophila* genome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 757-62.
- Berman, B. P., Pfeiffer, B. D., Lavery, T. R., Salzberg, S. L., Rubin, G. M., Eisen, M. B. and Celniker, S. E.** (2004). Computational identification of developmental enhancers: conservation and function of transcription factor binding-site clusters in *Drosophila melanogaster* and *Drosophila pseudoobscura*. *Genome Biol* **5**, R61.
- Bhat, K. M.** (1999). Segment polarity genes in neuroblast formation and identity specification during *Drosophila* neurogenesis. *Bioessays* **21**, 472-85.
- Bi, X., Kajava, A. V., Jones, T., Demidenko, Z. N. and Mortin, M. A.** (2003). The carboxy terminus of Prospero regulates its subcellular localization. *Mol Cell Biol* **23**, 1014-24.
- Bossing, T., Udolph, G., Doe, C. Q. and Technau, G. M.** (1996). The embryonic central nervous system lineages of *Drosophila melanogaster*. I. Neuroblast lineages derived from the ventral half of the neuroectoderm. *Dev Biol* **179**, 41-64.
- Brand, A. H. and Perrimon, N.** (1993). Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* **118**, 401-15.
- Brehm, A., Langst, G., Kehle, J., Clapier, C. R., Imhof, A., Eberharter, A., Muller, J. and Becker, P. B.** (2000). dMi-2 and ISWI chromatin remodelling factors have distinct nucleosome binding and mobilization properties. *Embo J* **19**, 4332-41.
- Breidbach and Kutsch, W.** (1995). *The Nervous System of Invertebrates: An evolutionary and Comparative Approach*. Basel: Birkhäuser Verlag.
- Broadus, J. and Doe, C. Q.** (1995). Evolution of neuroblast identity: seven-up and prospero expression reveal homologous and divergent neuroblast fates in *Drosophila* and *Schistocerca*. *Development* **121**, 3989-96.

- Broadus, J., Skeath, J. B., Spana, E. P., Bossing, T., Technau, G. and Doe, C. Q.** (1995). New neuroblast markers and the origin of the aCC/pCC neurons in the *Drosophila* central nervous system. *Mech Dev* **53**, 393-402.
- Brodsky, A. S. and Silver, P. A.** (2000). Pre-mRNA processing factors are required for nuclear export. *Rna* **6**, 1737-49.
- Brody, T. and Odenwald, W. F.** (2000). Programmed transformations in neuroblast gene expression during *Drosophila* CNS lineage development. *Dev Biol* **226**, 34-44.
- Brody, T. and Odenwald, W. F.** (2002). Cellular diversity in the developing nervous system: a temporal view from *Drosophila*. *Development* **129**, 3763-70.
- Brown, K. E., Baxter, J., Graf, D., Merckenschlager, M. and Fisher, A. G.** (1999). Dynamic repositioning of genes in the nucleus of lymphocytes preparing for cell division. *Mol Cell* **3**, 207-17.
- Brown, K. E., Guest, S. S., Smale, S. T., Hahm, K., Merckenschlager, M. and Fisher, A. G.** (1997). Association of transcriptionally silent genes with Ikaros complexes at centromeric heterochromatin. *Cell* **91**, 845-54.
- Brugger, S. M., Merrill, A. E., Torres-Vazquez, J., Wu, N., Ting, M. C., Cho, J. Y., Dobias, S. L., Yi, S. E., Lyons, K., Bell, J. R. et al.** (2004). A phylogenetically conserved cis-regulatory module in the *Msx2* promoter is sufficient for BMP-dependent transcription in murine and *Drosophila* embryos. *Development* **131**, 5153-65.
- Buescher, M., Yeo, S. L., Udolph, G., Zavortink, M., Yang, X., Tear, G. and Chia, W.** (1998). Binary sibling neuronal cell fate decisions in the *Drosophila* embryonic central nervous system are nonstochastic and require inscuteable-mediated asymmetry of ganglion mother cells. *Genes Dev* **12**, 1858-70.
- Cai, Y., Yu, F., Lin, S., Chia, W. and Yang, X.** (2003). Apical complex genes control mitotic spindle geometry and relative size of daughter cells in *Drosophila* neuroblast and pl asymmetric divisions. *Cell* **112**, 51-62.
- Campos-Ortega, J. A. and Hartenstein, V.** (1985). The Embryonic development of *Drosophila melanogaster*. Berlin, Heidelberg: Springer Verlag.
- Carr, A. R., Choksi, S. P. and Brand, A. H.** (2004). Turning back the clock on neural progenitors. *Bioessays* **26**, 711-4.
- Carroll, S. B., Laymon, R. A., McCutcheon, M. A., Riley, P. D. and Scott, M. P.** (1986). The localization and regulation of Antennapedia protein expression in *Drosophila* embryos. *Cell* **47**, 113-22.
- Chu-LaGriff, Q. and Doe, C. Q.** (1993). Neuroblast specification and formation regulated by wingless in the *Drosophila* CNS. *Science* **261**, 1594-7.
- Cobb, B. S., Morales-Alcelay, S., Kleiger, G., Brown, K. E., Fisher, A. G. and Smale, S. T.** (2000). Targeting of Ikaros to pericentromeric heterochromatin by direct DNA binding. *Genes Dev* **14**, 2146-60.
- Cook, T., Pichaud, F., Sonnevile, R., Papatsenko, D. and Desplan, C.** (2003). Distinction between color photoreceptor cell fates is controlled by Prospero in *Drosophila*. *Dev Cell* **4**, 853-64.

- Cui, X. and Doe, C. Q.** (1995). The role of the cell cycle and cytokinesis in regulating neuroblast sublineage gene expression in the *Drosophila* CNS. *Development* **121**, 3233-43.
- Dearolf, C. R., Topol, J. and Parker, C. S.** (1989). Transcriptional control of *Drosophila* fushi tarazu zebra stripe expression. *Genes Dev* **3**, 384-98.
- Demidenko, Z., Badenhorst, P., Jones, T., Bi, X. and Mortin, M. A.** (2001). Regulated nuclear export of the homeodomain transcription factor Prospero. *Development* **128**, 1359-67.
- Desterro, J. M., Rodriguez, M. S. and Hay, R. T.** (1998). SUMO-1 modification of IkkappaBalpha inhibits NF-kappaB activation. *Mol Cell* **2**, 233-9.
- Dittrich, R., Bossing, T., Gould, A. P., Technau, G. M. and Urban, J.** (1997). The differentiation of the serotonergic neurons in the *Drosophila* ventral nerve cord depends on the combined function of the zinc finger proteins Eagle and Hucklebein. *Development* **124**, 2515-25.
- Doe, C. Q.** (1992). Molecular markers for identified neuroblasts and ganglion mother cells in the *Drosophila* central nervous system. *Development* **116**, 855-63.
- Doe, C. Q., Chu-LaGraff, Q., Wright, D. M. and Scott, M. P.** (1991). The prospero gene specifies cell fates in the *Drosophila* central nervous system. *Cell* **65**, 451-64.
- Durand, B., Gao, F. B. and Raff, M.** (1997). Accumulation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27/Kip1 and the timing of oligodendrocyte differentiation. *Embo J* **16**, 306-17.
- Edgar, B. A. and O'Farrell, P. H.** (1989). Genetic control of cell division patterns in the *Drosophila* embryo. *Cell* **57**, 177-87.
- Ekker, S. C., Jackson, D. G., von Kessler, D. P., Sun, B. I., Young, K. E. and Beachy, P. A.** (1994). The degree of variation in DNA sequence recognition among four *Drosophila* homeotic proteins. *Embo J* **13**, 3551-60.
- Ekker, S. C., Young, K. E., von Kessler, D. P. and Beachy, P. A.** (1991). Optimal DNA sequence recognition by the Ultrabithorax homeodomain of *Drosophila*. *Embo J* **10**, 1179-86.
- Enright, A. J., John, B., Gaul, U., Tuschl, T., Sander, C. and Marks, D. S.** (2003). MicroRNA targets in *Drosophila*. *Genome Biol* **5**, R1.
- Fairen, A., Cobas, A. and Fonseca, M.** (1986). Times of generation of glutamic acid decarboxylase immunoreactive neurons in mouse somatosensory cortex. *J Comp Neurol* **251**, 67-83.
- Fujita, N., Jaye, D. L., Geigerman, C., Akyildiz, A., Mooney, M. R., Boss, J. M. and Wade, P. A.** (2004). MTA3 and the Mi-2/NuRD complex regulate cell fate during B lymphocyte differentiation. *Cell* **119**, 75-86.
- Fujita, N., Jaye, D. L., Kajita, M., Geigerman, C., Moreno, C. S. and Wade, P. A.** (2003). MTA3, a Mi-2/NuRD complex subunit, regulates an invasive growth pathway in breast cancer. *Cell* **113**, 207-19.
- Georgopoulos, K., Bigby, M., Wang, J. H., Molnar, A., Wu, P., Winandy, S. and Sharpe, A.** (1994). The Ikaros gene is required for the development of all lymphoid lineages. *Cell* **79**, 143-56.

- Georgopoulos, K., Moore, D. D. and Derfler, B.** (1992). Ikaros, an early lymphoid-specific transcription factor and a putative mediator for T cell commitment. *Science* **258**, 808-12.
- Gilbert, W. and Guthrie, C.** (2004). The Glc7p nuclear phosphatase promotes mRNA export by facilitating association of Mex67p with mRNA. *Mol Cell* **13**, 201-12.
- Girdwood, D. W., Tatham, M. H. and Hay, R. T.** (2004). SUMO and transcriptional regulation. *Semin Cell Dev Biol* **15**, 201-10.
- Gomez-del Arco, P., Koipally, J. and Georgopoulos, K.** (2005). Ikaros SUMOylation: switching out of repression. *Mol Cell Biol* **25**, 2688-97.
- Gostissa, M., Hengstermann, A., Fogal, V., Sandy, P., Schwarz, S. E., Scheffner, M. and Del Sal, G.** (1999). Activation of p53 by conjugation to the ubiquitin-like protein SUMO-1. *Embo J* **18**, 6462-71.
- Grosskortenhaus, R., Pearson, B. J., Marusich, A. and Doe, C. Q.** (2005). Regulation of temporal identity transitions in *Drosophila* neuroblasts. *Dev Cell* **8**, 193-202.
- Hahm, K., Cobb, B. S., McCarty, A. S., Brown, K. E., Klug, C. A., Lee, R., Akashi, K., Weissman, I. L., Fisher, A. G. and Smale, S. T.** (1998). Helios, a T cell-restricted Ikaros family member that quantitatively associates with Ikaros at centromeric heterochromatin. *Genes Dev* **12**, 782-96.
- Hahm, K., Ernst, P., Lo, K., Kim, G. S., Turck, C. and Smale, S. T.** (1994). The lymphoid transcription factor LyF-1 is encoded by specific, alternatively spliced mRNAs derived from the Ikaros gene. *Mol Cell Biol* **14**, 7111-23.
- Hashimoto, K. and Kano, M.** (1998). Presynaptic origin of paired-pulse depression at climbing fibre-Purkinje cell synapses in the rat cerebellum. *J Physiol* **506 ( Pt 2)**, 391-405.
- Hassan, B., Li, L., Bremer, K. A., Chang, W., Pinsonneault, J. and Vaessin, H.** (1997). Prospero is a panneural transcription factor that modulates homeodomain protein activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 10991-6.
- Hieronymus, H. and Silver, P. A.** (2004). A systems view of mRNP biology. *Genes Dev* **18**, 2845-60.
- Higashijima, S., Shishido, E., Matsuzaki, M. and Saigo, K.** (1996). eagle, a member of the steroid receptor gene superfamily, is expressed in a subset of neuroblasts and regulates the fate of their putative progeny in the *Drosophila* CNS. *Development* **122**, 527-36.
- Hirata, J., Nakagoshi, H., Nabeshima, Y. and Matsuzaki, F.** (1995). Asymmetric segregation of the homeodomain protein Prospero during *Drosophila* development. *Nature* **377**, 627-30.
- Hodge, C. A., Colot, H. V., Stafford, P. and Cole, C. N.** (1999). Rat8p/Dbp5p is a shuttling transport factor that interacts with Rat7p/Nup159p and Gle1p and suppresses the mRNA export defect of xpo1-1 cells. *Embo J* **18**, 5778-88.
- Hoess, R. H., Wierzbicki, A. and Abremski, K.** (1986). The role of the loxP spacer region in P1 site-specific recombination. *Nucleic Acids Res* **14**, 2287-300.
- Honma, Y., Kiyosawa, H., Mori, T., Oguri, A., Nikaido, T., Kanazawa, K., Tojo, M., Takeda, J., Tanno, Y., Yokoya, S. et al.** (1999). Eos: a novel member of the Ikaros

- gene family expressed predominantly in the developing nervous system. *FEBS Lett* **447**, 76-80.
- Huang, Y. and Carmichael, G. G.** (1996). A suboptimal 5' splice site is a cis-acting determinant of nuclear export of polyomavirus late mRNAs. *Mol Cell Biol* **16**, 6046-54.
- Huang, Y. and Steitz, J. A.** (2005). SRprises along a messenger's journey. *Mol Cell* **17**, 613-5.
- Hulskamp, M., Lukowitz, W., Beermann, A., Glaser, G. and Tautz, D.** (1994). Differential regulation of target genes by different alleles of the segmentation gene hunchback in *Drosophila*. *Genetics* **138**, 125-34.
- Hulskamp, M., Pfeifle, C. and Tautz, D.** (1990). A morphogenetic gradient of hunchback protein organizes the expression of the gap genes Kruppel and knirps in the early *Drosophila* embryo. *Nature* **346**, 577-80.
- Isshiki, T. and Doe, C. Q.** (2004). Maintaining youth in *Drosophila* neural progenitors. *Cell Cycle* **3**, 296-9.
- Isshiki, T., Pearson, B., Holbrook, S. and Doe, C. Q.** (2001). *Drosophila* neuroblasts sequentially express transcription factors which specify the temporal identity of their neuronal progeny. *Cell* **106**, 511-21.
- Ito, K., Urban, J. and Technau, G. M.** (1995). Distribution, classification and development of *Drosophila* glial cells in the late embryonic and early larval ventral nerve cord. *Roux's Archive of Developmental Biology*, 284-307.
- Johnson, E. S.** (2004). Protein modification by SUMO. *Annu Rev Biochem* **73**, 355-82.
- Kadosh, D. and Struhl, K.** (1998). Histone deacetylase activity of Rpd3 is important for transcriptional repression in vivo. *Genes Dev* **12**, 797-805.
- Kambadur, R., Koizumi, K., Stivers, C., Nagle, J., Poole, S. J. and Odenwald, W. F.** (1998). Regulation of POU genes by castor and hunchback establishes layered compartments in the *Drosophila* CNS. *Genes Dev* **12**, 246-60.
- Kanai, M. I., Okabe, M. and Hiromi, Y.** (2005). seven-up Controls switching of transcription factors that specify temporal identities of *Drosophila* neuroblasts. *Dev Cell* **8**, 203-13.
- Karcavich, R. and Doe, C. Q.** (2005). *Drosophila* neuroblast 7-3 cell lineage: A model system for studying programmed cell death, Notch/Numb signaling, and sequential specification of ganglion mother cell identity. *J Comp Neurol* **481**, 240-51.
- Keene, J. D. and Lager, P. J.** (2005). Post-transcriptional operons and regulons coordinating gene expression. *Chromosome Res* **13**, 327-37.
- Kehle, J., Beuchle, D., Treuheit, S., Christen, B., Kennison, J. A., Bienz, M. and Muller, J.** (1998). dMi-2, a hunchback-interacting protein that functions in polycomb repression. *Science* **282**, 1897-900.
- Ketting, R. F. and Plasterk, R. H.** (2004). What's new about RNAi? Meeting on siRNAs and miRNAs. *EMBO Rep* **5**, 762-5.
- Khattak, S., Lee, B. R., Cho, S. H., Ahnn, J. and Spoerel, N. A.** (2002). Genetic characterization of *Drosophila* Mi-2 ATPase. *Gene* **293**, 107-14.

- Kim, J., Sif, S., Jones, B., Jackson, A., Koipally, J., Heller, E., Winandy, S., Viel, A., Sawyer, A., Ikeda, T. et al.** (1999). Ikaros DNA-binding proteins direct formation of chromatin remodeling complexes in lymphocytes. *Immunity* **10**, 345-55.
- Knoblich, J. A., Jan, L. Y. and Jan, Y. N.** (1999). Deletion analysis of the Drosophila Inscuteable protein reveals domains for cortical localization and asymmetric localization. *Curr Biol* **9**, 155-8.
- Koipally, J., Renold, A., Kim, J. and Georgopoulos, K.** (1999). Repression by Ikaros and Aiolos is mediated through histone deacetylase complexes. *Embo J* **18**, 3090-100.
- Kosman, D., Small, S. and Reinitz, J.** (1998). Rapid preparation of a panel of polyclonal antibodies to Drosophila segmentation proteins. *Dev Genes Evol* **208**, 290-4.
- Landgraf, M., Sanchez-Soriano, N., Technau, G. M., Urban, J. and Prokop, A.** (2003). Charting the Drosophila neuropile: a strategy for the standardised characterisation of genetically amenable neurites. *Dev Biol* **260**, 207-25.
- Laski, F. A., Rio, D. C. and Rubin, G. M.** (1986). Tissue specificity of Drosophila P element transposition is regulated at the level of mRNA splicing. *Cell* **44**, 7-19.
- Lee, T. and Luo, L.** (2001). Mosaic analysis with a repressible cell marker (MARCM) for Drosophila neural development. *Trends Neurosci* **24**, 251-4.
- Lehmann, R. and Nusslein-Volhard, C.** (1987). hunchback, a gene required for segmentation of an anterior and posterior region of the Drosophila embryo. *Dev Biol* **119**, 402-17.
- Levitan, I. B. and Kaczmarek, L. K.** (2002). The Neuron- Cell and Molecular Biology. New York: Oxford University Press.
- Lewis, E. B.** (1978). A gene complex controlling segmentation in Drosophila. *Nature* **276**, 565-70.
- Li, L. and Vaessin, H.** (2000). Pan-neural Prospero terminates cell proliferation during Drosophila neurogenesis. *Genes Dev* **14**, 147-51.
- Liu, T. H., Li, L. and Vaessin, H.** (2002). Transcription of the Drosophila CKI gene dacapo is regulated by a modular array of cis-regulatory sequences. *Mech Dev* **112**, 25-36.
- Long, R. M., Elliott, D. J., Stutz, F., Rosbash, M. and Singer, R. H.** (1995). Spatial consequences of defective processing of specific yeast mRNAs revealed by fluorescent in situ hybridization. *Rna* **1**, 1071-8.
- Mann, R. S. and Chan, S. K.** (1996). Extra specificity from extradenticle: the partnership between HOX and PBX/EXD homeodomain proteins. *Trends Genet* **12**, 258-62.
- Margolis, J. S.** (1992). Regulation of the *Drosophila* gap segmentation gene *hunchback*, (ed.: University of California at San Diego).
- Margolis, J. S., Borowsky, M., Shim, C. W. and Posakony, J. W.** (1994). A small region surrounding the distal promoter of the hunchback gene directs maternal expression. *Dev Biol* **163**, 381-8.

- Margolis, J. S., Borowsky, M. L., Steingrimsson, E., Shim, C. W., Lengyel, J. A. and Posakony, J. W.** (1995). Posterior stripe expression of hunchback is driven from two promoters by a common enhancer element. *Development* **121**, 3067-77.
- Martin-Bermudo, M. D., Carmena, A. and Jimenez, F.** (1995). Neurogenic genes control gene expression at the transcriptional level in early neurogenesis and in mesectoderm specification. *Development* **121**, 219-24.
- Mata, J., Marguerat, S. and Bahler, J.** (2005). Post-transcriptional control of gene expression: a genome-wide perspective. *Trends Biochem Sci* **30**, 506-14.
- McCarty, A. S., Kleiger, G., Eisenberg, D. and Smale, S. T.** (2003). Selective dimerization of a C2H2 zinc finger subfamily. *Mol Cell* **11**, 459-70.
- McDonald, J. A., Fujioka, M., Odden, J. P., Jaynes, J. B. and Doe, C. Q.** (2003). Specification of motoneuron fate in *Drosophila*: integration of positive and negative transcription factor inputs by a minimal eve enhancer. *J Neurobiol* **57**, 193-203.
- McGregor, A. P., Shaw, P. J. and Dover, G. A.** (2001). Sequence and expression of the hunchback gene in *Lucilia sericata*: a comparison with other Dipterans. *Dev Genes Evol* **211**, 315-8.
- Melchior, F.** (2000). SUMO--nonclassical ubiquitin. *Annu Rev Cell Dev Biol* **16**, 591-626.
- Mettler, U., Vogler, G. and Urban, J.** (2006). Timing of identity: spatiotemporal regulation of hunchback in neuroblast lineages of *Drosophila* by Seven-up and Prospero. *Development* **133**, 429-437.
- Mlodzik, M., Hiromi, Y., Weber, U., Goodman, C. S. and Rubin, G. M.** (1990). The *Drosophila* seven-up gene, a member of the steroid receptor gene superfamily, controls photoreceptor cell fates. *Cell* **60**, 211-24.
- Molnar, A. and Georgopoulos, K.** (1994). The Ikaros gene encodes a family of functionally diverse zinc finger DNA-binding proteins. *Mol Cell Biol* **14**, 8292-303.
- Moore, M. J.** (2005). From birth to death: the complex lives of eukaryotic mRNAs. *Science* **309**, 1514-8.
- Morrow, T., Song, M. R. and Ghosh, A.** (2001). Sequential specification of neurons and glia by developmentally regulated extracellular factors. *Development* **128**, 3585-94.
- Mühlhardt, C.** (2003). *Der Experimentator: Molekularbiologie/Genomics*. Heidelberg: Spektrum Verlag.
- Muller, J. and Bienz, M.** (1992). Sharp anterior boundary of homeotic gene expression conferred by the fushi tarazu protein. *Embo J* **11**, 3653-61.
- Muller, S., Ledl, A. and Schmidt, D.** (2004). SUMO: a regulator of gene expression and genome integrity. *Oncogene* **23**, 1998-2008.
- Novotny, T.** (2003). Die Funktion des Zinkfingertranskriptionsfaktors *hunchback* bei der Spezifizierung früher Zellschicksale im Nervensystem von *Drosophila melanogaster*. In *Institut für Genetik*, (ed. Mainz: Johannes Gutenberg-Universität.
- Novotny, T., Eiselt, R. and Urban, J.** (2002). Hunchback is required for the specification of the early sublineage of neuroblast 7-3 in the *Drosophila* central nervous system. *Development* **129**, 1027-36.

- Oberstein, A., Pare, A., Kaplan, L. and Small, S.** (2005). Site-specific transgenesis by Cre-mediated recombination in *Drosophila*. *Nat Methods* **2**, 583-5.
- Olsen, P. H. and Ambros, V.** (1999). The lin-4 regulatory RNA controls developmental timing in *Caenorhabditis elegans* by blocking LIN-14 protein synthesis after the initiation of translation. *Dev Biol* **216**, 671-80.
- Orphanides, G. and Reinberg, D.** (2002). A unified theory of gene expression. *Cell* **108**, 439-51.
- Paranjape, S. M., Kamakaka, R. T. and Kadonaga, J. T.** (1994). Role of chromatin structure in the regulation of transcription by RNA polymerase II. *Annu Rev Biochem* **63**, 265-97.
- Patel, N. H., Ball, E. E. and Goodman, C. S.** (1992). Changing role of even-skipped during the evolution of insect pattern formation. *Nature* **357**, 339-42.
- Pearson, B. J. and Doe, C. Q.** (2003). Regulation of neuroblast competence in *Drosophila*. *Nature* **425**, 624-8.
- Pearson, B. J. and Doe, C. Q.** (2004). Specification of temporal identity in the developing nervous system. *Annu Rev Cell Dev Biol* **20**, 619-47.
- Perdomo, J., Holmes, M., Chong, B. and Crossley, M.** (2000). Eos and pegasus, two members of the Ikaros family of proteins with distinct DNA binding activities. *J Biol Chem* **275**, 38347-54.
- Poulson, D. F.** (1950). Histogenesis, organogenesis and differentiation in the embryo of *Drosophila melanogaster*. New York: John Wiley and Son.
- Qian, S., Capovilla, M. and Pirrotta, V.** (1991). The bx region enhancer, a distant cis-control element of the *Drosophila* Ubx gene and its regulation by hunchback and other segmentation genes. *Embo J* **10**, 1415-25.
- Rodriguez, M. S., Desterro, J. M., Lain, S., Midgley, C. A., Lane, D. P. and Hay, R. T.** (1999). SUMO-1 modification activates the transcriptional response of p53. *Embo J* **18**, 6455-61.
- Sampson, D. A., Wang, M. and Matunis, M. J.** (2001). The small ubiquitin-like modifier-1 (SUMO-1) consensus sequence mediates Ubc9 binding and is essential for SUMO-1 modification. *J Biol Chem* **276**, 21664-9.
- Schenborn, E. T. and Mierendorf, R. C., Jr.** (1985). A novel transcription property of SP6 and T7 RNA polymerases: dependence on template structure. *Nucleic Acids Res* **13**, 6223-36.
- Schmid, A., Chiba, A. and Doe, C. Q.** (1999). Clonal analysis of *Drosophila* embryonic neuroblasts: neural cell types, axon projections and muscle targets. *Development* **126**, 4653-89.
- Schmidt, H., Rickert, C., Bossing, T., Vef, O., Urban, J. and Technau, G. M.** (1997). The embryonic central nervous system lineages of *Drosophila melanogaster*. II. Neuroblast lineages derived from the dorsal part of the neuroectoderm. *Dev Biol* **189**, 186-204.
- Seeler, J. S. and Dejean, A.** (2003). Nuclear and unclear functions of SUMO. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**, 690-9.

- Skeath, J. B.** (1999). At the nexus between pattern formation and cell-type specification: the generation of individual neuroblast fates in the *Drosophila* embryonic central nervous system. *Bioessays* **21**, 922-31.
- Skeath, J. B. and Carroll, S. B.** (1992). Regulation of proneural gene expression and cell fate during neuroblast segregation in the *Drosophila* embryo. *Development* **114**, 939-46.
- Skeath, J. B. and Doe, C. Q.** (1998). Sanpodo and Notch act in opposition to Numb to distinguish sibling neuron fates in the *Drosophila* CNS. *Development* **125**, 1857-65.
- Skeath, J. B. and Thor, S.** (2003). Genetic control of *Drosophila* nerve cord development. *Curr Opin Neurobiol* **13**, 8-15.
- Skeath, J. B., Zhang, Y., Holmgren, R., Carroll, S. B. and Doe, C. Q.** (1995). Specification of neuroblast identity in the *Drosophila* embryonic central nervous system by gooseberry-distal. *Nature* **376**, 427-30.
- Small, S., Blair, A. and Levine, M.** (1992). Regulation of even-skipped stripe 2 in the *Drosophila* embryo. *Embo J* **11**, 4047-57.
- Sommer, R. and Tautz, D.** (1991). Segmentation gene expression in the housefly *Musca domestica*. *Development* **113**, 419-30.
- Sommer, R. J., Retzlaff, M., Goerlich, K., Sander, K. and Tautz, D.** (1992). Evolutionary conservation pattern of zinc-finger domains of *Drosophila* segmentation genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 10782-6.
- Soto, M. C., Chou, T. B. and Bender, W.** (1995). Comparison of germline mosaics of genes in the Polycomb group of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **140**, 231-43.
- Spana, E. P. and Doe, C. Q.** (1995). The prospero transcription factor is asymmetrically localized to the cell cortex during neuroblast mitosis in *Drosophila*. *Development* **121**, 3187-95.
- Spana, E. P. and Doe, C. Q.** (1996). Numb antagonizes Notch signaling to specify sibling neuron cell fates. *Neuron* **17**, 21-6.
- Struhl, G. and White, R. A.** (1985). Regulation of the Ultrabithorax gene of *Drosophila* by other bithorax complex genes. *Cell* **43**, 507-19.
- Stryer, I.** (1995). Biochemie. Heidelberg: Spektrum Verlag.
- Su, R. C., Brown, K. E., Saaber, S., Fisher, A. G., Merckenschlager, M. and Smale, S. T.** (2004). Dynamic assembly of silent chromatin during thymocyte maturation. *Nat Genet* **36**, 502-6.
- Su, R. C., Sridharan, R. and Smale, S. T.** (2005). Assembly of silent chromatin during thymocyte development. *Semin Immunol* **17**, 129-40.
- Sudarsan, V., Pasalodos-Sanchez, S., Wan, S., Gampel, A. and Skaer, H.** (2002). A genetic hierarchy establishes mitogenic signalling and mitotic competence in the renal tubules of *Drosophila*. *Development* **129**, 935-44.
- Sun, L., Liu, A. and Georgopoulos, K.** (1996). Zinc finger-mediated protein interactions modulate Ikaros activity, a molecular control of lymphocyte development. *Embo J* **15**, 5358-69.

- Tabata, T., Schwartz, C., Gustavson, E., Ali, Z. and Kornberg, T. B.** (1995). Creating a *Drosophila* wing de novo, the role of engrailed, and the compartment border hypothesis. *Development* **121**, 3359-69.
- Tautz, D., Tautz, C., Webb, D. and Dover, G. A.** (1987). Evolutionary divergence of promoters and spacers in the rDNA family of four *Drosophila* species. Implications for molecular coevolution in multigene families. *J Mol Biol* **195**, 525-42.
- Tomari, Y. and Zamore, P. D.** (2005). Perspective: machines for RNAi. *Genes Dev* **19**, 517-29.
- Treier, M., Pfeifle, C. and Tautz, D.** (1989). Comparison of the gap segmentation gene hunchback between *Drosophila melanogaster* and *Drosophila virilis* reveals novel modes of evolutionary change. *Embo J* **8**, 1517-25.
- Udolph, G., Luer, K., Bossing, T. and Technau, G. M.** (1995). Commitment of CNS progenitors along the dorsoventral axis of *Drosophila* neuroectoderm. *Science* **269**, 1278-81.
- Verger, A., Perdomo, J. and Crossley, M.** (2003). Modification with SUMO. A role in transcriptional regulation. *EMBO Rep* **4**, 137-42.
- Wharton, K. A., Jr. and Crews, S. T.** (1993). CNS midline enhancers of the *Drosophila* slit and Toll genes. *Mech Dev* **40**, 141-54.
- White, K., Grether, M. E., Abrams, J. M., Young, L., Farrell, K. and Steller, H.** (1994). Genetic control of programmed cell death in *Drosophila*. *Science* **264**, 677-83.
- White, R. A. and Lehmann, R.** (1986). A gap gene, hunchback, regulates the spatial expression of Ultrabithorax. *Cell* **47**, 311-21.
- White, R. A. H. and Wilcox, M.** (1985a). Distribution of the *Ultrabithorax* Proteins in *Drosophila*. *Embo J* **4**, 2035-2043.
- Wilson, V. G. and Rangasamy, D.** (2001). Intracellular targeting of proteins by sumoylation. *Exp Cell Res* **271**, 57-65.
- Wimmer, E. A., Carleton, A., Harjes, P., Turner, T. and Desplan, C.** (2000). Bicoid-independent formation of thoracic segments in *Drosophila*. *Science* **287**, 2476-9.
- Winandy, S., Wu, P. and Georgopoulos, K.** (1995). A dominant mutation in the Ikaros gene leads to rapid development of leukemia and lymphoma. *Cell* **83**, 289-99.
- Wodarz, A.** (2005). Molecular control of cell polarity and asymmetric cell division in *Drosophila* neuroblasts. *Curr Opin Cell Biol* **17**, 475-81.
- Xiong, W. C., Okano, H., Patel, N. H., Blendy, J. A. and Montell, C.** (1994). repo encodes a glial-specific homeo domain protein required in the *Drosophila* nervous system. *Genes Dev* **8**, 981-94.
- Xue, Y., Wong, J., Moreno, G. T., Young, M. K., Cote, J. and Wang, W.** (1998). NURD, a novel complex with both ATP-dependent chromatin-remodeling and histone deacetylase activities. *Mol Cell* **2**, 851-61.
- Yamamoto, H., Ihara, M., Matsuura, Y. and Kikuchi, A.** (2003). Sumoylation is involved in beta-catenin-dependent activation of Tcf-4. *Embo J* **22**, 2047-59.

**Zelhof, A. C., Yao, T. P., Evans, R. M. and McKeown, M.** (1995). Identification and characterization of a *Drosophila* nuclear receptor with the ability to inhibit the ecdysone response. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 10477-81.

**Zhang, C. C. and Bienz, M.** (1992). Segmental determination in *Drosophila* conferred by hunchback (hb), a repressor of the homeotic gene Ultrabithorax (Ubx). *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 7511-5.

## 7 Anhang

### 7.1 Evolutiv konservierte Sequenzen im DS1-Fragment

1  
 GAATTCGAATCGAACGAAATCAAATCAAATAAATCCAATTATTCAATATAATTTTCA  
 59  
 AGTTTTTCGCTTTTTTTTTTTTGTGTTAACCTTTTGGCAATAATGACAATATTTTCGATGC  
 120  
 AACTGAAACTGACGAAAGAAGAAGTACAAATTTAGAGATTTTTAAAGAGTAGCTAAGA  
 178  
 TGC GCGAAATCTGAGCAACGGATCAA AATTAGTATTTACCCCATAAAATCTAAGTCGA  
 236  
 GGTCATGAAACGAATTTTCGAGACTTAAGATGTGAGCCCAGTGTAATCCTTGATAAATC  
 294  
 CCATTTTAAGTAAATTA AACTAGTCTAAGATATTTGCCACGAAATGTTTTTATGCAAT  
 353  
 AACATAATAAGATGAAGATATTATTATTATTATACCTGACTATGACTTTAGCTTTTCAT  
 412  
 TATTATATATGGTGTTTTATTTAGTGCGTTGTACTATGAACACTCATAACATATCCTGGAG  
 472  
 ATTCCTTTAACTTTCTTCAACAGAACCCAGCATATTATAATATATCCCTTATCCAACCA  
 532  
 TATGGCCAAGTACTGACCAATGGAAGTGTCAACACGCGATCTTTAAACATGATTTATCG  
 591  
 CAAGCGATCACCTCACCAAAAAAGCAACTGAATATATTGGGAAAATTGTAAGTATGT  
 649  
 ATGCATCTTCTTTTCAATTGAAGAACTGCTCCATCATGTGCTAAATACCCAAGTTATTA  
 708  
 GATGAAAAGGAATAATATACAATACAGAATTTGTGTGCGGGCGCAACCCAACAAATTG  
 766  
 GACAAGCTCCTGCTTTCTTCTTCATATTTCAATGCATCGAATTTTGATGGATTATTGAC  
 826  
 GTTTTGCGTGAAAACGCACAATTCGCATTGCATATGAGAGGGGCATTATATAATAATG  
 884  
 AAAA ACTCATGAGCACGCGCTGAAGGAGCCGGAGGAGGAGTGGCAGGAAGATGACGC  
 941  
 AGCAAGGGGACTCCTTCTGCAATCCGGGATCACTTGGGATCGATCCTTGGAATTTTTTT  
 1000  
 TGGGGTTGGCGCGCATGCGTCCAACGCACTTCAGCCAAATGGCGCGTGGATAAGGGGA  
 1058  
 AATTCCTTCAATTTTCGGGTCTCGAGTGGAAAGTCAGTTCTATAAAAATAGTTTTCTCC  
 1117  
 AAGCTGCATCTGATTGGTGGTTGAAGGAATGCACTTCTCTAGATGTAAATCCATGTAA  
 1176  
 ATTTTCGTTTAAATGCCGTTTTTCTCATTAAATCATTCCACCAATAATTGATATTTATGG  
 1236  
 ACGAAATTAATTTTCGTTGGGAGTCAAGGGTGAGTGCGGGGCCAAGATGATGGTTAAG  
 1294  
 GCGTCTGATCTTATCGCAAATTAGATTTTGCATATCCCCTTAGATTAAAGCCTCAAGCC  
 1353  
 AGAAGGATCTGCACATCCTTGTTTCAATTAAGCGAAGTTAGGTTGGCAATTTGCCCTTTG  
 1412

TACCGGATAAACTCTTGGCTTGTGGCCGCCGCAAGCGAAAGATGTTTATCGATAACGA  
1470 90%

AGGAGTCCCTGCCGCATTGTCCTCATTTGAGCTAACGATCCCTAGTTTCTGGTTTTGTTG  
1530

CTCGGTTCTTATCTCAGCTTGTGGCTTTGTAGCATCTCCCTTCTTCCTGCTGCCCGTCATT  
1591 Primer DS1-1 reverse

GTTTGCGAATAGACAAAAAACAAAAATGCAGAAAGAGTAGGTGGAGAGTCTGGCCA  
1648

CTTTGTGTCCTGCGAGTTCTTCAAATAGTTCAATTGCCCGGCCTGCTGACCATTTGAAA  
1707

GGTGTAATTTTGGTCGTGTTAGGGTACCGGGTCCCTTCTCCTATGTCCTGAATGCAGCT  
1766

GCTCTTGCCATCCTCCTTTCCAGCTATTGACTCACCTTTTACTCCCCAACACTGATT  
1826

GATCAGCAGGACACGCGTATGGCACACTTTCACAATACATAATTTGGGCTTTTACCACT  
1885

GCCCCAACTCAATCGGCAATTATCAAAGCTAGCTAAGTCTGGAGAATTATGTGCACTTG  
1944

GAAATAAGAACA AAACTTCCTAAGCTAGTTAGTTAGTTATTATATTAACGTTTTATAA  
2003

ATCATACGATTTGTTATCTTAAATATATTTTATTAACGATAGAATTACTTAAGTTTTGT  
2063

AGTATTACAGCATACTCGTACATATGATGGAACCTGGATTATTTCTTTAATACTCAGCT  
2122

AAAAAGGGCTGTGATCTAGAGTATTTTATAAATTTTCCCTCAGTGTATATACAAATAAT  
2181

AGTCGCTTGGTCACATGTATGTACATATATCCACAGGGCTAAGCAACGCCATAAATA  
2239

GGGTATTTATGTTTAAACCACCACCTTCGACTTCGCCATTTTGGGATGGGGGATGTGATT  
2298 Primer DS1-2

CGGATTTGGTGTGGGTTACGGATTGAGTTTTTGGTGCCAACGGTGCACGATATGGTGGC  
2357

CATTTTTAGCAGCTCTGCCACCAAAAATAACACAAAACCAAAATAGCAAATATTGAAA  
2415

AAGGGGAAAGGGGTTAACAAGGGTTTCCACTCACCCAAAATATATAGTAATATACTC  
2473

GGGGGGTAACAGGGCGACATGTTGTGGGTGTTTGGTTGATTAGACGGCGTCCGGGGTG  
2531

CCCAATGGCCACATGCAGGATCCGATGCGATCCCATGATTAGCAATCCACCCCGCAA  
2589 96%

GTCAGCATCCTTTGATGAGCTGTTGATTGCATCAGTAAAGCCGGCGCCACATCCAGG  
2648 97%

GATCGAAACTCGCCGGCTACTTTTTTCCACAACCTTTACGCATTTTAATTATGAAAATCG  
2707

CCAGGACTGGGCAGGAATGAGATGGGATCGGATCAGTCGGGTACCCGGATCAAGGGA  
2764

CCAGGGCCAGCATCTGTGTGTGGGTTAATTATCAGCGGCGATCCTTTGATGTCTCAAG  
2823 87%

CGTGACGTCATGTGCGAGCCACCTTAAGGATTTGTTGAACACCCGATAATTTATTTAG  
2882

TAAACAGCAATTCTCTGGAAATTATGCCTAGAATGCCAGGGAGGGAAAGGGAGACCATC  
2940 95%

CTTTCACCTCGTCCAACAGCTGACCGGCCCGCGTTTCGTCCTGCGAGATTGAGGTGGGTG  
2999 Primer DS1-2 reverse

TAGCGAATCCTTAAGTGGTCAACGCTGCTAACGAGCACCAAGGATGTGCTGACCATCT  
3057



## 7.2 Karten der verwendeten Vektoren

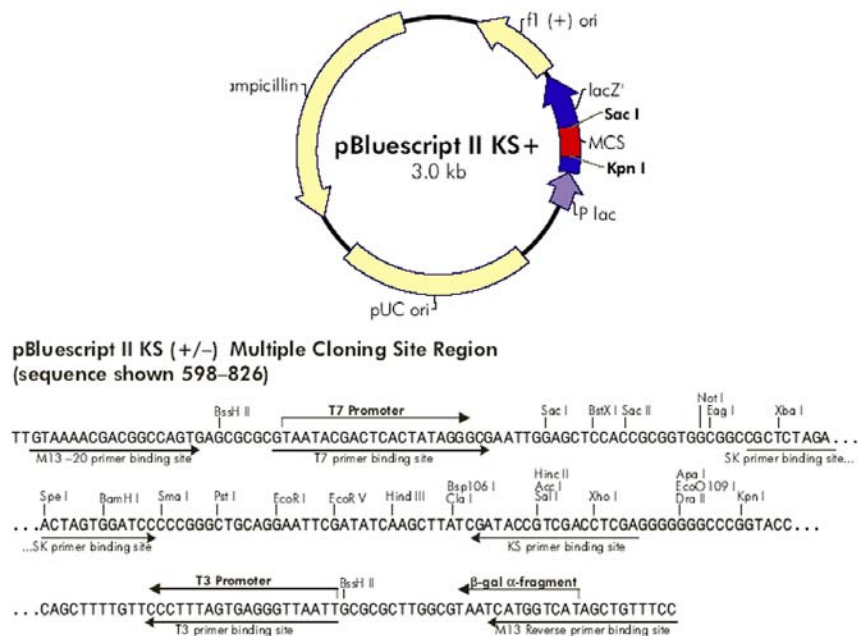


Abb. 7.1: Karte des pBluescript II KS-Vektors

Quelle: <http://www.stratagene.com/products/displayProduct.aspx?pid=267>

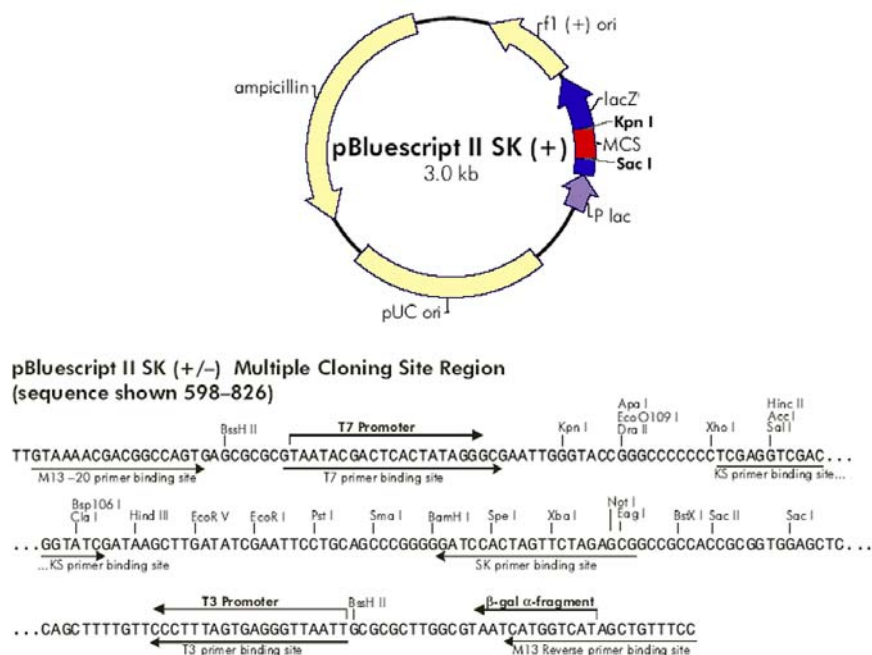


Abb. 7.2: Karte des pBluescript II SK-Vektors

Quelle: <http://www.stratagene.com/products/displayProduct.aspx?pid=267>

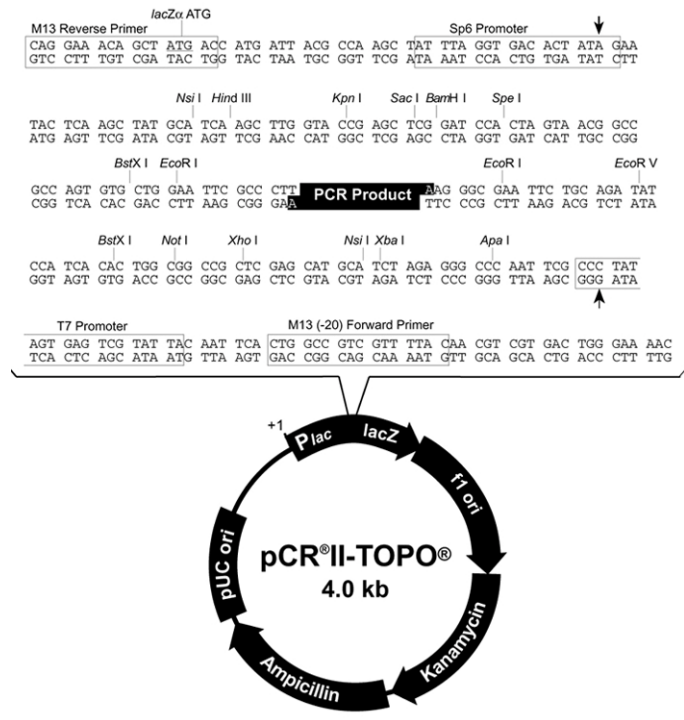


Abb. 7.3: Karte des pCR II Topo-Vektors

Quelle: <http://www.invitrogen.com/search.cfm?searchTerm=pcrII%20topo&num=10&category=Vectors>

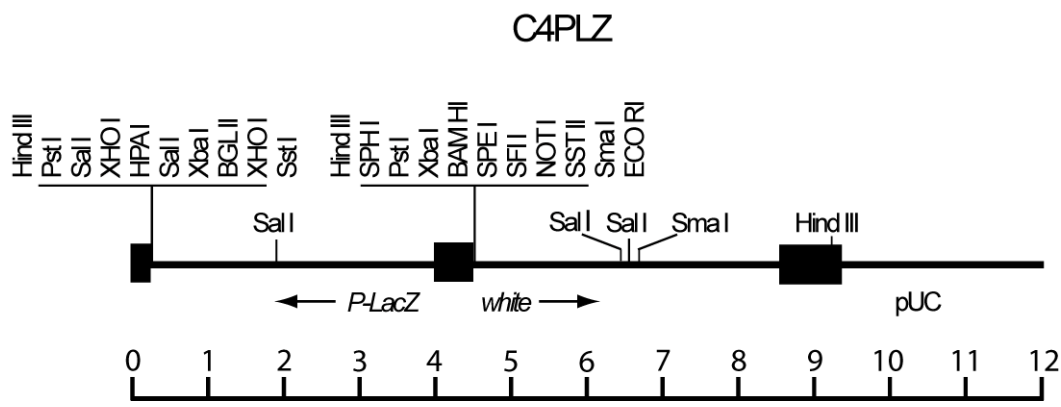
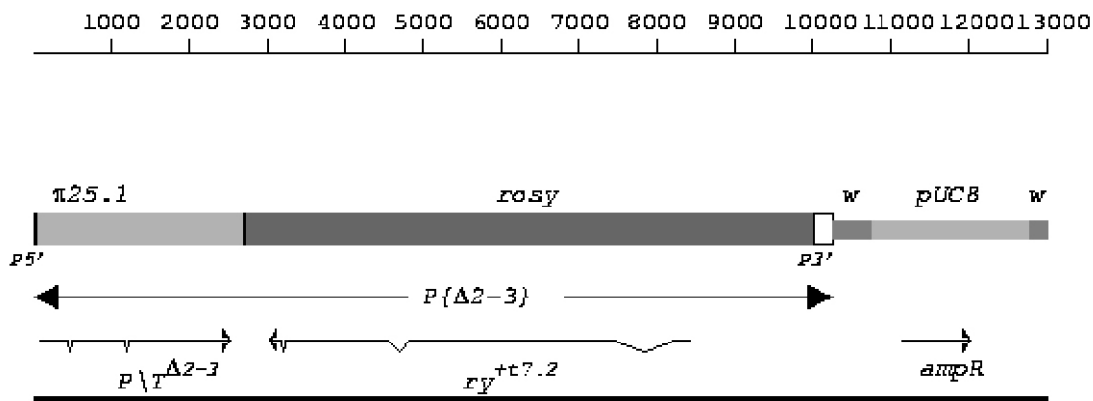


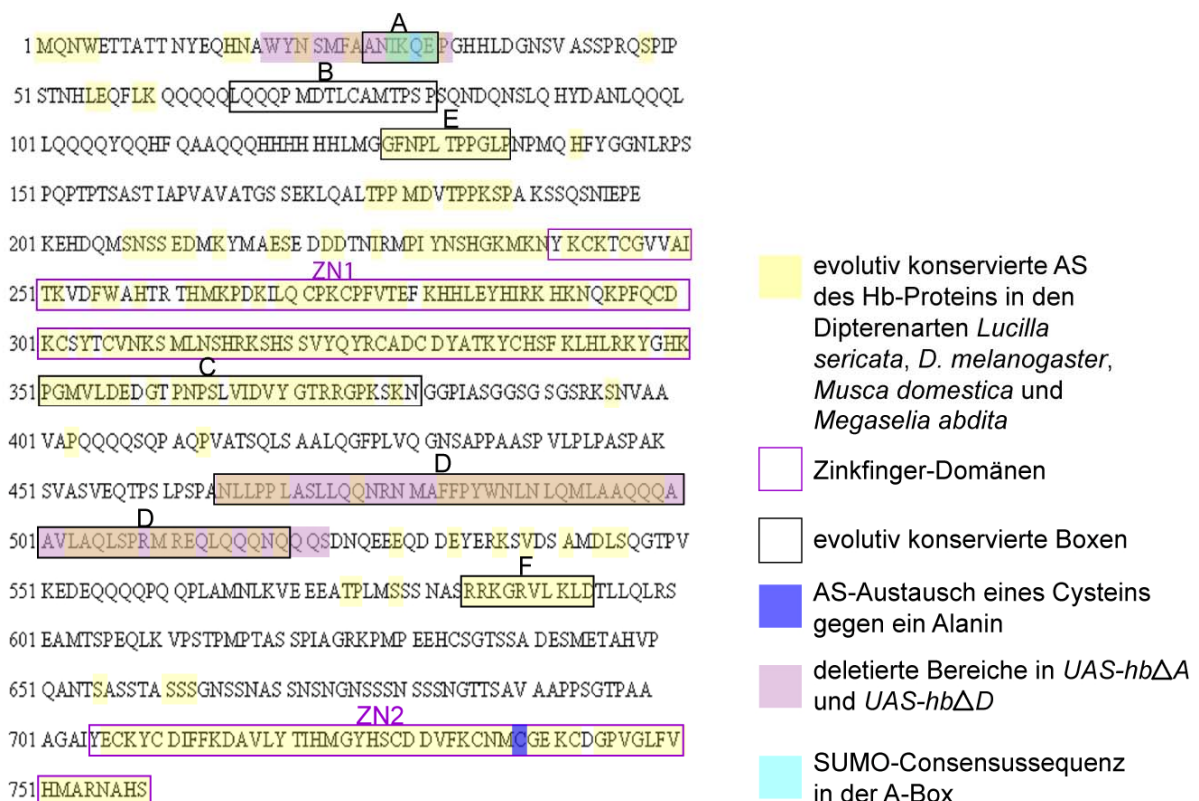
Abb. 7.4: Karte des C4PLZ-Vektors

Nach Wharton und Crews (1993)



**Abb. 7.5: Karte des p(Δ2-3)-Helferplasmids**  
 Nach Laski et al. (1986)

### 7.3 Aminosäuresequenz des Hb-Proteins



**Abb. 7.6: Aminosäuresequenz des Hb-Proteins**

Aminosäure-Sequenz von Hb mit Angabe der evolutiv konservierten Aminosäuren (AS), der Zinkfingerdomänen, der Boxen sowie der deletierten und mutierten Bereiche in den in dieser Arbeit untersuchten *hb*-Varianten (s. Legende). Die Abbildung basiert auf den Analysen von McGregor et al. (2001). Diese Arbeitsgruppe konnte zwei weitere konservierte Bereiche identifizieren (E- und F-Box), die in den Arbeiten von Tautz et al. (1987) und Sommer et al. (1992) noch nicht beschrieben worden sind.

## 7.4 Abkürzungsverzeichnis

Nicht aufgeführt sind die Einheiten nach dem Internationalen Einheitensystem (SI) sowie dezimale Vielfache von Einheiten.

$\alpha$ (bezgl. Antikörperfärbung)	anti
Antp	Antennapedia
AP	anterior-posterior
bp	Basenpaare
$\beta$ -Gal	$\beta$ -Galaktosidase
Cas	Castor
DAB	3,3'-Diaminobenzidin Tetrahydrochlorid
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DIG	Digoxygenin
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DV	dorsoventral
EB	Elutionspuffer
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglykoltetraessigsäure
Eg	Eagle
En	Engrailed
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
GMZ/GMC	Ganglienmutterzelle
Grh	Grainy head
Hb	Hunchback
HRP	Horse Radish Peroxidase (Meerrettich-Peroxidase)
kb	Kilobasen
Kni	Knirps
Kr	Krüppel
LB	Luria Broth
LSM	konfokales Laserscanning-Mikroskop
M	molar
mRNA	Boten-RNA (messenger RNA)
n	Anzahl
NB	Neuroblast

---

NS	Nervensystem
NuRD	Nukleosom-Restrukturierungs- und Histon-Deacetylierungs-Komplex
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PBT	Phosphat-gepufferte Salzlösung plus Triton
PBTween	Phosphat-gepufferte Salzlösung plus Tween
PcG	Polycomb-Gruppe
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEMS	PIPES-EGTA-Magnesiumsulfat-Sorbit
Pdm-1	POU-Domänenprotein 1
Pdm-2	POU-Domänenprotein 2
Pfu	<i>Pyrococcus furiosus</i>
Pros	Prospero
Repo	Reverse polarity
RNA	Ribonucleinsäure
S1-5	Segregationswellen 1-5
SUMO	small ubiquitin modifier
Svp	Seven-up
ssDNA	single stranded DNA (einzelsträngige DNA)
St	Stadium
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TAE	Tris-Acetat-EDTA
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
UAS	Upstream Activating Sequence
Ubx	Ultrabithorax
U/min	Umdrehungen pro Minute
UTP	Uridintriphosphat
UTR	untranslatierte Region
VNS	ventrales Nervensystem
WT	Wildtyp
w/v	Masse/Volumen
Zfh-2	Zinkfinger-Homöodomänenprotein 2
ZNS	zentrales Nervensystem